

Aus der 1. Medizinischen Klinik (Direktor Dr. A. Schömig)
der Technischen Universität München

Fakultät für Medizin

**Migration von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in
atherosklerotische Läsionen und Differenzierung zu myeloiden
Entzündungszellen**

Angelika Weber

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. St. Massberg
2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 07.03.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.05.2014 angenommen.

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG.....	1
2 STAND DER FORSCHUNG	2
2.1. Die Pathogenese der Atherosklerose	2
2.1.1 Aufbau der Arterien	2
2.1.2 Entstehung der frühen atherosklerotischen Läsionen.....	3
2.1.3 Entwicklung der fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques.....	4
2.1.4 Folgen der Atherosklerose	5
2.1.5 Prädilektionsstellen der Atherombildung.....	6
2.2. Die ApoE-Knockout-Maus als Modell zur Untersuchung der Atherosklerose	6
2.3. Die Rolle der Antigen-präsentierenden Zellen in der Atherogenese.....	8
2.3.1 Der Major Histocompatibility Complex Klasse II	8
2.3.2 Makrophagen	9
2.3.3 Dendritische Zellen	9
2.3.4 B-Lymphozyten	11
2.4. Hämatopoese und hämatopoetische Stammzellen.....	11
3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	14
4 MATERIAL UND METHODEN	15
4.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen	15
4.1.1 Die ApoE-Knockout-Maus.....	15
4.1.2 Die MHCII-eGFP-Maus.....	15
4.1.3 Die β -Aktin-eGFP-Maus	16
4.1.4 Haltungsbedingungen	16
4.2. Nachweis von HSPCs aus Blut und atherosklerotisch verändertem Aortengewebe von ApoE-Knockout-Mäusen	17
4.2.1 Colony-Forming-Unit-Assay	17
4.2.2 Immunfluoreszenz-Färbungen der koloniebildenden Zellen	18
4.2.3 Durchflusszytometrische Charakterisierung der koloniebildenden Zellen.....	21
4.3. Untersuchung von Migration und Differenzierung der HSPCs im atherosklerotisch veränderten Organismus	24
4.3.1 Versuchsaufbau	24
4.3.2 Gewinnung der HSPCs aus dem Knochenmark	26
4.3.3 Organentnahme und Anfertigung von Kryoschnitten	28

4.3.4 Detektion der grün fluoreszierenden MHCII-positiven Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung der Kryoschnitte.....	29
4.3.5 Vergleich der Anzahl der eGFP-positiven Zellen zwischen den einzelnen Gruppen.....	30
4.3.6 Detektion der grün fluoreszierenden MHCII-positiven Zellen mittels 2-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie.....	31
4.3.7 Charakterisierung der grün fluoreszierenden Zellen durch Fluoreszenzfärbungen von eGFP und CD11b bzw. CD11c.....	32
4.3.8 Lokalisation der grün fluoreszierenden Zellen im lymphatischen Gewebe durch Immunfluoreszenzfärbung von eGFP und B220	33
4.3.9 Untersuchung der Proliferation durch Immunfluoreszenzfärbung von eGFP und ki-67	34
4.3.10 Statistische Auswertung	35
5 ERGEBNISSE	37
5.1. Charakterisierung klonogener Zellen aus Aorta und Blut ApoE-defizienter Mäuse	37
5.1.1 Analyse der Oberflächenmarker mittels Immunfluoreszenzfärbungen in Einzelzellsuspension	37
5.1.2 Nachweis von Dendritischen Zellen in den Kolonien	45
5.1.3 Analyse der Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie	47
5.2. Untersuchung des Rekrutierungs- und Differenzierungsverhaltens hämatopoetischer Vorläuferzellen in der Aorta der ApoE-Knockout-Maus.....	56
5.2.1 Detektion von eGFP-positiven Antigen-präsentierenden Zellen in der Aorta mittels Immunfluoreszenzfärbungen	56
5.2.2 Detektion von eGFP-positiven MHCII-exprimierenden Zellen in der Aorta ApoE-defizienter Mäuse mittels 2-Photonen-Mikroskopie	59
5.2.3 Untersuchung der Differenzierung der injizierten KSL-Zellen	61
5.2.4 Vergleich der Anzahl der eGFP-positiven Zellen in der Aorta in den verschiedenen Gruppen.....	64
5.3. Betrachtung des Migrationsverhaltens der differenzierten eGFP-positiven Zellen im Lymphknoten.....	77
5.4. Untersuchung der Proliferation der injizierten KSL-Zellen in den atherosklerotischen Plaques	79

6 DISKUSSION	83
6.1. Charakterisierung der Colony Forming Units aus Blut und Aorta	83
6.2. Untersuchung des Migrationsverhaltens von HSPCs in der Aorta der ApoE-Knockout-Maus	87
6.3. Untersuchung des Differenzierungsverhaltens injizierter KSL-Zellen in der ApoE-Knockout-Maus	91
6.4. Zusammenfassende Hypothese zur Migration und Differenzierung der HSPCs	93
6.5 Untersuchung der Proliferation der injizierten KSL-Zellen	95
6.6 Ausblick und klinischer Nutzen	96
7 ZUSAMMENFASSUNG	97
8 SUMMARY	98
9 LITERATURVERZEICHNIS	99
10 TABELLENVERZEICHNIS.....	107
11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	108
12 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	111
13 DANKSAGUNG.....	113
ANHANG	114

1 EINLEITUNG

Atherosklerose ist eine Krankheit der großen Arterien und die hauptsächliche Ursache für Herzerkrankungen und Schlaganfall.⁵³ In den westlichen Industrieländern ist sie für ca. 50% der Todesfälle verantwortlich.^{53,78} Die Krankheit ist gekennzeichnet durch die Ausbildung von sog. Plaques in der Gefäßwand, wobei die Veränderungen nicht, wie früher angenommen, auf eine einfache Degeneration der Blutgefäße zurückzuführen sind. Seit 1973 geht man vielmehr davon aus, dass Lipidablagerungen in der Gefäßwand eine chronische Entzündungsreaktion mit der Folge einer progredienten endothelialen Dysfunktion hervorrufen.⁸⁰ Durch Plaqueruptur, Thrombose und konsekutiven Verschluss des Gefäßes kann sich die Erkrankung als akutes klinisches Ereignis manifestieren, zum Beispiel als Myokard- oder Cerebralinfarkt.¹⁹ Viele Risikofaktoren führen zur Entstehung dieser Krankheit, von denen arterielle Hypertonie, Rauchen und Hyperlipoproteinämie als Beispiele aufgezählt werden können.⁸⁰ Neben diesen sog. „life style“-Faktoren spielen weiterhin sowohl genetische Disposition als auch Umweltfaktoren eine Rolle.⁵³

Mit intensiver Forschung ist das Verständnis der Entstehung von Atherosklerose stetig gewachsen. Dennoch bleiben viele Aspekte der Pathogenese, insbesondere Prozesse, die in frühen Phasen der Atherosklerose ablaufen, noch weitgehend ungeklärt. Bei steigender Inzidenz und Mortalität der Folgeerkrankungen der Atherosklerose erscheint gerade die Aufklärung von Mechanismen, die während der chronischen Progression atherosklerotischer Plaques noch vor der Plaqueruptur ablaufen von besonderem Interesse, um präventive Maßnahmen entwickeln zu können.

Die vorliegende Arbeit untersucht die bisher weitestgehend unverstandene Rolle von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPCs) im Prozess der Atherosklerose. Am Mausmodell soll hier geklärt werden, inwiefern HSPCs im Bereich atherosklerotischer Plaques rekrutiert werden und sich am chronisch-entzündlichen Prozess im Rahmen der Atherogenese beteiligen.

2 STAND DER FORSCHUNG

2.1. Die Pathogenese der Atherosklerose

Atherosklerose ist eine progressiv fortschreitende Erkrankung, die durch eine Anhäufung von Lipiden und fibrotischen Elementen in der Wand der großen Arterien gekennzeichnet ist.⁵³ Aufgrund der spezifischen zellulären und molekularen Reaktionen darauf, kann das Krankheitsgeschehen am ehesten als entzündlicher Prozess mit endothelialer Dysfunktion angesehen werden.⁷⁹ Im Folgenden werden die Mechanismen erläutert, die in den verschiedenen Stadien der Erkrankung ablaufen und zu den typischen Veränderungen am Blutgefäß führen.

2.1.1 Aufbau der Arterien

Arterien sind röhrenförmige Gebilde, die in ihrem Inneren den Blutstrom beinhalten und deren Wand aus drei morphologisch unterschiedlichen Schichten aufgebaut ist (vgl. Abb. 1).

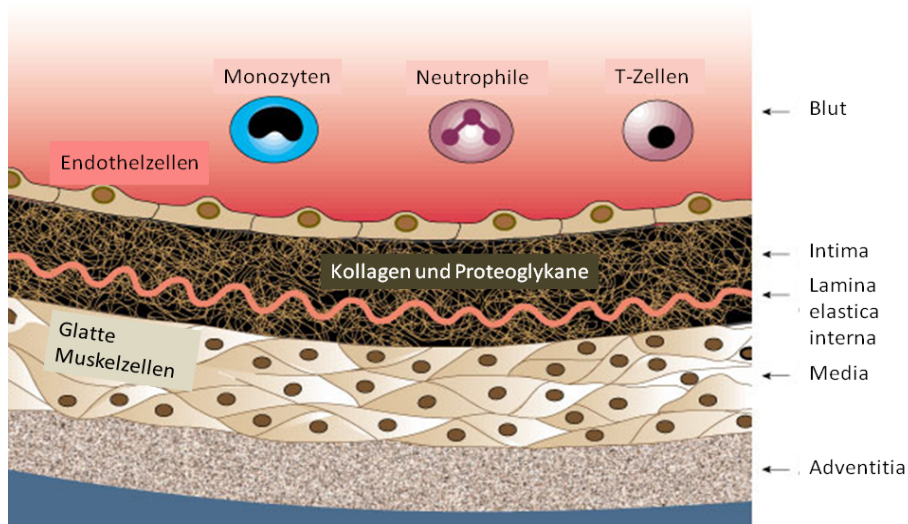


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Arterienwand
(nach Lusis, Nature, 2000)

Innen, an der Seite des Blutstroms, befindet sich die sog. Intima, die aus einer dünnen Matrix aus Kollagen und Proteoglykanen besteht⁵³ und luminal mit nebeneinander angeordneten Endothelzellen ausgekleidet ist. Das Endothel ist eine selektiv durchlässige Barriere zwischen dem Blutstrom und der Arterienwand und kann Effektormoleküle produzieren, die bei der Regulation von Thrombose, Entzündung, Gefäßtonus und vaskulären Umbauprozessen eine Rolle spielen. Der mittlere Teil wird Media genannt und setzt sich aus glatten Muskelzellen und elastischen Bindegewebskomponenten zusammen. An der Außenseite liegt die sog. Adventitia, die Bindegewebe mit dazwischenliegenden Fibroblasten und glatten Muskelzellen beinhaltet. Die einzelnen Schichten werden jeweils durch eine zarte Lage elastischer Fasern voneinander abgegrenzt, die als Lamina elastica interna bzw. externa bezeichnet werden.^{53,80}

2.1.2 Entstehung der frühen atherosklerotischen Läsionen

Der im Folgenden beschriebene Prozess ist normalerweise ein physiologischer Schutzmechanismus gegen Verletzungen des Endothels und der glatten Muskelzellen der Arterien.⁷⁸ Das Endothel reagiert auf Schäden mit einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen für Leukozyten und Blutplättchen und mit einer Erhöhung der Permeabilität, mit dem Ziel, das eingedrungene Agens schnellstmöglich zu beseitigen.⁷⁹

Im Rahmen der Atherosklerose beeinträchtigen vor allem Lipoproteine und Cholesterin die Intaktheit des Endothels.⁶¹ Der Versuch, diese Stoffe zu entfernen, resultiert in einer überschießenden Entzündungsreaktion, welche in ein pathologisches Geschehen mündet.⁷⁸

Zu Beginn der Erkrankung findet sich eine Ansammlung von aggregierten Lipoproteinpartikeln, v.a. Low Density Lipoprotein (LDL), im subendothelialen Raum. Das LDL diffundiert hierbei passiv durch das Endothel, wird in der Intima gespeichert und durch Oxidation modifiziert. Die Akkumulation von oxidiertem LDL führt einerseits zu einer direkten Schädigung des Endothels und andererseits zur Produktion von proinflammatorischen Molekülen, Adhäsionsmolekülen und

Wachstumsfaktoren durch das Endothel.⁶³ Dadurch können nach einigen Tagen bis Wochen Monozyten des Blutes an diesen Stellen des Gefäßes hängenbleiben. Nach der Einwanderung dieser Entzündungszellen in die Intima findet eine Proliferation und Differenzierung zu Makrophagen statt.³ Diese phagozytieren das Fremdmaterial, können aber die fetthaltige Substanz nicht weiter abbauen und werden nun aufgrund ihres Aussehens Schaumzellen genannt.⁷⁸ Desweiteren werden T-Lymphozyten zu diesen Arealen rekrutiert, welche zusammen mit den Schaumzellen zu sog. Fatty Streaks aggregieren.³⁴ Diese entstehen in der Aorta bereits in der frühen Kindheit und lassen sich in der zweiten Lebensdekade auch in den Koronararterien finden.⁸⁹ Die Fatty Streaks haben als solche keine klinische Relevanz, sind jedoch als Frühstadium der Atherosklerose anzusehen, da sie sich im weiteren Verlauf der Erkrankung zu fibrotischen Atheromen weiterentwickeln können.³⁴

2.1.3 Entwicklung der fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques

Die Schaumzellen sterben in der Intima der Gefäßwand ab und setzen ihren Inhalt frei, wodurch ein lipidreicher nekrotischer Kern entsteht. Dies führt zur Proliferation und Einwanderung von glatten Muskelzellen aus der Media, die sekretorisch tätig sind und sich zusammen mit der produzierten bindegewebigen Matrix wie eine Kappe um das fetthaltige Zentrum legen. Die so entstandenen fibrotischen Plaques werden immer größer und wachsen dabei zunächst in Richtung Adventitia bis ein gewisser Punkt erreicht ist. Danach erfolgt die Expansion nach innen, wobei das Gefäßlumen immer weiter verkleinert wird.⁵³ Das Wachstum der Atherome vollzieht sich durch das Einwandern weiterer Makrophagen und Lymphozyten aus dem Blut, die sich in den Läsionen immer stärker vermehren.⁷⁹ Dies wird von Proliferation und Migration glatter Muskelzellen, Produktion von extrazellulärer Matrix und weiterer Anhäufung von Lipiden begleitet.^{53,79}

2.1.4 Folgen der Atherosklerose

Die so entstandenen fortgeschrittenen Plaques können zu sehr komplexen Gebilden werden mit Kalzifikationen, Ulzerationen der luminalen Oberfläche und Neovaskularisation mit kleinen Gefäßen, die aus der Media in die atherosklerotische Läsion eingewachsen sind.⁵³

Solange die fibrotische Kappe ausreichend dick ist, spricht man von stabilen Plaques, deren Gefahr von ihrem Wachstum ins Gefäßlumen ausgeht, wodurch der Blutfluss immer stärker behindert wird.⁷⁹

Von diesem chronischen Prozess müssen akute Ereignisse abgrenzt werden, die wichtige klinische Komplikationen der Atherosklerose darstellen. Diese geschehen vor allem an den sog. vulnerablen Plaques, die durch eine dünne fibrotische Kappe und viele Entzündungszellen gekennzeichnet sind.⁵³ Aktivierte T-Lymphozyten induzieren in Makrophagen und Endothelzellen die Produktion von Enzymen, die Kollagene, elastische Fasern und andere Substanzen zerstören können, wodurch die fibrotische Schutzschicht der Plaques immer mehr verringert wird.⁷⁹ An diesen Stellen platzt die antithrombotische Endothelschicht leicht auf und das darunterliegende Gewebe wird freigegeben. Nun können sich Thrombozyten an die subendotheliale Kollagenmatrix anlagern²³, worauf sie aktiviert werden und zu einem Thrombus aggregieren, welcher das Gefäß akut verschließt. Je nach Lokalisation manifestiert sich dies zum Beispiel als Myokardinfarkt oder Schlaganfall.¹⁹

Neben der Plaqueruptur kann auch die Neovaskularisation der Plaques zu Problemen führen, da die eingewanderten Gefäße brüchig sind und es so leicht zu Mikrohämorrhagien und kleinen Thrombosen innerhalb der Läsionen kommt. Das dabei gebildete Thrombin hat einen fördernden Effekt auf Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen, wodurch die Größe des Atheroms plötzlich rapide zunimmt und ebenfalls einen Gefäßverschluss herbeiführen kann.⁵⁰

2.1.5 Prädilektionsstellen der Atherombildung

Die atherosklerotischen Läsionen bilden sich nicht unwillkürlich im gesamten arteriellen Gefäßsystem, sondern vor allem an Stellen, die im Gegensatz zum normalen laminaren Blutfluss durch einen turbulenten Strom gekennzeichnet sind. Hier weisen die gewöhnlich flachen Endothelzellen eine pflastersteinartige, mehrkantige Morphologie auf und zeigen eine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle wie zum Beispiel LDL.^{27,53} Außerdem werden hier verstärkt Moleküle exprimiert, welche die Adhäsion, Migration und Akkumulation von Monozyten und T-Zellen erleichtern. Diese Umstände begünstigen die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen. Orte mit vornehmlich turbulenter Strömung sind vor allem Abgänge und Verzweigungen von Arterien sowie ein kurviger Verlauf.³⁰ Beispiele hierfür sind die Bifurkation der A. carotis communis und der Aortenbogen.

2.2. Die ApoE-Knockout-Maus als Modell zur Untersuchung der Atherosklerose

Mäuse sind sehr resistent gegenüber der Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen. Der einzig bekannte Inbred-Mausstamm, der durch cholesterinreiche Diät entsprechende Gefäßveränderungen entwickelt, ist der C57BL/6-Stamm, wobei sich die vaskulären Läsionen in Lokalisation und Histologie von humanen atherosklerotischen Plaques unterscheiden.⁴¹

Damit die Atherosklerose-Entstehung in der Maus mit derjenigen im Menschen besser vergleichbar ist, wurden genetische Veränderungen vorgenommen und sogenannte Knockout-Mäuse kreiert. Bekannt sind hierbei unter anderem die ApoE-Knockout-Maus und die LDL-Rezeptor-defiziente Maus. In letztgenanntem Stamm kommt es zu einer Erhöhung der Plasmaproteine, was jedoch unter normalen Futterbedingungen nicht zur Ausbildung von atherosklerotisch veränderten Arealen führt. Sobald die Mäuse aber eine cholesterinreiche Nahrung erhalten, wird die Entstehung der atherosklerotischen Plaques gefördert.^{38,39}

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der ApoE-Knockout-Maus verwendet, welches für die Untersuchung der Atherosklerose gängig verbreitet ist und im Folgenden genauer charakterisiert wird.

Im Jahre 1992 wurde die erste genetisch veränderte Maus entwickelt, bei der das Gen für das Apolipoprotein E (ApoE) inaktiviert wurde.⁷⁰ ApoE ist ein Glykoprotein mit einer molekularen Größe von ungefähr 34 kD, das vor allem in der Leber gebildet wird und struktureller Bestandteil aller Lipoproteine mit Ausnahme des LDL ist.

ApoE weist eine hohe Affinität zum Apolipoprotein B (ApoB)- und zum LDL-Rezeptor auf und trägt somit entscheidend zur Aufnahme der Lipoproteine in der Leber bei.¹⁰⁰ Darüber hinaus wird ApoE auch in atherosklerotisch veränderten Gefäßen von Monozyten und Makrophagen hergestellt, wo es das Cholesteringleichgewicht und die Entzündungsreaktion beeinflusst.¹⁷

Ein homozygotes Fehlen von ApoE geht mit einer normalen Entwicklung einher und führt zu erhöhten Plasmalevels an Cholesterin und Triglyceriden, die zur Atherosklerose prädestinieren.⁷⁰ Die Entstehung der Läsionen ähnelt dabei der Atherogenese im Menschen. Im Alter von fünf bis sechs Wochen können in den ApoE-Knockout-Mäusen erste Monozytenadhäsionen und -transmigrationen am Endothel nachgewiesen werden. Mit sechs bis zehn Wochen lassen sich in den meisten Tieren Fatty Streaks finden, welche sich schnell zu fortgeschrittenen Läsionen weiterentwickeln. Diese bestehen wie beim Menschen aus einem nekrotischen Kern, der von proliferierenden glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix umgeben ist. Die Entstehung der atherosklerotischen Plaques erfolgt spontan und kann durch eine fetthaltige, westliche Diät beschleunigt werden. Neben der Ähnlichkeit in der Pathogenese und der beteiligten Zelltypen sind die atherosklerotischen Läsionen in der ApoE-defizienten-Maus auch hinsichtlich der Lokalisation an Gefäßverzweigungen mit denen im Menschen vergleichbar.⁶²

Daraus folgt, dass sich dieses Mausmodell zur Untersuchung der Pathogenese der Atherosklerose sehr gut eignet, weshalb es für die Durchführung der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

2.3. Die Rolle der Antigen-präsentierenden Zellen in der Atherogenese

Atherosklerose ist eine systemische Erkrankung, in deren Entstehung nahezu alle Leukozyten-Subpopulationen involviert sind.^{27,97} Die Antigen-präsentierenden Zellen spielen dabei eine entscheidende Rolle. Sie stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen dem angeborenen, unspezifischen Immunsystem und der adaptiven, spezifischen Immunantwort dar. Ihre Hauptaufgabe besteht zum einen darin, schädliche Substanzen aufzunehmen und so aufzubereiten, dass diese von T-Lymphozyten erkannt werden können. Zum anderen präsentieren sie auch körpereigene Proteine und sind dadurch für die Toleranzinduktion verantwortlich.¹²

2.3.1 Der Major Histocompatibility Complex Klasse II

Zu den Antigen-präsentierenden Zellen zählt man Makrophagen, Dendritische Zellen und B-Lymphozyten, denen die Expression des Major-Histocompatibility-Complex-Klasse-II-(MHCII)-Moleküls gemeinsam ist.⁴⁵ Dieses Molekül ist sowohl für die Entwicklung einer effektiven Immunantwort als auch für die Toleranz von körpereigenen Stoffen verantwortlich.³⁷ In unreifen Antigen-präsentierenden Zellen befindet sich der Großteil der MHCII-Moleküle intrazellulär in sogenannten „MHC Klasse II reichen Kompartimenten“, die in ihren Eigenschaften den Lysosomen ähneln und aus vielen kleinen Vesikeln bestehen.⁴⁶ In diesen Kompartimenten erfolgt sowohl die Zerkleinerung des aufgenommenen Antigens als auch die Beladung der MHCII-Moleküle mit den entstandenen Peptiden.³⁷ Zum Abschluss des Reifungsprozesses der Antigen-präsentierenden Zellen werden die MHCII-Moleküle an die Zellmembran transportiert. Dabei werden Tubuli gebildet, die von dem „MHC Klasse II reichen Kompartiment“ bis zur Plasmamembran reichen und an ihrem Ende die beladenen MHCII-Moleküle beherbergen.⁴⁶ Durch Fusion der Tubuli mit der Zellmembran werden die MHCII-Moleküle zusammen mit dem Antigen an die Außenseite der Zelle gebracht¹⁵ und dienen dort als Ligand für den T-Zell-Rezeptor auf T-Helferzellen.⁹³

2.3.2 Makrophagen

Makrophagen können auf gerade beschriebene Weise Antigene prozessieren und präsentieren und waren die ersten Entzündungszellen, die mit Atherosklerose in Verbindung gebracht wurden.²⁸ Sie entstehen aus eingewanderten Monozyten des Blutes²⁸ und sind in allen Stadien der vorherrschende Zelltyp in der Umgebung der Plaques.³² Es handelt sich hierbei um gewebständige Zellen mit der Hauptfunktion der Beseitigung von Fremdstoffen durch Phagozytose und anschließende intrazelluläre Degradation. Im Rahmen der Atherosklerose haben die Makrophagen die Aufgabe, die in der Gefäßwand akkumulierenden Lipoproteine durch Oxidation zu modifizieren¹⁴ und über verschiedene Rezeptoren aufzunehmen.²⁷ Es fehlt ihnen allerdings die Fähigkeit zum effektiven Abbau von Lipoproteinen, weshalb diese nicht beseitigt werden können und im Zytoplasma der Zellen verbleiben. Die schädlichen Antigene können jedoch zusammen mit den MHCII-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert werden. Sobald sich Antigen-spezifische T-Zellen an den Proteinkomplex binden, werden die Makrophagen aktiviert und produzieren Wachstums-regulierende Moleküle und Zytokine.⁷⁸ Im Prozess der Atherosklerose werden dadurch u.a. die Replikation der glatten Muskelzellen und die Gefäßneubildung im Plaque ausgelöst.⁵⁰ Darüber hinaus können sich die Makrophagen innerhalb der Intima vermehren⁵⁰ und so die Entzündungsreaktion aufrechterhalten.

2.3.3 Dendritische Zellen

Zirkulierende Monozyten des Blutes, die in die atherosklerotischen Läsionen gelangen, differenzieren sich dort vorwiegend zu Makrophagen⁹⁰, können sich aber auch zu Dendritischen Zellen weiterentwickeln.²⁷ Letztgenannte Zellen wurden erstmals ein Jahrzehnt nach der Entdeckung der Makrophagen und Schaumzellen in den atherosklerotischen Läsionen beschrieben.⁷ Es stellte sich heraus, dass einige der MHCII-tragenden Zellen, die grundsätzlich für Makrophagen gehalten wurden, in Wirklichkeit vaskuläre Dendritische Zellen sind. Dieser Zelltyp macht in den Plaques 10% der Zellen aus⁸ und findet sich in geringerer Anzahl auch in der Intima von gesunden Arterien, vor allem in den Bereichen, die zur Atherosklerose prädestiniert

sind.⁵⁸ Mit dem Fortschreiten der Erkrankung und der Entstehung von komplizierten Läsionen nimmt die Zahl der Dendritischen Zellen ab.⁷

Vaskuläre Dendritische Zellen ähneln phänotypisch den Langerhans-Zellen der Haut. Sie haben ein sternförmiges Aussehen mit langen, dünnen Fortsätzen, die in verschiedene Richtungen zeigen.⁸ Unreife Dendritische Zellen im Gewebe besitzen ebenfalls die Fähigkeit zur Phagozytose⁴, die aber im Vergleich zu Makrophagen schwächer ausgeprägt ist.⁸⁷ Durch Antigenkontakt wird die Reifung der Zellen induziert, welche mit phänotypischen und funktionellen Veränderungen einhergeht. Es erfolgt ein Wechsel von Antigen-aufnehmenden zu Antigen-präsentierenden Zellen, welche über die afferenten Lymphgefäße in die T-Zell-Areale der drainierenden Lymphknoten migrieren. Hier erfolgt die Selektion und Aktivierung naiver T-Lymphozyten durch die Präsentation des Antigens am MHCII-Molekül.⁴ Zusätzlich werden Zytokine sezerniert, wodurch Dendritische Zellen eine Immunantwort einleiten können.⁵

Die Funktion der Dendritischen Zellen in der Pathogenese der Atherosklerose besteht vor allem in der T-Zell-Aktivierung. Die Zellen sind in den Läsionen unregelmäßig verteilt und hauptsächlich in Zonen der Neovaskularisation und in der Adventitia zu finden. Dabei stehen sie in engem Kontakt zu T-Lymphozyten und haben die Aufgabe, diese durch Zell-Zell-Kontakt anzuregen.⁸ Eine Aktivierung der T-Lymphozyten findet auch in den regionalen Lymphknoten statt, nachdem die Dendritischen Zellen mit ihrem jeweiligen Antigen aus den Plaques dorthin gewandert sind.² Außerdem können vaskuläre Dendritische Zellen Chemokine produzieren, wodurch die Rekrutierung von naiven Lymphozyten in die atherosklerotischen Gefäße beschleunigt werden könnte.²²

2.3.4 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten gehören ebenfalls zur Gruppe der Antigen-präsentierenden Zellen, unterscheiden sich jedoch von den gerade beschriebenen Makrophagen und Dendritischen Zellen in mehreren Punkten. Die Aufnahme des Antigens erfolgt nicht durch Phagozytose, sondern Rezeptor-vermittelt über den spezifischen B-Zell-Rezeptor.⁶⁵ Daraufhin wird das Antigen an das MHCII-Molekül gebunden und in den sekundär lymphatischen Organen den T-Helferzellen präsentiert. Diese sind jedoch nicht mehr naive T-Zellen, sondern erkennen jenes Antigen, mit dem sie selbst aktiviert wurden. Durch diese Zell-Zell-Interaktion wird die Differenzierung der B-Zelle in eine Antikörper-produzierende Plasmazelle eingeleitet.⁵⁹

B-Lymphozyten befinden sich in atherosklerotisch veränderten Gefäßabschnitten vor allem in der Adventitia, können aber auch in den Plaques nachgewiesen werden²⁷ und produzieren spezifische Antikörper gegen oxidiertes LDL und andere Atherosklerose-assoziierte Antigene.⁶⁸ Sie scheinen eine protektive Funktion zu haben, da gezeigt werden konnte, dass in Abwesenheit von B-Zellen die Plauegröße deutlich zunimmt.⁵⁴ Diese schützende Antikörper-vermittelte Immunität wird im Laufe der Atherogenese entwickelt.⁹⁷

2.4. Hämatopoese und hämatopoetische Stammzellen

Alle an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligten Entzündungszellen sowie alle weiteren im Blut befindlichen Zellen haben eine limitierte Lebensspanne und müssen ständig durch neue Zellen ersetzt werden.⁵⁶ Dieser Prozess wird Hämatopoese genannt und ist mit seiner hierarchischen Struktur in Abbildung 2 dargestellt.

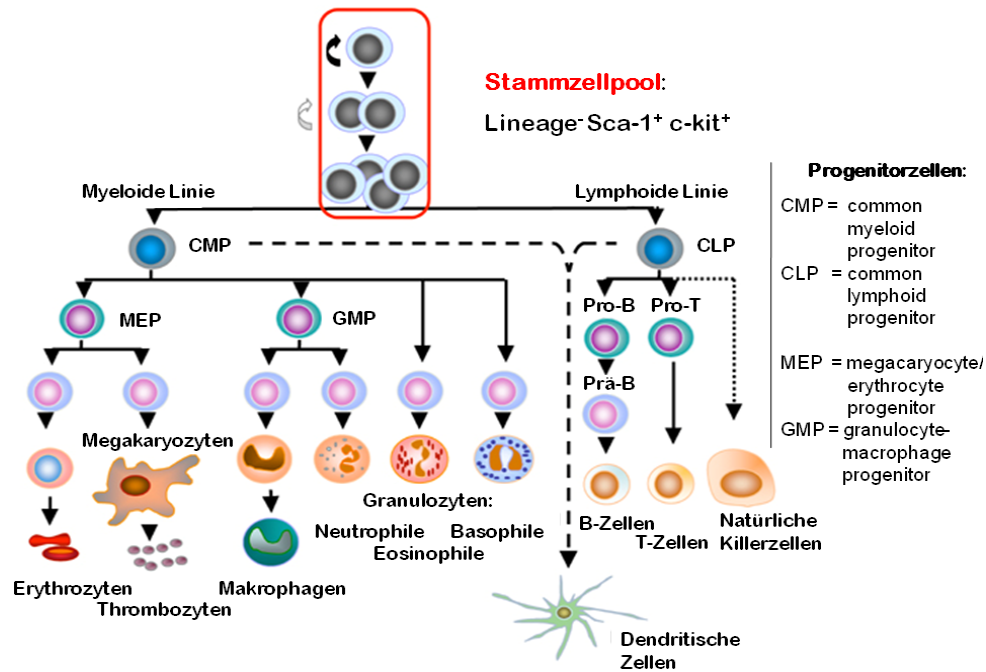


Abbildung 2: Übersicht über die Hämatopoese
(modifiziert nach Larsson, Oncogene, 2005)

Die Neubildung der Blutzellen findet im Knochenmark statt, ausgehend von einem kleinen Pool pluripotenter Stammzellen, der sich in spezifischen Nischen mit geeigneter Mikroumgebung befindet.^{1,49} Diese Zellfraktion macht wahrscheinlich nicht mehr als 0,001 bis 0,01% der Gesamtzellzahl des Knochenmarks aus⁵⁷ und ist dadurch charakterisiert, dass sie sowohl die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Zelllinien als auch das Potenzial zur ständigen Selbsterneuerung besitzt. Außerdem sind die hämatopoetischen Stammzellen in der Lage, nach einer Ganzkörperbestrahlung mit anschließender Stammzell-Transplantation die Blutbildung im Empfängerorganismus wiederherzustellen. Hämatopoetische Stammzellen sind nicht differenziert und tragen somit keine Oberflächenmarker von reifen Blutzellen („Lineage-negativ“). Diese Tatsache sowie die Expression von Stem Cell Antigen 1 (Sca-1) und von Stammzellfaktor-Rezeptor c-kit ermöglichen die Identifizierung dieser Zellen und führten zur Namensgebung KSL-Zellen.⁵⁷

Aus der geringen Anzahl von Stammzellen entstehen zunächst Vorläuferzellen, welche die Fähigkeit haben, entweder Zellen der myeloiden Reihe zu bilden (Common Myeloid Progenitor) oder sich in lymphoide Zellen weiterzuentwickeln

(Common Lymphoid Progenitor) (vgl. Abb. 2). Zu den lymphoiden Zellen gehören B-Zellen, T-Zellen und Natürliche Killerzellen, während man Erythrozyten, Thrombozyten, Makrophagen und Granulozyten zur myeloiden Linie zählt.⁴⁸ Dendritische Zellen können sowohl aus myeloiden als auch aus lymphoiden Vorläuferzellen entstehen.⁴

Neben sesshaften Stammzellen im Knochenmark gibt es eine kleine Population hämatopoetischer Vorläuferzellen, welche die Fähigkeit zur Migration besitzt und im peripheren Blut zu finden ist.³¹ Diese Zellen werden ebenso wie die reifen Leukozyten aus dem Knochenmark in das Blut ausgeschwemmt, verbleiben im Blutkompartiment und rezirkulieren ins Knochenmark oder verlassen das Gefäßsystem und wandern zu den peripheren Organen. Nach einer Verweilzeit von mindestens 36 Stunden begeben sie sich über die Lymphwege zurück ins Knochenmark. Dadurch scheinen HSPCs die Organe immunologisch zu überwachen. Durch Proliferation und Differenzierung in myeloide Immunzellen, insbesondere Dendritische Zellen, stellen sie möglicherweise eine wichtige zelluläre Quelle des angeborenen Immunsystems dar.⁵⁶

3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Der Beitrag der HSPCs zur Pathogenese der Atherosklerose wurde bisher kaum untersucht. Obwohl der Effekt der lokalen Applikation dieser Zellen in Infarktareale in klinischen Studien untersucht wird⁴³, ist nicht bekannt, welche Rolle sie im Prozess der Atherogenese spielen.

Ziel des vorliegenden Projektes ist es, die Rolle von HSPCs im Rahmen immunologischer Prozesse während der Atherogenese im Detail zu erarbeiten. Im Rahmen der Atheroprogression stattfindende immunologische Abläufe und insbesondere eine mögliche Rolle von rekrutierten HSPCs sind bisher weitestgehend unverstanden. Die hier erarbeiteten Erkenntnisse sollen beleuchten, ob lokal rekrutierte HSPCs Ursprung von Immunzellen im atherosklerotischen Plaque sind und damit immunologische Prozesse maßgeblich beeinflussen.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

4.1.1 Die ApoE-Knockout-Maus

Um eine mögliche Beteiligung von HSPCs an der Pathogenese der Atherosklerose zu identifizieren, wurde ein Versuchsplan am Mausmodell der ApoE-defizienten Maus mit genetischem C57/Bl6-Hintergrund entworfen. Das Ausschalten des Genes für Apolipoprotein E induziert eine Hypercholesterinämie, so dass Tiere dieses Stammes atherosklerotische Läsionen entwickeln, die mit denen des Menschen vergleichbar sind.⁷⁰ Um die Atheroprogression zu akzelerieren, erhielten die Versuchstiere ab dem Alter von 4 Wochen ein fett- und cholesterinreiches Futter (Mausfutter 1314 modifiziert als Purina 5015, Altromin, Lage, Deutschland).

Die Mäuse, die für die folgenden Experimente herangezogen wurden, erhielten für minimal 8 und maximal 16 Wochen eine solche Nahrung.

4.1.2 Die MHCII-eGFP-Maus

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Migration der HSPCs in die atherosklerotischen Plaques und die dortige Differenzierung zu Antigen-präsentierenden Zellen untersucht. Dazu wurden zusätzlich zu den ApoE-Knockout-Mäusen auch Tiere des MHCII-eGFP-Stammes benötigt. Diese Mauslinie zeichnet sich dadurch aus, dass in der Keimbahn das Gen für MHCII durch ein MHCII-Gen ersetzt wurde, an dessen C-Terminus ein grün fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein, eGFP) gekoppelt wurde.⁹ Da Antigen-präsentierende Zellen, insbesondere Monozyten und Dendritische Zellen, MHCII exprimieren, fluoreszieren sie grün und können so detektiert werden. Die MHCII-eGFP-Knockin-Tiere besitzen ebenfalls den C57/Bl6-Hintergrund und unterscheiden sich immunologisch weder von C57/Bl6-Wildtyptieren noch von den hier verwendeten ApoE-defizienten Tieren.⁹

4.1.3 Die β -Aktin-eGFP-Maus

Die β -Aktin-eGFP-Maus ist eine transgene Maus, bei der das grün fluoreszierende Protein unter dem β -Aktin-Promotor und dem Cytomegalievirus-Enhancer in allen Geweben mit Ausnahme von Erythrozyten und Haaren produziert wird. Genetischer Hintergrund ist auch hier C57/Bl6; Zellen unterscheiden sich abgesehen von der eGFP-Expression nicht vom Wildtyp.⁶⁶ Diese Mauslinie wurde zur Kontrolle der Versuche zur Migration der HSPCs und zu Untersuchungen der Proliferation dieser Zellen herangezogen.

4.1.4 Haltungsbedingungen

Die Versuchstiere stammten aus eigener Zucht und befanden sich in einer spezifisch pathogenfreien Haltung, wobei sich bis zu fünf Mäuse einen Käfig vom Typ III erhöht (Tecniplast, Hohenpreißenberg, Deutschland) teilten. Die Käfige wurden mit Lignocell-Select Pappelerstreu (Ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) versehen, welches einmal wöchentlich gewechselt wurde. Als Nestbaumaterial und Unterschlupf dienten keimfreier Zellstoff und Röhrchen aus Pappe. Alle Tiere erhielten Wasser und mit Ausnahme der ApoE-Knockout-Versuchstiere R/M-Haltungsfutter (Ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) zur freien Verfügung. Die ApoE-Knockout-Mäuse erhielten stattdessen wie oben beschrieben fett- und cholesterinreiches Futter. Im Tierstall betrug die Temperatur konstant 21-24°. Eine Beleuchtungsanlage mit Leuchtstofflampen vom Typ Lumilux warm white 58W/830 (Osram, München, Deutschland) sorgte per Zeitschaltuhr für einen alternierenden Hell-Dunkel-Rhythmus, wobei die Dauer jeweils 12 Stunden betrug.

4.2. Nachweis von HSPCs aus Blut und atherosklerotisch verändertem Aortengewebe von ApoE-Knockout-Mäusen

4.2.1 Colony-Forming-Unit-Assay

Die Anzucht von Zellen im Methocult-Medium stellt einen Colony Forming Unit (CFU) Assay dar, bei dem die klonale Nachkommenschaft von Vorläuferzellen in einem speziellen Medium (Methocult Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) kultiviert werden kann, wodurch indirekt die Existenz der Stamm- oder Progenitorzelle nachgewiesen wird. Das Methocult-Medium bietet hämatopoetischen Vorläuferzellen einen Wachstumsvorteil, wohingegen reife Blutzellen innerhalb weniger Tage absterben. Vorläuferzellen dagegen proliferieren im Medium, bilden Kolonien und können unter dem Mikroskop detektiert werden.

Für die Experimente wurden ApoE-Knockout-Mäuse verwendet, die für eine Dauer von 8, 12 und 16 Wochen cholesterinreiches Futter erhielten. Nachdem die Tiere mit Isofluran narkotisiert wurden, erfolgte die intrakardiale Blutentnahme in heparinisierte Röhrchen. Nach der anschließenden Tötung der Mäuse wurde die Aorta entnommen. Das Blut wurde zentrifugiert, der Plasma-Überstand verworfen und der Blutkuchen in Ammoniumchloridlösung resuspendiert, um die Erythrozyten zu lysieren. In anschließenden Waschschrritten wurden die lysierten Erythrozyten von myeloiden Zellen getrennt und 300 000 myeloide Zellen in das Methocult-Medium gegeben. Um eine Einzelzellsuspension des Aortengewebes zu erhalten, wurde die entnommene Aorta zunächst zerkleinert und mit einem Enzymcocktail bestehend aus Collagenase I und XI, Hyaluronidase I-s und DNase I verdaut. Anschließend wurden ebenfalls 300 000 isolierte Aortenzellen im Methocult-Medium kultiviert.

Für mehr Details siehe Mouse Colony Forming Cell (CFC) Assays Using Methocult, Technical Manual Version 3.1.1, Stemcell Technologies, 2005.

4.2.2 Immunfluoreszenz-Färbungen der koloniebildenden Zellen

Um Rückschluss auf Merkmale und Identität zugrunde liegender Progenitorzellen ziehen zu können, erfolgte die Charakterisierung der Kolonien mittels Immunfluoreszenzfärbung der Zellen.

Die Charakterisierung der CFUs erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung, wobei folgende Antigene angefärbt wurden:

Myeloide Reihe	CD45	Marker für Leukozyten
	MHCII	Marker für Antigen-präsentierende Zellen: Dendritische Zellen, B-Lymphozyten, Makrophagen
	CD11c	Marker für Dendritische Zellen
	CD11b	Marker für Monozyten und Makrophagen
	Ly-6G	Marker für Granulozyten
Lymphoide Reihe	B220	Marker für B-Lymphozyten
	CD3	Marker für T-Lymphozyten

Zur Charakterisierung wurden die koloniebildenden Zellen aus Aorta und Blut 14 Tage nach der Aussaat aus dem Zellmedium entnommen, indem sie aus den einzelnen Löchern der 6-Loch-Zellkulturplatte in eine Pipette aufgezogen und in jeweils ein 50ml-Reaktionsgefäß gefüllt wurden. Nach mehrmaligem Nachspülen der Löcher mit 4°C kaltem Waschpuffer (PBS = Phosphate Buffered Saline) wurden die Reaktionsgefäße mit diesem Puffer aufgefüllt und für eine Stunde bei 4°C belassen. Durch die Inkubation in der Kälte löste sich das visköse Zellmedium von den Zellen und verursachte somit keine Artefakte bei der Färbung.

Daraufhin wurden die Zellen zweimal mittels Zentrifugation für 5 Minuten bei 400 g und Resuspension in 4°C kaltem PBS gewaschen. Alle weiteren Waschschriffe während der Färbung erfolgten ebenfalls mit kaltem PBS. Um unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern, wurde dem Waschpuffer 1% Bovines Serumalbumin (BSA) zugesetzt.

Mithilfe der Neubauer-Zählkammer wurden die gewonnenen Zellen mit einem Puffer aus PBS und 1% BSA auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Daraufhin wurde die Zellsuspension auf 1.5ml-Reaktionsgefäße verteilt und mit dem Färbeprotokoll begonnen.

Da die Antikörper, die für die Färbungen verwendet wurden, alle der IgG-Klasse entstammen, musste vor der Zugabe des Primärantiköpers ein Antikörper gegen den Fc-Rezeptor zur Suspension gegeben werden, der die Fc-Bindungsstellen der Leukozyten blockiert. Ansonsten könnte der Fc-Teil des Primärantiköpers von vielen Leukozyten erkannt werden und eine unspezifische Bindung unabhängig vom gesuchten Antigen erfolgen. Nach dem ersten Waschschriff wurde der Primärantikörper in die Suspension pipettiert, der sich gegen das gewünschte Antigen richtet. Um die spezifische Bindung des Antiköpers zu überprüfen, wurde parallel eine Isotyp-Kontrolle durchgeführt. Danach erfolgten die Zugabe des Sekundärantiköpers und anschließend die Fixation der Zellen mittels Paraformaldehyd-Lösung (1% Paraformaldehyd in destilliertem Wasser).

Zur genaueren Charakterisierung der koloniebildenden Zellen wurden auch Doppelfärbungen gemacht, bei denen jeweils zwei Primär- und Sekundärantikörper gleichzeitig in die Suspension gegeben wurden. Dabei war darauf zu achten, dass

alle Antikörper aus unterschiedlichen Spezies stammten, damit es nicht zu unerwünschten Kreuzreaktionen kommen konnte.

Zur besseren Detektion der Zellen unter dem Mikroskop wurde bei manchen Färbungen das Zytoskelett mit Phalloidin sichtbar gemacht. Phalloidin wird aus dem grünen Knollenblätterpilz gewonnen und heftet sich an polymerisiertes, filamentöses Aktin. Da das Phalloidin nicht zellgängig ist, mussten die Zellen zunächst mit einer Triton-X-100-Lösung (0.1% Triton-X-100 in Waschpuffer) permeabilisiert werden, bevor der Farbstoff zugegeben werden konnte. Bei den Färbungen koloniebildender Zellen wurde sowohl rot als auch grün fluoreszierendes Phalloidin verwendet, je nach Fluoreszenz des jeweiligen Sekundärantikörpers.

Als letztes wurden die Zellkerne mit 4',6-diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) gefärbt und ein letztes Mal gewaschen, woraufhin die Suspension auf beschichtete 12-Loch-Objektträger gegeben wurde. Die Objektträger waren mit 0.01% Poly-L-Lysin oder 0.1% Gelatine beschichtet worden, um zu gewährleisten, dass die Zellen darauf haften bleiben. Die Objektträger wurden bei 37°C getrocknet und anschließend mit Mounting Medium und einem Deckgläschen versehen.

Das detaillierte Färbeprotokoll unter Angabe der Konzentrationen der verwendeten Reagenzien und der Inkubationszeiten findet sich im Anhang als Färbeprotokoll 1. Eine genaue Bezeichnung der verwendeten Materialien und Antikörper ist ebenfalls im Anhang aufgelistet.

Um die Aussagekraft der Immunfluoreszenzfärbungen zu überprüfen, wurden Positivkontrollen angefertigt. Die Färbungen von CD11b (CD = Cluster of Differentiation Molecule) und Ly-6G (Lymphocyte Antigen 6 Complex Locus G) wurden anhand von Zellen einer Makrophagen-Zelllinie (sog. ANA-Zellen) überprüft, wohingegen für die Marker CD11c und MHCII Dendritische Zellen aus murinem Knochenmark verwandt wurden. Die Färbungen von B220 und CD3 wurden nicht durch Zellsuspensionen überprüft, sondern an Lymphknoten- und Milz-Schnitten getestet.

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop DBMR (Leica, Wetzlar, Deutschland) betrachtet und mit Hilfe einer Digitalkamera (AxioCam, Zeiss, Göttingen, Deutschland) abfotografiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software Axiovision 3.1 (Zeiss, Göttingen, Deutschland).

4.2.3 Durchflusszytometrische Charakterisierung der koloniebildenden Zellen

Die koloniebildenden Zellen aus Blut und Aorta wurden nicht nur durch Immunfluoreszenzfärbungen analysiert, sondern auch mit dem Durchflusszytometer (FACS = Fluorescence Antibody Cell Sorter) charakterisiert. Hierbei wurden die Zellen ebenfalls mit fluoreszierenden Antikörpern markiert und danach die Expression von Oberflächenmarkern analysiert.

Die koloniebildenden Zellen, die charakterisiert werden sollten, wurden in gleicher Weise wie für die Immunfluoreszenzfärbungen vorbereitet. Nach einstündigem Stehenlassen der Zellsuspension im Kühlschrank, einigen Waschschrritten und der Zugabe des Fc-Rezeptor-Blockes wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Daraufhin wurden die CFUs auf mehrere FACS-Röhrchen aufgeteilt, wobei in jedes Reaktionsgefäß 50 μ l Zellsuspension gegeben wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe von verschiedenen Antikörper-Kombinationen, die der folgenden Tabelle 1 entnommen werden können. Die mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten Antikörper liegen dabei jeweils in einer Konzentration von 0.5 mg/ml vor und die mit den Fluoreszenzfarbstoffen Phycoerythrin (PE), Phycoerythrin-Cy5 (PECy5) und Allophycocyanin (APC) versehenen Immunglobuline haben jeweils eine Konzentration von 0.2 mg/ml (mit Ausnahme des PE-Rat-IgG_{2b}-Antikörpers, der auf 0.1 mg/ml konzentriert ist). Alle verwendeten Antikörper und Materialien sind im Anhang genauer bezeichnet.

Die FITC-markierten Antikörper wurden vor der Zugabe zu den CFUs im Verhältnis 1:50 verdünnt, was eine Endkonzentration von 10 μ g/ml ergibt. Die mit den Fluoreszenzfarbstoffen PE, PECy5 und APC konjugierten Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:25 verwendet und hatten somit eine Endkonzentration von 8 μ g/ml (Ausnahme: Die Isotyp-Kontrolle PE-Rat-IgG_{2b} hatte am Ende eine Konzentration von 4 μ g/ml).

Tabelle 1: Kombinationen der Antikörper für die FACS-Färbungen

Nummer	Antikörper-Mix
1)	FITC-MHCII, PE-CD11c, PE-Cy5-CD45 und APC-CD11b → Dendritische Zellen
2)	FITC-CD11b, PE-CD115 und PE-Cy5-F4/80 → Monozyten/ Makrophagen
3)	FITC-CD19, PE-CD8a, PE-Cy5-CD45R (B220) und APC-CD4 → B- und T-Lymphozyten
4)	FITC-CD106, PE-CD62E, PE-Cy5-CD34 und APC-CD31 → Endothelzellen und hämatopoetische Vorläuferzellen
5)	FITC-Rat-IgG _{2b} , PE-Rat-IgG _{2b} , Pe-Cy5-Rat-IgG _{2a} und APC-CD45.1 → Isotyp-Kontrollen

Nach einer Inkubationszeit von 25-30 Minuten im Kühlschrank wurden die Zellen mittels Zentrifugation und Resuspension gewaschen, woraufhin die sofortige Analyse am Durchflusszytometer FACSCalibur mit der Software Cellquest 3.3 (beides BD, Heidelberg, Deutschland) erfolgte.

Bei der Auswertung der Proben ging es vornehmlich darum, herauszufinden, welche Oberflächenmoleküle von den kultivierten Zellen des CFU Assays exprimiert wurden. Daneben erfolgte auch eine relative Quantifizierung der Expression anhand eines Vergleichs der Signalstärke der einzelnen Marker. Zunächst wurde anhand der Intensität der Isotyp-Kontrollen kalibriert, ab wann der Nachweis eines Antigens als positiv anzusehen war. Anschließend erfolgte die Analyse der Antikörper-markierten Zellen aus dem Blut anhand des Vorwärtsstreulichts (Forward Scatter, FSC), das die Größe der Zelle widerspiegelt, und des Seitwärtsstreulichts (Side Scatter, SSC), welches proportional zur Granularität der Zelle ist. Daraufhin wurde eine Gate um Zellpopulationen gesetzt, die aufgrund der FSC- und SSC-Werte als leukozytäre Zellen identifiziert wurden. Analog zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen wurde zunächst die Expressionsstärke von CD45 gegenüber FSC aufgetragen, um nachzuweisen, dass es sich bei den Zellen um Leukozyten handelt. Anschließend

wurde die Intensität der Fluoreszenz weiterer Oberflächenmarker der Leukozytensubpopulationen (siehe Tabelle 1) gemessen und im Diagramm ebenfalls gegenüber FSC dargestellt. Ein besonderes Interesse galt bei diesen Versuchen dem Nachweis von Dendritischen Zellen, so dass ein weiteres Gate um die CD11c-positiven Zellen gesetzt wurde und daraufhin die Koexpression von CD11c und MHCII bzw. CD11c und CD11b analysiert wurde.

Für die Zellen der CFU Assays aus Aortengewebe wurde analog verfahren, mit dem Unterschied, dass die Zellzahl hier viel geringer war. Deshalb wurde die Probe zunächst ohne das Setzen eines Gates auf das Vorhandensein der Oberflächenantigene untersucht, um mehr Zellen für die Analyse zur Verfügung zu haben. Anschließend wurden wie oben beschrieben die Gates gesetzt, um das Ergebnis zu verifizieren.

4.3. Untersuchung von Migration und Differenzierung der HSPCs im atherosklerotisch veränderten Organismus

4.3.1 Versuchsaufbau

Um die Migration der HSPCs zu verfolgen, wurden diese aus dem Knochenmark von Mäusen des MHCII-eGFP-Stammes isoliert (siehe unten). Die murinen hämatopoetischen Vorläuferzellen sind durch eine Expression von c-kit und Stem Cell Antigen 1 (Sca-1) sowie durch ein Fehlen weiterer linienspezifischer Marker gekennzeichnet, weshalb sie auch KSL-Zellen genannt werden (c-kit+, Sca-1+, lin-Zellpopulation). Nachdem nach diesen Kriterien hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark selektiert wurden, erfolgte mittels Schwanzveneninjektion die Applikation von jeweils 5000 dieser Zellen in ApoE-defiziente-Mäuse, die bereits für 8, 12 oder 16 Wochen Cholesterinfutter erhalten hatten. 2, 6 oder 14 Tage nach Injektion der KSL-Zellen wurden die Tiere geopfert und der Aortenbogen, sowie Milz und einige Lymphknoten entnommen. Es ergaben sich somit folgende Gruppen:

Tabelle 2: Gruppen für Migrationsversuche

Dauer der Cholesterinfütterung bis zur Injektion der KSL-Zellen	Zeit bis zur Opferung nach der Injektion der KSL-Zellen	Gruppengröße (n)
8 Wochen	2 Tage	3
8 Wochen	6 Tage	3
8 Wochen	14 Tage	3
12 Wochen	2 Tage	3
12 Wochen	6 Tage	3
12 Wochen	14 Tage	3
16 Wochen	2 Tage	3
16 Wochen	6 Tage	3
16 Wochen	14 Tage	4

Die entnommenen Organe wurden über Nacht in einer Lösung aus Paraformaldehyd, Lysin, Natriumperiodat und Phosphatpuffer (siehe Punkt 4.3.3) belassen, damit das eGFP nicht aus dem Gewebe entweicht. Daraufhin wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von 5 μm angefertigt, die zur Immunfluoreszenzfärbung verwendet und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet wurden. Dabei wurde das grün fluoreszierende Protein sowohl alleine als auch zusammen mit CD11b, CD11c und B220 angefärbt. Desweiteren wurden die Schnitte auch auf das gleichzeitige Vorhandensein von eGFP und dem Proliferationsmarker ki-67 untersucht, was der Analyse einer proliferativen Tätigkeit der eingewanderten Zellen im Plaque diene (vgl. Punkt 4.3.9).

Um einen Eindruck von Zellen und Arterienwand in situ zu erhalten, wurde auch eine 2-Photonen-Mikroskopie durchgeführt, indem der Situs der Maus von allen Organen mit Ausnahme der Aorta befreit wurde und das tote Tier auf dem Rücken liegend unter das Mikroskop (Ti:Sa Laser, Mai Tai, Spectra Physics, Darmstadt, Deutschland) gelegt wurde. Aqua ad injectabilia wurde als Immersionsmaterial verwendet, wobei aus dem Rücken und den Flanken der Maus eine Art Bassin geformt wurde, in welches die Lösung gegeben wurde. Anschließend wurden die atherosklerotischen Plaques der Aorta abdominalis im Bereich der Abgänge der Nierenarterien unter dem 2-Photonen-Mikroskop betrachtet (vgl. Punkt 4.3.6). Es erfolgte die Aufnahme dieser Plaques mit der Software Inspector Pro (LaVision Bio Tec, Bielefeld, Deutschland) und die anschließende Bearbeitung der Bilder mit Volocity (Improvision, Lexington, MA, USA).

Um sicherzustellen, dass die grün fluoreszierenden Signale ausschließlich von eGFP-exprimierenden Zellen stammten, wurden zusätzlich Kontrollen durchgeführt. Als positive Kontrollen wurden dabei 16 Wochen gefütterten ApoE-Knockout-Tieren KSL-Zellen von β -Aktin-eGFP-Spendertieren injiziert und anschließend Schnitte von Aorta, Lymphknoten und Milz angefertigt, die auf eGFP untersucht wurden. Als Negativkontrollen wurden Schnitte von Mäusen verwendet, die keine Zellinjektion erhalten hatten. Außerdem wurden bei jeder Färbung Isotyp-Kontrollen angefertigt.

4.3.2 Gewinnung der HSPCs aus dem Knochenmark

Zur Isolierung der HSPCs aus dem Knochenmark wurden Femur und Tibia von je zwei Spendertieren pro Empfängertier entnommen. Die MHCII-eGFP-Spendertiere wurden dazu mittels Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die Knochen wurden von Fell, Haut und Muskulatur befreit und in 4°C-kühle sterile PBS-Lösung gelegt.

Danach wurde ein Puffer aus 49 ml PBS, 1 ml fetalem Kälberserum (FCS = Fetal Calf Serum; Konzentration: 2%) und 200 µl Ethylendiamintetraacetat (EDTA; Konzentration: 2 mmol/l) angesetzt. Um das Knochenmark zu erhalten, wurden die Epiphysen von Femur und Tibia mit einem Skalpell entfernt und die Knochen mit Puffer gespült. Dabei wurde mit Hilfe einer Kanüle (22G für Femur, 26G für Tibia) das Knochenmark in 1.5ml-Reaktionsgefäße gepresst und anschließend über ein 70µm-Zellsieb in ein 50ml-Reaktionsgefäß gegeben, um die Suspension von zellfremdem Material zu befreien. Als nächstes erfolgte die Lyse der Erythrozyten durch Zugabe von 15 ml Ammoniumchlorid-Lösung (0.8%). Nach einer Inkubationszeit von 8 Minuten bei 4°C wurde die Suspension durch Zugabe von PBS und Zentrifugation bei 1600 rpm für drei Minuten gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 1 ml Puffer resuspendiert und die Zellsuspension daraufhin in ein 15ml-Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt und die Konzentration der Suspension durch Zugabe von Puffer auf 1×10^8 /ml eingestellt.

Vor der nachfolgenden Markierung der Zellen mit dem Lineage Antibody Cocktail wurden 50 µl Rattenserum pro ml Zellsuspension dazugegeben, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Danach erfolgte die „Lineage-Markierung“ durch Zugabe von je 10 µl Biotin-Antibody Cocktail (Lineage cell depletion kit, mouse, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) pro 10 000 000 Zellen. Dieser Cocktail bestand aus Antikörpern gegen CD5, CD11b, CD45R, Ly-6G/G, Ter117 und 7-4-Biotin und markierte somit alle differenzierten Blutzellen. Die nicht differenzierten Stamm- und Progenitorzellen blieben frei von Antikörpern. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 4°C wurde die Zellsuspension durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 1600 rpm und Resuspension in

300 µl Puffer gewaschen. Die Suspension wurde anschließend in ein 1.5ml-Reaktionsgefäß gegeben und die Färbung für die Zellsortierung durchgeführt.

Zum Sichtbarmachen der differenzierten Zellen wurde der Antikörper Streptavidin-PE (0.2 mg/ml, eBioscience, San Diego, CA, USA), welcher an die Antikörper des Biotin-Antibody Cocktails bindet, in einer Verdünnung von 1:800 zugegeben, was eine Endkonzentration von 0.25 µg/ml ergibt. Um die KSL-Zellen zu markieren wurden im selben Schritt die Antikörper Sca-1-PECy5.5 (0.2 mg/ml, eBioscience, San Diego, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:78 und CD117-APC (0.2 mg/ml, eBioscience, San Diego, CA, USA) in einer Konzentration von 1:40 zugesetzt. Dies ergibt Endkonzentrationen von 2.5 µg/ml für Sca-1 und 5 µg/ml für CD117. Dabei ist CD117 gleichbedeutend mit dem Oberflächenmolekül c-kit. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C wurde das Reaktionsgefäß mit Puffer aufgefüllt und 3 Minuten lang bei 4500 rpm zentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt und die Zellen danach in 1 ml Puffer resuspendiert. Das Reaktionsgefäß wurde nun bis zur Zellsortierung auf Eis belassen.

Vor dem Sort wurden die Zellen mit Hilfe einer Spritze über einen 30µm-Zellfilter in ein Gefäß überführt, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Danach erfolgte die Zugabe von Propidiumiodid in einer Konzentration von 2 µg/ml zur Markierung der toten Zellen.

Anschließend erfolgte die Zellsortierung nach dem Expressionsprofil für HSPCs. Die Zellen sollten demnach negativ für PE, eGFP und Propidiumiodid sein, was bedeutet, dass es sich um nichtdifferenzierte, lebende Zellen handelte, die noch kein eGFP exprimierten. Gleichzeitig sollten diese Zellen ein positives Signal für PECy5.5 und APC aufweisen und demnach die Oberflächenmoleküle Sca-1 und c-kit besitzen.

Die selektierten Zellen wurden in einem 15ml-Reaktionsgefäß aufgefangen, das 2 ml FCS in einer Konzentration von 2% enthielt. Nachdem jeweils 5000 Zellen pro Empfängertier isoliert wurden, wurde das Reaktionsgefäß mit Puffer aufgefüllt und 3 Minuten lang bei 1600 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 150 µl PBS pro 5000 Zellen aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf 1.5ml-Reaktionsgefäße verteilt, so dass jedes Reaktionsgefäß 150 µl Suspension mit 5000 Zellen enthielt, die anschließend in die Schwanzvenen der ApoE-Knockout-Empfängertiere injiziert wurde.

4.3.3 Organentnahme und Anfertigung von Kryoschnitten

Nach 2, 6 oder 14 Tagen wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert und anschließend mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Tiere wurden danach jeweils in Rückenlage unter einer Operationslupe positioniert. Nach dem Aufschneiden von Bauch- und Brustraum und der Durchtrennung der Vena cava inferior wurde das Gefäßsystem durch kardiale Punktion mit isotonischer Natriumchloridlösung gespült, um das Blut zu entfernen. Daraufhin wurden der Aortenbogen mit den Abgängen, die Milz und einige Lymphknoten entnommen und in Biopsiekassetten gegeben.

Damit das von den MHCII-exprimierenden Zellen hergestellte eGFP nicht aus dem Zytoplasma entweichen konnte, wurde eine Fixationslösung hergestellt, in der die entnommenen Organe über Nacht auf einem Orbitalshaker bei 4°C gelagert wurden.

Dazu wurden 7.1 g Dinatriumhydrogenphosphat („Dibasic“) und 7.8 g Natriumdihydrogenphosphat („Monobasic“) in jeweils 500 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend ein Phosphatpuffer aus drei Teilen „Dibasic“ und einem Teil „Monobasic“ hergestellt. Daraufhin erfolgte die Zubereitung der Fixationslösung, wobei 1.19 g Natriumperodat in 336 ml des Phosphatpuffers gelöst und anschließend 140 ml Paraformaldehyd und 12 ml Lysinpuffer dazugegeben wurden. Der Lysinpuffer besteht aus 9.13 g L-Lysin-Monohydrochlorid gelöst in 100 ml „Dibasic“.

Am darauffolgenden Tag wurden die Organe durch eine Sucrosereihe mit 10-, 20- und 30-prozentiger Sucroslösung geführt. Sucrose dient als Gefrierschutzmittel und verhindert die Bildung von Eiskristallen, so dass die Organmorphologie während des Einbettens und der Herstellung der Kryoschnitte erhalten bleibt. Die Organe wurden dazu aus den Biopsiekassetten entnommen und dreimal mit jeweils 3 ml Phosphatpuffer für 5 Minuten in FACS-Röhrchen gewaschen. Nach dem Lösen von 10, 20 bzw. 30 g Sucrose in jeweils 100 ml Phosphatpuffer wurden die Organe als erstes in jeweils 3 ml 10-prozentige Sucroslösung gegeben, bis die Gewebe auf den Boden der FACS-Röhrchen gesunken waren. Danach wurde mit der 20- und 30-prozentigen Lösung genauso verfahren.

Anschließend erfolgte das Einbetten der Organe in Gewebekleber (O.C.T. Compound, Sakura Finetek, Tokyo, Japan). Bis zum Anfertigen der Schnitte wurden die Gewebe bei -80°C aufbewahrt.

Für die anschließende eGFP-Färbung wurden von den eingebetteten Organen am Kryotom CM1850 von Leica (Wetzlar, Deutschland) 5 µm dünne Schnitte angefertigt, von denen jeweils 3 Stück auf einen Objektträger gebracht wurden. Die Anzahl der so hergestellten Objektträger belief sich für den Aortenbogen auf 20 Stück und für Milz und Lymphknoten jeweils auf 10 Stück pro Tier. Für die Immunfluoreszenzfärbungen der Aortenbögen wurden anschließend die Schnitte mit den Nummern 2, 5, 8, 11, 14, 17 und 20 verwendet, so dass zwischen den einzelnen Schnitten ein Abstand von mindestens 30 µm bestand.

4.3.4 Detektion der grün fluoreszierenden MHCII-positiven Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung der Kryoschnitte

Für jedes einzelne Versuchstier, das KSL-Zellen einer MHCII-eGFP-positiven Spendermaus erhalten hatte, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung des Antigens eGFP angefertigt, um zu sehen, ob injizierte KSL-Zellen in die atherosklerotischen Läsionen migriert waren und sich zu MHCII-positiven Zellen differenziert hatten. Verwendet wurden jeweils sieben Objektträger mit Gefrierschnitten der Aorta (Nr. 2, 5, 8, 11, 14, 17 und 20) und ein bis zwei Objektträger mit Kryoschnitten von Lymphknoten oder Milz, da MHCII-positiv Zellen in ihrer Eigenschaft als Antigen-präsentierende Zellen am ehesten dort zu vermuten waren. Als Positivkontrolle dienten Schnitte von Lymphknoten oder Milz der MHCII-eGFP-Spendermäuse und als Negativkontrolle Schnitte derselben Gewebe eines C57/Bl6-Wildtyp-Tieres. Bei jeder Färbung wurden zugleich Isotyp-Kontrollen angefertigt.

Zunächst wurden die jeweils benötigten Objektträger mit einem Fettstift umrandet, damit die verwendeten Lösungen am Ort der Gefrierschnitte blieben und nicht vom Objektträger liefen. Danach erfolgte die Fixierung der Präparate mit 4-prozentiger Paraformaldehydlösung. Die Objektträger wurden mit einem Waschpuffer bestehend aus 1 ml Tween in 1000 ml PBS gewaschen und anschließend für 20 Minuten in eine

2-prozentige Glycinlösung (1 g Glycin in 50 ml PBS) gestellt, um die Reste des Paraformaldehyds zu entfernen. Da das eGFP sich im Zytoplasma der Zellen befand, musste die Zellmembran mit 0.2-prozentiger Triton-X-100-Lösung (gelöst in PBS) durchlässig gemacht werden. Daraufhin erfolgte ein Schritt zur Verhinderung der unspezifischen Antikörperbindung, wobei BSA in einer Konzentration von 3% verwendet wurde. Nach dreimaligem Waschen mit oben beschriebenem Puffer wurden der Primärantikörper bzw. die Isotyp-Kontrolle zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde erfolgte ein Waschschrift zur Entfernung ungebundener Immunglobuline, wonach der Sekundärantikörper auf die Schnitte pipettiert wurde. Nach einer weiteren einstündigen Inkubationszeit erfolgte nach Waschschriften die Kernanfärbung. Dazu behandelte man die Schnitte eine Minute lang mit DAPI (5 mg/ml, Roth, Karlsruhe, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:1500 (ergibt eine Konzentration von 3 µg/ml). Nach einem letzten Waschschrift wurden die Objektträger mit Mounting Medium betropft und mit einem Deckgläschen versehen.

Das detaillierte Protokoll mit Angaben zu den Konzentrationen der eingesetzten Substanzen und aller Inkubationszeiten findet sich im Anhang als Färbeprotokoll 2.

4.3.5 Vergleich der Anzahl der eGFP-positiven Zellen zwischen den einzelnen Gruppen

Anschließend wurde in den so angefertigten Immunfluoreszenzfärbungen die absolute Zahl eGFP-positiver Zellen quantifiziert. Dabei wurden in den einzelnen Schnitten der Aorten die eGFP-positiven Zellen in Regionen des atherosklerotischen Plaques sowie der Adventitia gezählt. Pro Maus wurden jeweils sieben Schnitte angefertigt und ausgezählt und durch Aufsummierung die Anzahl der eGFP-positiven Zellen pro Tier ermittelt. In einem weiteren Schritt erfolgte die Berechnung der jeweiligen Gesamtplaquefläche unter Zuhilfenahme der Software Cap Image (Ingenieurbüro Dr. Zeintl, Heidelberg). Nun wurde die Anzahl der eGFP-positiven Zellen im Plaque auf die ermittelte Plaquefläche bezogen, um zu untersuchen, ob Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bestehen. Dagegen wurde im Bereich der Adventitia ausschließlich die absolute Zahl der Zellen analysiert, da

keine relevanten Schwankungen in der Fläche der Adventitia in den zu untersuchten Gruppen zu erwarten war.

Mithilfe der Immunfluoreszenzfärbungen der lymphatischen Gewebe konnte überprüft werden, ob die Empfängertiere eGFP-positive Zellen enthielten, da ein grün fluoreszierendes Signal für das Vorhandensein von MHCII steht und MHCII-positive Zellen in lymphatische Gewebe einwandern. Die einzelnen Gruppen wurden hierbei bezüglich der Anzahl der detektierten Zellen nicht miteinander verglichen.

4.3.6 Detektion der grün fluoreszierenden MHCII-positiven Zellen mittels 2-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie

Als weitere Methode zum Nachweis der Migration und Differenzierung der injizierten Stammzellen diente die 2-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie. Anders als bei der gewöhnlichen Fluoreszenzmikroskopie, bei der die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes durch ein Photon zustande kommt, treffen bei der 2-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie zwei langwelligere, energieärmere Photonen gleichzeitig auf dem Fluorochrom auf und erzeugen auf diese Weise ein höheres Energieniveau. Auf diese Weise können nicht nur Eindringtiefen bis zu 1 mm erreicht werden, sondern die Technik garantiert auch eine ausschließliche Signalentstehung in der fokussierten Ebene, in der Photonen gleichzeitig auf Fluorochrome auftreffen. Dies lässt eine dreidimensionale Analyse der untersuchten Proben zu.

Damit zwei Photonen nahezu gleichzeitig an einem Ort ankommen, ist ein Laser nötig, der die Lichtquanten pulsartig mit einer Frequenz von 100 MHz und einer Dauer von 100 Femtosekunden aussendet. Dieser Laser fährt das Präparat ab, wobei der Strahl mit Hilfe von Spiegeln ständig abgelenkt wird, so dass sich der Fokuspunkt rasterartig durch das Gewebe bewegt. Alle dabei entstehenden Fluoreszenzsignale werden durch ein Objektiv aufgefangen und mittels dichroitischen Spiegeln in die verschiedenen Farben aufgeteilt, die von Photomultipliern detektiert und in elektrische Signale umgewandelt werden. Erst im nachgeschalteten Computer werden mit einer speziellen Software die einzelnen Daten zu einem vollständigen dreidimensionalen Bild zusammengesetzt.

Für die 2-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie der atherosklerotischen Plaques wurde, nachdem alle für die Histologie benötigten Organe entnommen wurden, die Bauchorta der ApoE-Knockout-Tiere freipräpariert. Die verbleibende Pleura- und Peritonealhöhle wurde mit Aqua ad injectabilia befüllt, das am Objektiv des 2-Photonen-Fluoreszenzmikroskops als Immersionsmedium diente. Anschließend wurde die Aorta thoracalis und abdominalis dargestellt und nach grün fluoreszierenden Zellen abgesucht. Kollagenfasern zeigen bei der gewählten Anregung von 800 nm dabei eine Eigenfluoreszenz, die sog. Second Harmonic, die eine Darstellung der Gefäßwand ermöglicht. Zusätzlich wurden verschiedene Lymphknoten exemplarisch auf das Vorhandensein eGFP-positiver Zellen untersucht.

Die Rohdaten wurden mit der Software Inspector Pro (LaVision Bio Tec, Bielefeld, Deutschland) aufgenommen und anschließend mit Volocity (Improvision, Lexington, MA, USA) bearbeitet.

4.3.7 Charakterisierung der grün fluoreszierenden Zellen durch Fluoreszenzfärbungen von eGFP und CD11b bzw. CD11c

Die im Tiermodell verwendeten KSL-Zellen sind aus transgenen MHCII-eGFP-Mäusen isoliert worden. Dies bedingt, dass in Empfängertieren detektierte grün fluoreszierende Zellen 1) von KSL-Zellen abstammen und 2) sich zu MHCII exprimierenden Zellen entwickelt haben.

Da MHCII auf allen Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert wird, stellte sich die Frage, ob es sich eher um Monozyten oder um Dendritische Zellen handelte. Zur Beantwortung der Frage wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten angefertigt, bei denen Antikörper nicht nur gegen eGFP sondern gleichzeitig auch gegen den Oberflächenmarker CD11b für Monozyten bzw. CD11c für Dendritische Zellen eingesetzt wurden. Diese Doppelfärbungen wurden an Aorta, Milz und Lymphknoten von Tieren der 6-Tages-Gruppen durchgeführt. Das Protokoll ähnelte dem der einfachen eGFP-Färbung, wich aber insofern ab, als dass in einem ersten Inkubationsschritt jeweils beide Primärantikörper bzw. Isotyp-Kontrollen und in einem

folgenden Schritt beide Sekundärantikörper gleichzeitig auf die Objektträger gegeben wurden. Die gewählten Antikörper stammten aus verschiedenen Spezies, so dass keine falsch-positiven Signale auf Grund von Kreuzreaktionen entstehen konnten.

Die detaillierte Vorgehensweise ist im Anhang als Färbeprotokoll 3 bzw. Färbeprotokoll 4 zu finden.

4.3.8 Lokalisation der grün fluoreszierenden Zellen im lymphatischen Gewebe durch Immunfluoreszenzfärbung von eGFP und B220

Bei der eGFP-Färbung von Lymphknoten und Milz fiel auf, dass die grün fluoreszierenden Zellen nicht gleichmäßig über den gesamten Schnitt verteilt waren, sondern sich in bestimmten Regionen häuften. In einer weiteren Analyse wurde daher durch Doppelfärbung von eGFP und B220 die Lagebeziehung der rekrutieren MHCII-eGFP-Zellen zu B220-positiven Zellen in den Lymphfollikeln der Lymphknoten näher untersucht. Das Antigen B220 gehört zur Gruppe der CD45-Rezeptoren und ist vor allem auf B-Lymphozyten zu finden, so dass durch eine Doppelfärbung nicht nur der Frage der Lokalisation nachgegangen werden konnte, sondern auch das Vorhandensein einer Koexpression von MHCII und B220 überprüft werden konnte. Dies würde darauf hindeuten, dass die injizierten KSL-Zellen auch das Potenzial haben, sich zu B-Lymphozyten zu differenzieren.

Nach Fixierung und Blockierung der unspezifischen Bindung mit BSA wurde zunächst der Primärantikörper gegen B220 bzw. der Isotyp-Kontrolle auf die Objektträger pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten wurde der Sekundärantikörper hinzugegeben und ebenfalls für 45 Minuten auf den Schnitten belassen. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit Triton-X-100 permeabilisiert und eine unspezifische Antikörperbindung durch Zugabe von BSA verhindert. Danach erfolgte die indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen eGFP, wobei ebenfalls Primärantikörper bzw. Isotyp-Kontrolle und Sekundärantikörper für jeweils 45 Minuten eingesetzt wurden. Zum Schluss wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt, woraufhin auf die Objektträger Mounting Medium und Deckgläschen gegeben wurden.

Das detaillierte Protokoll mit Angabe aller Substanzen und Konzentrationen ist im Anhang als Färbeprotokoll 5 nachzulesen.

4.3.9 Untersuchung der Proliferation durch Immunfluoreszenzfärbung von eGFP und ki-67

Da der Nachweis der Migration der injizierten KSL-Zellen indirekt durch Detektion der bereits differenzierten MHCII-positiven Zellen erfolgte, galt es herauszufinden, ob die Stammzellen in den atherosklerotisch veränderten Gefäßen auch proliferieren können. Hierzu wurden 50000 KSL-Zellen aus Mäusen des β -Aktin-eGFP-Stammes isoliert und in eine ApoE-Knockout-Maus injiziert, die 16 Wochen lang eine cholesterinreiche Diät erhalten hatte. Der β -Aktin-eGFP-Stamm wurde deshalb als Spender für KSL-Zellen gewählt, weil hier alle isolierten Vorläuferzellen und ihre Nachkommen im Empfängertier das grün fluoreszierende Protein exprimieren. 2 Tage nach der Zellinjektion erfolgte wie oben beschrieben die Entnahme des Aortenbogens und paraaortaler Lymphknoten. Auch die Vorbereitung der Organe erfolgte analog zu den MHCII-eGFP-Versuchen.

Um herauszufinden, ob injizierte Stammzellen in den atherosklerotischen Plaques proliferieren können, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von eGFP und gleichzeitig ki-67 an Kryoschnitten der Aorta angefertigt. Ki-67 ist ein Proliferationsmarker, der sich im Zellkern befindet und eine Rolle bei der Regulation der Zellteilung spielt. Er wird während allen Phasen des aktiven Zellzyklus exprimiert, wohingegen er in ruhenden, sich nicht teilenden Zellen nicht nachgewiesen werden kann.⁸⁶

Für die Färbung wurden die Schnitte mit 4-prozentiger Paraformaldehydlösung fixiert. Nach dem Waschen mit einem Puffer aus PBS und 0.1% Tween und dem Entfernen der Paraformaldehydreste mit einer 2-prozentigen Glycinlösung wurde ein Antikörper gegen den Fc-Rezeptor auf die Objektträger gegeben, der unspezifische Antikörperbindungen blockierte. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die Schnitte gewaschen und mit dem Antikörper gegen ki-67 bzw. der Isotyp-Kontrolle versehen. Die Färbekammern wurden daraufhin über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde dann der Sekundärantikörper gegen

Phycoerythrin aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die ungebundenen Antikörperreste gewaschen, woraufhin die eGFP-Färbung erfolgte. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit Triton-X-100 permeabilisiert, anschließend unspezifische Antikörperbindungen mit BSA blockiert und schließlich der Primär- und Sekundärantikörper gegen eGFP dazugegeben. Zum Schluss erfolgte die Färbung des Zellkerns mit DAPI und das Auftragen von Mounting Medium und Deckgläschen auf die Objektträger.

Die detaillierte Vorgehensweise ist im Anhang als Färbeprotokoll 6 zu finden.

Als Positivkontrolle für diese Färbung wurden Schnitte des Darms der ApoE-Knockout-Maus verwendet, da in dessen Krypten eine hohe Proliferationstätigkeit nachweisbar ist.

4.3.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm STATA Version 10.1 (StataCorp LP, College Station, Texas, USA). Ein p-Wert von 0.05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Nachdem die Anzahl der eGFP-positiven Zellen im atherosklerotischen Plaque und in der Adventitia pro Tier bestimmt und die Zellzahl im Plaque auch auf 1 mm² Plaquefläche bezogen wurde, erfolgte die Bestimmung der jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen in den 9 einzelnen Gruppen. Aufgrund der kleinen Gruppengrößen von 3 bzw. 4 Tieren, wurde kein statistischer Test zur Beurteilung der Signifikanz der Ergebnisse durchgeführt.

In einem zweiten Schritt wurden die 9 Gruppen jeweils zu Obergruppen zusammengefasst, um zum einen zu analysieren, ob der Zeitpunkt nach KSL-Zellinjektion einen Einfluss auf die Zellzahlen der eGFP-positiven Zellen in Plaque und Adventitia hat, und zum anderen zu untersuchen, ob die Dauer der cholesterinreichen Nahrung hierbei eine Rolle spielt. Dazu wurden als erstes jeweils 3 Gruppen zusammengefasst, bei denen die Organentnahme zum gleichen Zeitpunkt nach KSL-Zellinjektion erfolgte. Es ergaben sich somit 3 Gruppen mit jeweils 9-10 Tieren, wobei in Gruppe 1 die Organentnahme nach 2 Tagen erfolgt war, die Mäuse in Gruppe 2 nach 6 Tagen und die Tiere in Gruppe 3 nach 14 Tagen geopfert worden

waren. Die Dauer der Cholesterinfütterung war in den einzelnen Gruppen annähernd gleich verteilt. Anschließend wurden die 9 Ausgangsgruppen erneut zu 3 Gruppen zusammengefasst, die sich nun durch die Dauer der Cholesterindiät unterschieden. Die Tiere der ersten Gruppe hatten 8 Wochen lang ein cholesterinreiches Futter erhalten, die Mäuse der zweiten Gruppe waren für 12 Wochen und die Tiere der dritten Gruppe für 16 Wochen mit cholesterinreicher Nahrung angefütert worden. Der Zeitpunkt nach KSL-Zellinjektion war in den einzelnen Gruppen annähernd gleich verteilt.

Für beide Analysen wurden jeweils als erstes die Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzahl im Plaque, der Zellzahl pro mm² Plaquefläche und der Zellzahl in der Adventitia in den einzelnen Gruppen ermittelt. Anschließend erfolgte jeweils die Durchführung von One Way ANOVA-Tests, um die statistische Signifikanz der Ergebnisse zu beurteilen. Da der One Way ANOVA-Test nicht angibt, welche Mittelwerte sich signifikant unterscheiden, wurden bei einem signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen anschließend T-Tests durchgeführt, um jeweils zwei Gruppen miteinander zu vergleichen.

5 ERGEBNISSE

5.1. Charakterisierung klonogener Zellen aus Aorta und Blut ApoE-defizienter Mäuse

5.1.1 Analyse der Oberflächenmarker mittels Immunfluoreszenzfärbungen in Einzelzellsuspension

Im ersten Teil der Arbeit wurden aus Blut und Aorten ApoE-defizienter Mäuse CFU Assays angefertigt, um aus diesen Geweben hämatopoetische Vorläuferzellen zu isolieren. Anschließend wurden Immunfluoreszenzfärbungen dieser Zellen angefertigt, mit dem Ziel herauszufinden, zu welchen differenzierten Zellen die HSPCs aus Blut und Aorta ausreifen können.

Zunächst wurde geprüft, ob es sich bei den geernteten Zellen der CFU Assays tatsächlich um Nachkommen hämatopoetischer Vorläuferzellen handelte. Dafür wurde das Vorkommen des Leukozyten-spezifischen Antigens CD45 auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Dieses Antigen ist sowohl auf HSPCs als auch auf allen leukozytären Zellreihen zu finden. Wie den Abbildungen 3A und 3B zu entnehmen ist, konnte gezeigt werden, dass nahezu alle Zellen der Kolonien das CD45-Antigen exprimierten.

Um festzustellen, ob sich nach 2-wöchiger Inkubation der HSPCs immer noch Vorläuferzellen in den Kolonien befanden, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen das Antigen CD34 angefertigt. CD34 ist ein Zell-zu-Zell-Adhäsionsmolekül, das von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird und im Knochenmark diese Zellen an das Stroma bindet. Es ist daneben auch auf endothelialen Zellen zu finden, wobei es die Freisetzung und Migration der HSPCs reguliert.⁴⁴ In den Kolonien aus Aorta und Blut der ApoE-defizienten Mäuse war dieses Antigen auf der Mehrheit der Zellen nicht zu finden. Daneben existierten jedoch auch einige CD34-positive Zellen, die in den Abbildungen 3C und 3D gezeigt werden.

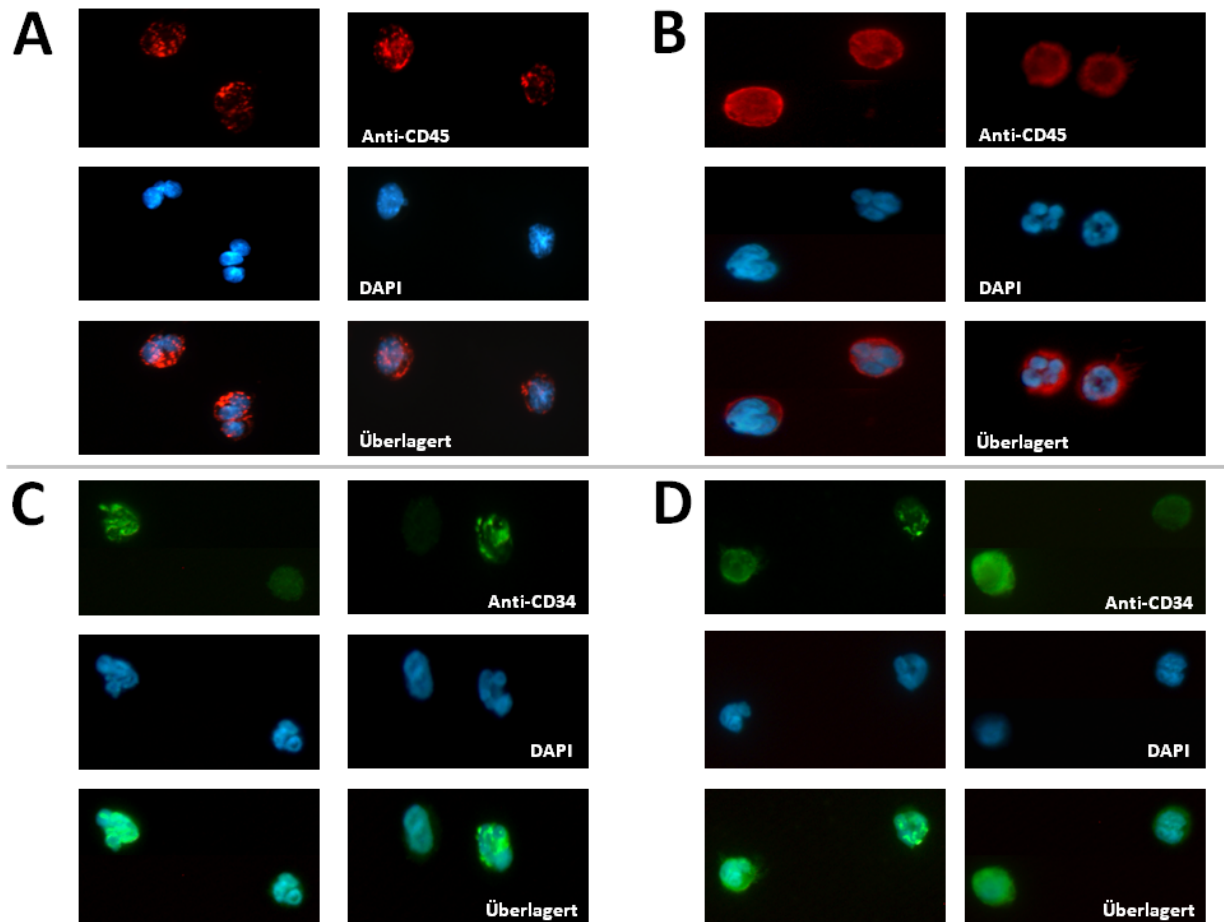


Abbildung 3: Immunfluoreszenzfärbung von CD45 und CD34 auf Zellen der CFU Assays aus Blut und Aortengewebe

Die Abbildung zeigt beispielhaft jeweils vier Zellen, welche mittels Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht wurden. Die Zellen entstammen hämatopoetischen Vorläuferzellen, die aus Blut bzw. Aortengewebe ApoE-defizienter Mäuse isoliert und 14 Tage in CFUs Assays expandiert und kultiviert wurden. Die obere Reihe zeigt jeweils die Färbung des Oberflächenmarkers (CD45 bzw. CD34) und in der mittleren Reihe ist der Zellkern durch DAPI visualisiert. Die Darstellung in der jeweils unteren Reihe zeigt die Überlagerung dieser beiden Färbungen.

A) Fluoreszenzmikroskopische Analysen detektieren die Expression von CD45 auf Zellen von CFUs, die aus peripherem Blut isoliert worden waren

B) CD45 wird fluoreszenzmikroskopisch auf Zellen nachgewiesen, die aus aortalen CFU Assays entstammen

C) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen detektieren die Expression von CD34 auf Zellen von CFUs, die aus peripherem Blut isoliert worden waren

D) CD34 wird fluoreszenzmikroskopisch auf Zellen nachgewiesen, die aortalen CFU Assays entstammen

In einem weiteren Schritt wurde die Differenzierungskapazität der klonal expandierten HSPCs untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Antikörpern gegen Oberflächenantigene der verschiedenen leukozytären Subgruppen versehen. Zusätzlich wurde bei jeder der in den folgenden Abschnitten beschriebenen Färbungen auch eine Isotyp-Kontrolle angefertigt, um die Spezifität der Antigen-Antikörper-Bindung zu überprüfen.

Als erstes wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Markern der myeloiden Reihe angefertigt. Dabei wurden Antikörper verwendet, die gegen die Antigene MHC II, CD11c, CD11b und Ly-6G gerichtet waren. MHCII ist, wie bereits in Punkt 2.2.1 dargestellt, auf allen Antigen-präsentierenden Zellen zu finden, vornehmlich auf Makrophagen, Dendritischen Zellen und B-Lymphozyten. CD11c ist eine Untereinheit eines Komplementrezeptors und der Panmarker für Dendritische Zellen.^{85,99} Desweiteren wird dieses Antigen in Mäusen auch von Monozyten und Makrophagen exprimiert.⁹¹ CD11b stellt ebenfalls eine Untereinheit eines Komplementrezeptors dar und ist auf Zellen des angeborenen Immunsystems zu finden, vornehmlich auf Monozyten und Makrophagen, aber auch auf Natürlichen Killerzellen.^{25,99} Daneben wird CD11b auch von Dendritischen Zellen exprimiert, vor allem wenn sie aus Monozyten entstanden sind und eine Rolle als Entzündungszellen innehaben.^{20,85} Ly-6G ist ein Oberflächenmarker, der Neutrophile Granulozyten charakterisiert und daneben auf Monozyten-Vorläuferzellen zu finden ist.^{24,92}

Bei der Auswertung dieser Immunfluoreszenzfärbungen der oben beschriebenen Antigene, konnte festgestellt werden, dass innerhalb der Kolonien aus Aorta und Blut jeweils Zellpopulationen zu finden waren, die MHCII, CD11c oder CD11b auf ihrer Oberfläche trugen. Sowohl in den Zellen der CFU Assays aus dem Aortengewebe als auch in den Versuchen mit dem Blut ApoE-defizienter Mäuse schien dabei die Expression des Antigens CD11b zu dominieren. Bei den Färbungen von Ly-6G war hingegen aufgefallen, dass dieses Protein auf dem überwiegenden Teil der Zellen nicht nachgewiesen werden konnte. Vor allem in den Kolonien aus dem Blut konnten jedoch vereinzelt Ly-6G-positive Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop entdeckt werden.

Nach der Evaluation der Expression der myeloiden Marker wurde auch das Vorhandensein von Oberflächenantigenen untersucht, die auf Zellen der lymphatischen Reihe zu finden sind. Dabei wurde zum einen ein Antikörper gegen

CD3 verwendet, mit dem T-Lymphozyten detektiert werden können²¹, zum anderen wurde das transmembranöse Protein B220 angefärbt, mit dem B-Lymphozyten und Vorläuferzellen der B-Zellen erfasst werden können.⁴²

In den Immunfluoreszenzfärbungen der CFUs konnte das Antigen CD3 weder in der Nachkommenschaft der aortalen Vorläuferzellen noch in den Kolonien aus dem Blut nachgewiesen werden. Was das Protein B220 betrifft, zeigte sich der Großteil der Zellen ebenfalls negativ für diesen Marker. Allerdings konnten vereinzelt einige positive Signale auf den Tochterzellen aus dem Blut detektiert werden.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der gerade beschriebenen Färbungen kann den Abbildungen 4 und 5 entnommen werden.

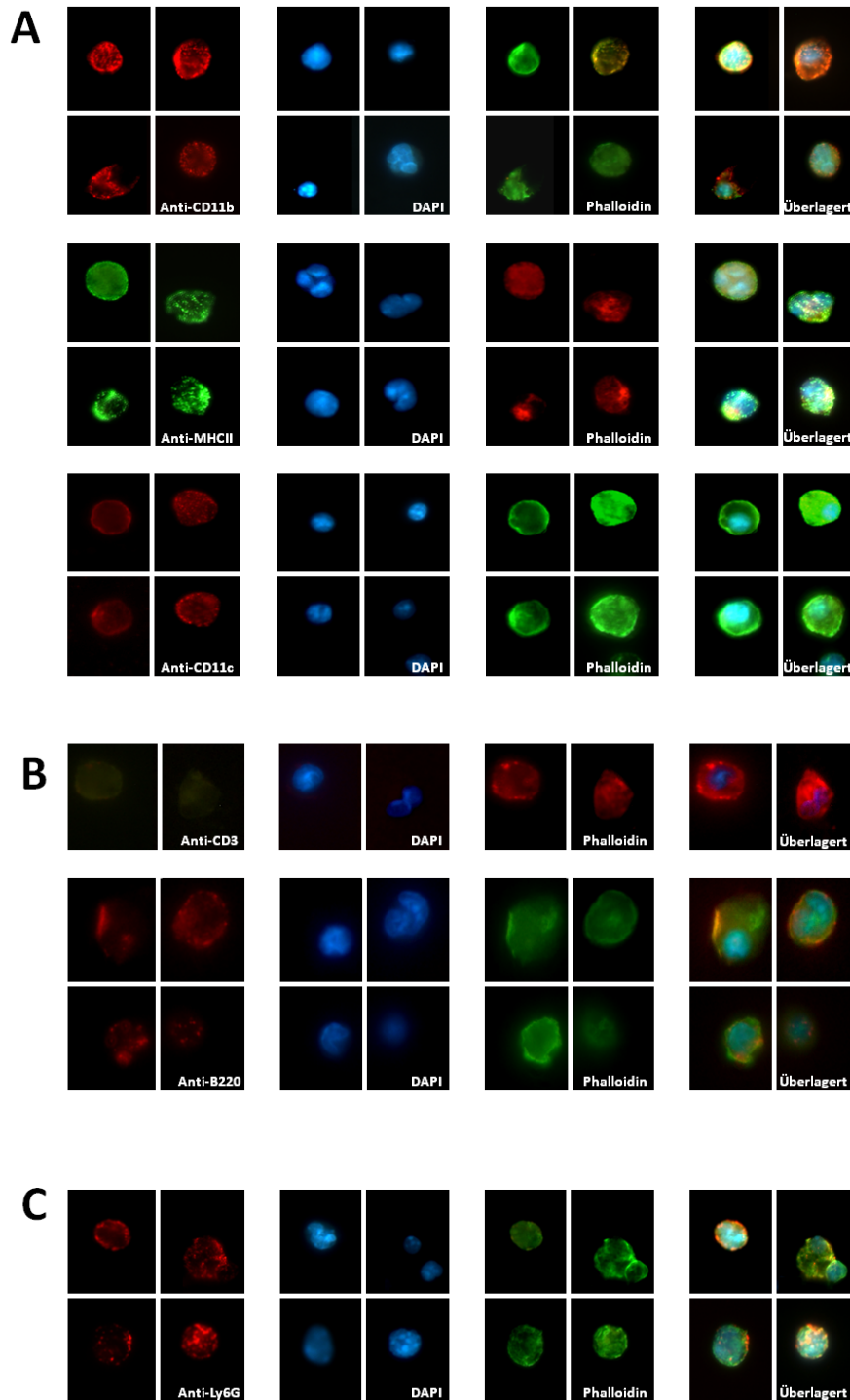


Abbildung 4: Immunfluoreszenzfärbung von CD11b, MHCII, CD11c, CD3, B220 und Ly-6G auf Zellen der CFU Assays aus Blut

Die Abbildung zeigt beispielhaft bis zu vier Zellen pro analysierten Oberflächenmarker, welche mittels Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht wurden. Die Zellen entstammen hämatopoetischen Vorläuferzellen, die aus Blut ApoE-defizienter Mäuse isoliert und 14 Tage in CFUs Assays expandiert und kultiviert wurden. In der linken Spalte ist jeweils die Färbung des Oberflächenmarkers dargestellt. In den beiden Spalten daneben sind der Zellkern durch DAPI (Mitte links) bzw. das Zytoskelett durch Phalloidin (Mitte rechts) visualisiert. Die rechte Spalte zeigt die Überlagerung aller Fluoreszenzen.

- A) Fluoreszenzmikroskopische Analysen detektieren die Antigene CD11b, MHCII und CD11c auf CFU-Zellen nach Isolation aus Blut
- B) Immunfluoreszenzfärbung der Antigene CD3 und B220 auf Zellen aus Blut, die in CFU Assays gereift sind: CD3 konnte nicht nachgewiesen werden, B220 wurde auf einzelnen Zellen detektiert
- C) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen weisen vereinzelt das Antigen Ly-6G auf Zellen von CFUs nach, die aus Blut isoliert worden waren

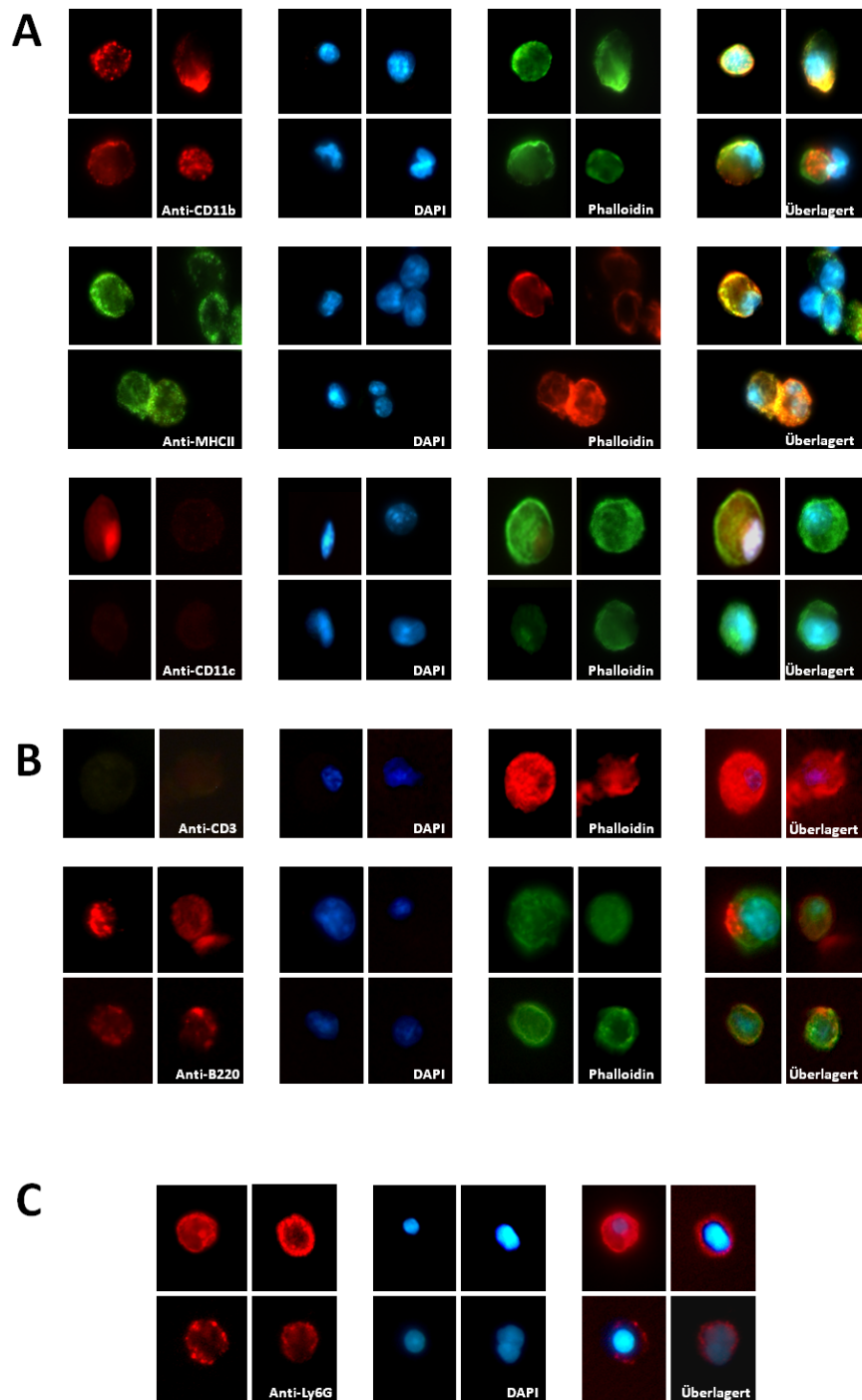


Abbildung 5: Immunfluoreszenzfärbung von CD11b, MHCII, CD11c, CD3, B220 und Ly-6G auf Zellen der CFU Assays aus Aortengewebe

Die Abbildung zeigt beispielhaft bis zu vier Zellen pro analysierten Oberflächenmarker, welche mittels Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht wurden. Die Zellen entstammen hämatopoetischen Vorläuferzellen, die aus Aortengewebe ApoE-defizienter Mäuse isoliert und 14 Tage in CFUs Assays expandiert und kultiviert wurden. In der linken Spalte der Teilabbildungen A und B ist jeweils die Färbung des Oberflächenmarkers dargestellt. In den beiden Spalten daneben sind der Zellkern durch DAPI (Mitte links) bzw. das Zytoskelett durch Phalloidin (Mitte rechts) visualisiert. Die rechte Spalte zeigt die Überlagerung aller Fluoreszenzen.

Die Teilabbildung C besteht nur aus 3 Spalten: Links ist die Anfärbung des Antigens dargestellt, in der Mitte ist der Zellkern durch DAPI visualisiert und die rechte Spalte zeigt die Überlagerung dieser beiden Fluoreszenzen

A) Fluoreszenzmikroskopische Analysen detektieren die Antigene CD11b, MHCII und CD11c auf CFU-Zellen nach Isolation aus Aortengewebe

B) Immunfluoreszenzfärbung der Antigene CD3 und B220 auf Zellen aus Aortengewebe, die in CFU Assays gereift sind: CD3 konnte nicht nachgewiesen werden, B220 wurde auf einzelnen Zellen detektiert

C) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen weisen vereinzelt das Antigen Ly-6G auf Zellen von CFUs nach, die aus Aortengewebe isoliert worden waren

5.1.2 Nachweis von Dendritischen Zellen in den Kolonien

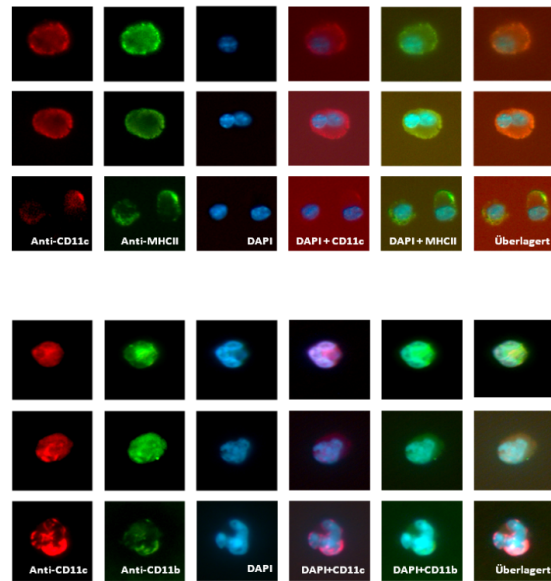
Da die in den einzelnen Färbungen sichtbar gemachten Oberflächenmarker zwar charakteristisch, aber keineswegs spezifisch für die Subgruppen der Leukozyten sind, wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt, bei denen jeweils zwei Antigene gleichzeitig nachgewiesen wurden. Dabei galt das Interesse der detaillierten Charakterisierung von Antigen-präsentierenden MHCII-positiven Zellen mit der Frage nach dem Vorhandensein von Dendritischen Zellen in den jeweiligen Kolonien. Es wurden deshalb zwei Antigenkombinationen gewählt, die auf Dendritischen Zellen zu finden sind.

Es wurden Doppelfärbungen angefertigt, welche eine Koexpression von MHCII und CD11c nachweisen sollten. CD11c ist der Panmarker der Dendritischen Zellen⁸⁵ und MHCII ist spezifisch auf Antigen-präsentierenden Zellen zu finden, zu denen man auch die Dendritischen Zellen zählt.^{13,76} Desweiteren erfolgte die gleichzeitige Anfärbung von CD11c und CD11b, da man auch diese beiden Marker zusammen auf Dendritischen Zellen finden kann, insbesondere, wenn die Dendritischen Zellen aus Monozyten entstanden sind.⁸⁵

Auch bei diesen Immunfluoreszenzfärbungen wurden Isotypkontrollen angefertigt, bei denen die jeweiligen unspezifisch bindenden IgG-Antikörper ebenfalls gemeinsam auf die Zellen aufgetragen wurden. Das unter dem Fluoreszenzmikroskop detektierte Signal war dabei jeweils nur sehr schwach bis gar nicht vorhanden.

Wie der folgenden Abbildung 6 zu entnehmen ist, wurden Zellen gefunden, welche die beschriebenen Antigenkombinationen tragen. Es können sowohl in den Kolonien aus der Aorta als auch in der Nachkommenschaft der aus dem Blut ausgesäten Vorläuferzellen die Doppelexpression von MHCII und CD11c nachgewiesen werden. Ebenso wird das gleichzeitige Vorkommen von CD11c und CD11b auf einigen CFUs aus Aorta und Blut detektiert.

A



B

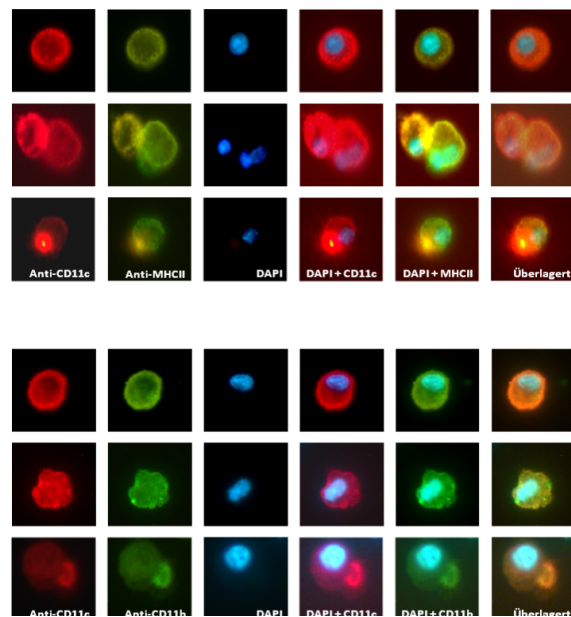


Abbildung 6: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von CD11c und MHCII bzw. CD11c und CD11b auf Zellen der CFU Assays aus Aortengewebe und Blut

Die Abbildung zeigt beispielhaft drei Zellen pro analysierten Oberflächenmarker, welche mittels Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht wurden. Die Zellen entstammen hämatopoetischen Vorläuferzellen, die aus Blut bzw. Aortengewebe ApoE-defizienter Mäuse isoliert und 14 Tage in CFUs Assays expandiert und kultiviert wurden.

In der linken Spalte ist jeweils die Färbung des Antigens CD11c dargestellt. Daneben sieht man entweder die Färbung des Antigens MHCII (obere Hälfte der Teilabbildungen) oder die Färbung des Oberflächenmarkers CD11c (untere Hälfte der Teilabbildungen). In der dritten Spalte ist jeweils der Zellkern durch DAPI visualisiert. Die rechten Spalten zeigen Überlagerungen der Fluoreszenzen. Man sieht in der vierten Spalte die Überlagerung der CD11c-Färbung mit DAPI und in der fünften Spalte die Überlagerung der CD11b- bzw. MHCII-Färbung mit DAPI. Ganz rechts ist die Überlagerung aller Fluoreszenzen dargestellt.

A) Fluoreszenzmikroskopische Analysen detektieren die Ko-Expression von CD11c und MHCII (obere Hälfte) sowie von CD11c und CD11b (untere Hälfte) auf CFU-Zellen, die aus der Gefäßwand der Aorta isoliert worden waren

B) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigen den Nachweis der gemeinsamen Expression von CD11c und MHCII (obere Hälfte) sowie von CD11c und CD11b (untere Hälfte) auf Zellen von CFUs nach Isolierung aus Blut

5.1.3 Analyse der Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie

Zur Verifizierung der durch Immunfluoreszenzfärbungen ermittelten Erkenntnisse erfolgte die Charakterisierung der koloniebildenden Zellen auch mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen. Es sollte dabei zusätzlich das Differenzierungspotential der ursprünglich ausgesäten HSPCs weiter eruiert werden, wobei neben den oben beschriebenen Antigenen CD45, MHCII, CD11c, CD11b, Ly-6G, CD3, B220 und CD34 zusätzlich das Vorhandensein der CD-Moleküle 115, 19, 8a, 4, 106, sowie des transmembranösen Proteins F4/80 auf den Zellen untersucht wurde.

CD115 ist der Rezeptor für den Colony Stimulating Factor 1, der vor allem auf Makrophagen exprimiert wird und für deren Entwicklung eine essentielle Rolle spielt.¹⁰ Das Protein F4/80 ist ebenfalls auf Makrophagen zu finden und kann weiterhin auf einigen Monozyten und Dendritischen Zellen nachgewiesen werden.⁹⁴ CD19 ist ein Antigen, welches von B-Lymphozyten aller Entwicklungsstufen exprimiert wird⁴⁰, wohingegen CD8a auf einer Untergruppe der Dendritischen Zellen zu finden ist⁵⁵ und CD4 vor allem zur Charakterisierung von T-Lymphozyten dient.¹⁰²

Zum anderen erfolgte der Einsatz von Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD106, CD62E und CD31, welche unter anderem auf Endothelzellen zu finden sind. Mithilfe dieser Oberflächenmarker wurde untersucht, ob es sich bei den ursprünglich ausgesäten Zellen um Hämangioblasten handeln könnte, welche gemeinsame Vorläuferzellen von Endothelzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen darstellen.

CD106, oder Vascular Cell Adhesion Molecule 1, wird von aktivierten Endothelzellen exprimiert und ist bei verschiedenen Prozessen der Extravasation der Leukozyten zu finden. Ein weiteres endotheliales Zelladhäsionsmolekül, das ebenfalls bei der Auswanderung der Leukozyten aus dem Gefäß benötigt wird, ist CD62E, auch E-Selektin genannt.⁶ CD31, oder Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1), ist auf Endothelzellen, Blutplättchen und verschiedenen Leukozyten zu finden und spielt unter anderem eine Rolle in der Regulation der Thrombozytenaktivierung und -aggregation.⁶⁴

Zur Kontrolle der Zuverlässigkeit der positiven Signale in der FACS-Analyse wurden verschiedene IgG-Antikörper als Isotypkontrollen verwendet (FITC-Rat-IgG_{2b}, PE-Rat-IgG_{2b}, Pe-Cy5-Rat-IgG_{2b} und APC-CD45.1). Hierbei wurde nur ein schwaches Signal auf den Zellen detektiert, mit dem das positive Signal der zu untersuchenden Oberflächenantigene verglichen wurde. In den folgenden Abbildungen zeigt die graue Linie die Signalstärke der Isotyp-Kontrollen an und verdeutlicht somit die Resultate der FACS-Analyse der CFUs.

Abbildung 7 zeigt, dass die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen durch die Durchflusszytometrie bestätigt wurden: es konnten auf den CFUs aus Aorta und Blut die myeloiden Marker MHCII, CD11c und CD11b nachgewiesen werden.

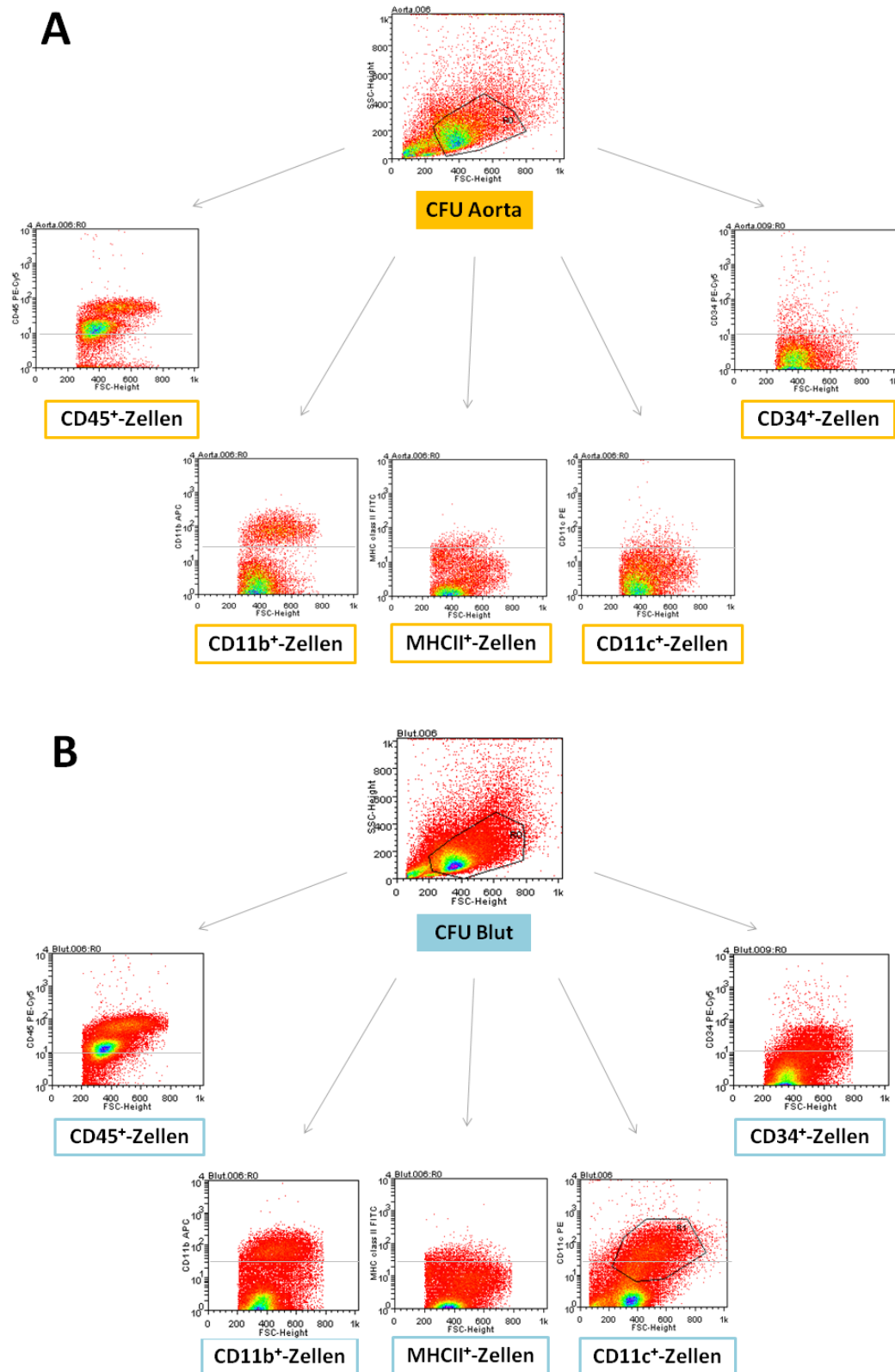


Abbildung 7: FACS-Analyse der Oberflächenmarker CD45, CD11b, MHCII, CD11c und CD34 auf Zellen von CFU Assays aus Aortengewebe und Blut

Die Abbildung zeigt repräsentative Dotplot-Diagramme der durchflusszytometrischen Analyse von Zellen, die aus CFU Assays nach 2-wöchiger Expansion und Kultur aus hämatopoetischen Vorläuferzellen hervorgegangen sind, welche ursprünglich aus Aortengewebe und Blut ApoE-defizienter Mäuse isoliert worden waren.

In den Teilabbildungen ist oben ein Dotplot-Diagramm zu sehen, bei welchem die Signalstärke der Zellen im FSC und SSC dargestellt und ein Gate um eine leukozytäre Zellpopulation gesetzt ist. Die Diagramme unterhalb zeigen die Expressionsstärke einzelner analysierter Oberflächenmarker auf den Zellen aus dem gesetzten Gate. Die graue Linie in diesen Dotplot-Diagrammen spiegelt die Signalstärke der jeweiligen Isotyp-Kontrollen wieder.

A) Durchflusszytometrische Analysen der Zellen aus CFUs aus der Gefäßwand der Aorta zeigen die Expression von CD45, CD11b, MHCII, CD11c und CD34 auf den Zellen. Man erkennt eine hohe Expressionsrate von CD45 und CD11b, wohingegen MHCII, CD11c und CD34 auf einer geringeren Anzahl von Zellen zu finden sind.

B) Die Expression von CD45, CD11b, MHCII, CD11c und CD34 wird mittels durchflusszytometrischer Analyse auf den koloniebildenden Zellen aus dem Blut nachgewiesen. Es ist ersichtlich, dass eine große Zellpopulation die Marker CD45, CD11b, CD11c und CD34 exprimiert, während MHCII auf einer geringeren Anzahl von Zellen zu finden ist.

Analog zu den Doppelfärbungen in der Immunfluoreszenzmikroskopie (vgl. Punkt 5.1.2) wurden die Zellen auch in der Durchflusszytometrie auf die Koexpression charakteristischer Oberflächenantigene von Dendritischen Zellen untersucht. Dabei wurde um die CD11c-positive Zellpopulation ein Gate gesetzt (vgl. Abb. 7B) und alle Zellen in diesem Gate auf das Vorhandensein von MHCII oder CD11b überprüft. Abbildung 8 zeigt beispielhaft eine Auswertung für die koloniebildenden Zellen aus dem Blut, in welcher das gleichzeitige Vorkommen von CD11c und MHCII beziehungsweise CD11c und CD11b bestätigt wird.

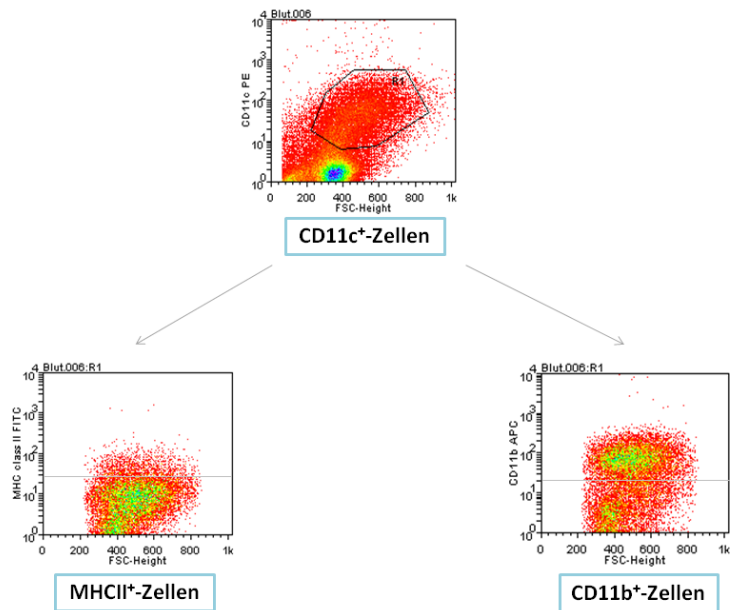


Abbildung 8: FACS-Analyse der Oberflächenmarker MHCII und CD11b auf CD11c-positiven Zellen aus CFU Assays aus Blut

Die Abbildung zeigt repräsentative Dotplot-Diagramme durchflusszytometrischer Analysen von koloniebildenden Zellen, welche nach 2-wöchiger Expansion und Kultur aus hämatopoetischen Vorläuferzellen entstanden sind, die aus Blut ApoE-defizienter Mäuse isoliert worden waren. Im oberen Diagramm sind die Zellen anhand der Signalstärke des Antikörpers gegen CD11c aufgetragen und es wurde die CD11c-positive Zellfraktion in einem Gate markiert. Die unteren beiden Dotplot-Diagramme zeigen die Expressionsstärke von MHCII (links) bzw. CD11b (rechts) auf den mit dem Gate erfassten CD11c-positiven Zellen. Die graue Linie in den beiden Diagrammen spiegelt die Signalstärke der jeweiligen Isotyp-Kontrolle wieder. Man erkennt ein hohes Vorkommen von CD11b und eine geringere Koexpression von MHCII auf den CD11c-positiven Zellen.

Weiterhin wurden die CFUs aus der aortalen Gefäßwand und aus dem peripheren Blut auf weitere leukozytäre Oberflächenmoleküle untersucht, um das Differenzierungsvermögen der ursprünglich ausgesäten HSPCs zu erschließen. Die Antigene CD115 und F4/80, die auf Makrophagen zu finden sind, finden sich auch unter den koloniebildenden Zellen aus Aorta und Blut. Das gleiche gilt für den B-Zell-Marker B220. Das Antigen CD19, das ebenfalls auf B-Lymphozyten zu finden ist, lässt sich auf den CFUs aus Aorta und Blut nicht nachweisen.

Was das T-Zell-Antigen CD4 betrifft, so sind die Zellen aus der Aorta negativ, bei den Zellen aus dem Blut lassen sich jedoch auch positive Signale detektieren. Auch das

Antigen CD8, das von Dendritischen Zellen exprimiert wird, zeigt nur bei der Auswertung der FACS-Analyse der CFUs aus dem peripheren Blut ein deutlich positives Ergebnis, die Zellen aus der Aorta sind eher negativ für diesen Marker (vgl. Abbildung 9).

Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass die ursprünglich ausgesäten HSPCs aus Aorta und Blut ein breites Differenzierungspotential haben, wobei sie sich in der Gefäßwand der Aorta eher zu myeloiden Zellen als zu lymphoiden Zellen entwickeln.

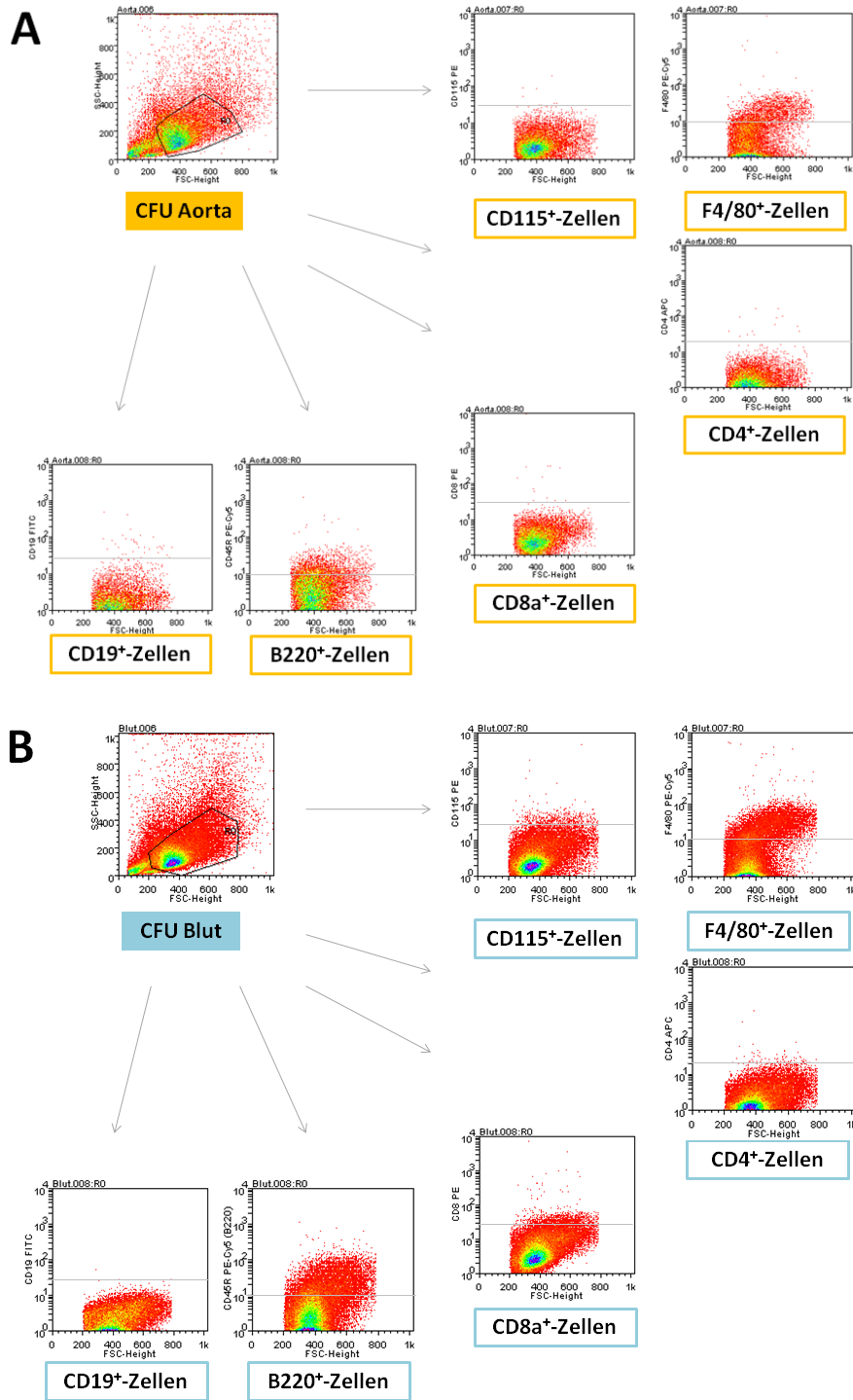


Abbildung 9: FACS-Analyse der Oberflächenmarker CD115, F4/80, CD4, CD8a, B220 und CD19 auf Zellen aus CFU-Assays aus Aortengewebe und Blut

Die Abbildung zeigt repräsentative Dotplot-Diagramme durchflusszytometrischer Analysen von Zellen aus CFU Assays nach 14-tägiger Expansion und Kultur, die ursprünglich als hämatopoetische Vorläuferzellen aus Blut und Aortengewebe ApoE-defizienter Mäuse isoliert wurden. Im Diagramm links oben wurden die Zellen anhand der Signalstärke im FSC und SSC analysiert und ein Gate um eine leukozytäre Zellpopulation gesetzt. In den übrigen Dotplot-Diagrammen ist die Expressionsstärke verschiedener Oberflächenmarker auf den im Gate befindlichen Zellen dargestellt. Die graue Linie spiegelt die Signalstärke der jeweiligen Isotyp-Kontrolle wieder.

A) Durchflusszytometrische Analysen der Zellen aus CFUs aus der Gefäßwand der Aorta zeigen ein Vorkommen des Antigens F4/80 (oben rechts) und B220 (untere Reihe, zweites Diagramm) auf einer Vielzahl von Zellen und das Vorhandensein von CD115 (oben Mitte) auf einer kleinen Zellpopulation.

B) Durchflusszytometrische Analysen der koloniebildenden Zellen aus Blut lassen eine hohe Expressionsstärke von F4/80 (oben rechts) und B220 (untere Reihe, zweites Diagramm) erkennen. Die Oberflächenmarker CD115 (oben Mitte) CD4 (rechte Seite, unteres Diagramm) und CD8a (Mitte, unteres Diagramm) sind ebenfalls auf einer geringen Anzahl an Zellen zu finden.

Als letztes wurden die koloniebildenden Zellen auf das Vorhandensein der Endothelzellmarker CD106, CD62E und CD31 untersucht. In der Nachkommenschaft der CFUs aus Aorta und Blut wird kein positives Signal detektiert. Dies zeigt, dass es sich bei den koloniebildenden Zellen, die aus der Aortenwand und dem Blut isoliert worden waren, nicht um Hämangioblasten handelt und sich die Vorläuferzellen auch nicht in Endothelzellen differenzieren können (vgl. Abbildung 10).

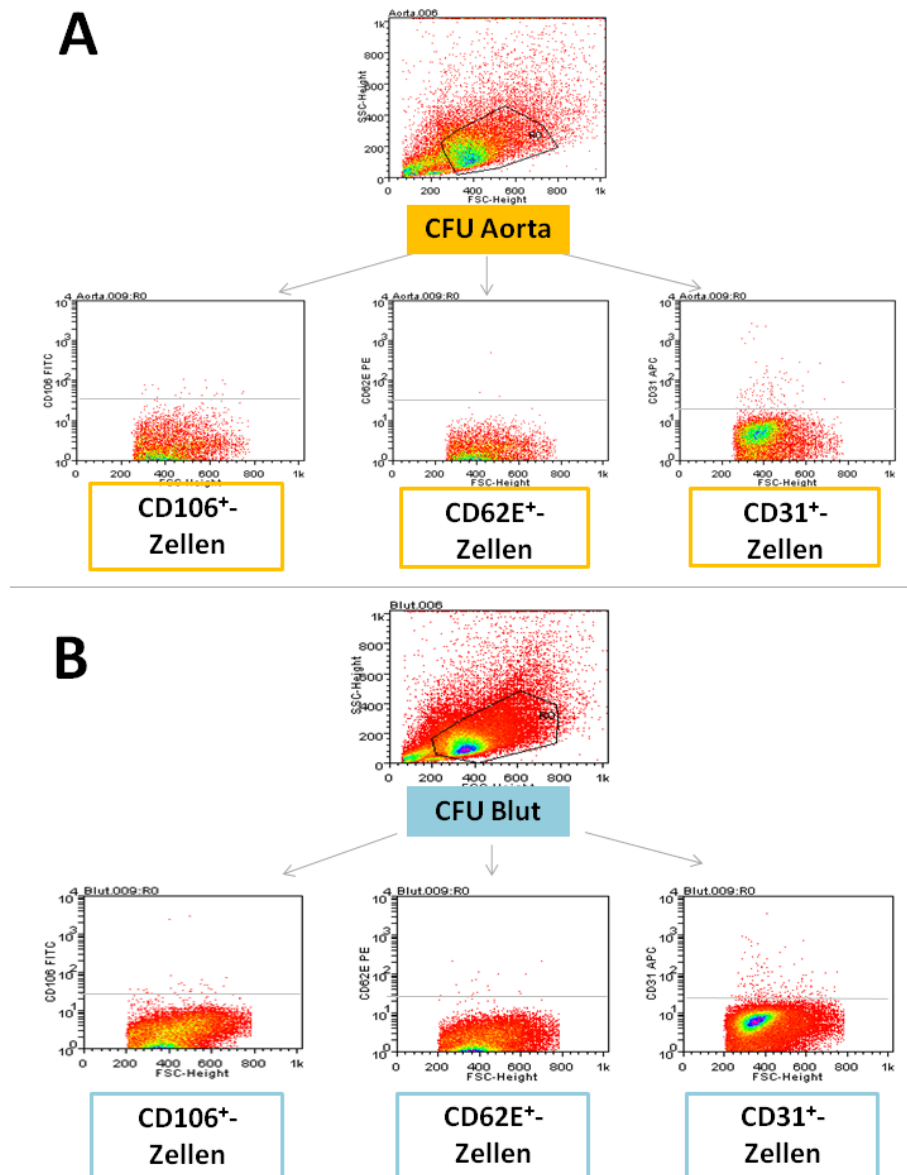


Abbildung 10: FACS-Analyse der Oberflächenmarker CD106, CD62E und CD31 auf Zellen aus CFU-Assays aus Aortengewebe und Blut

Die Abbildung zeigt repräsentative Dotplot-Diagramme durchflusszytometrischer Analysen von Zellen aus CFU Assays, die ursprünglich als hämatopoetische Vorläuferzellen aus Aortengewebe und Blut ApoE-defizienter Mäuse isoliert wurden und sich 14 Tage in Zellkultur befanden. Das obere Diagramm zeigt jeweils die Analyse der Zellen anhand der Signalstärke im FSC und SSC mit einem Gate um eine leukozytäre Population. Die unteren Dotplot-Diagramme zeigen die Expressionsstärke von CD106 (rechts), CD62E (Mitte) und CD31 (links) auf den Zellen im Gate. Die graue Linie spiegelt die Signalstärke der jeweiligen Isotyp-Kontrollen wieder.

A) Durchflusszytometrische Analysen zeigen, dass sich auf Zellen von CFUs aus der Aortenwand die Oberflächenmarker CD106, CD62E und CD31 nicht nachweisen lassen.

B) Durchflusszytometrische Analysen zeigen, dass sich koloniebildenden Zellen aus Blut keine Expression von CD106, CD62E und CD31 zu erkennen ist.

5.2. Untersuchung des Rekrutierungs- und Differenzierungs- verhaltens hämatopoetischer Vorläuferzellen in der Aorta der ApoE-Knockout-Maus

5.2.1 Detektion von eGFP-positiven Antigen-präsentierenden Zellen in der Aorta mittels Immunfluoreszenzfärbungen

Im ersten Teil des Projektes wurde dargestellt, dass HSPCs nicht nur im Blut ApoE-defizienter Mäuse zirkulieren, sondern auch aus Aortengewebe zu isolieren sind. Wie oben beschrieben, wurde dabei in-vitro-gezeigt, dass die aus Blut und Aorta isolierten HSPCs bei der Differenzierung insbesondere myeloide Phänotypen anzunehmen scheinen. In dem sich anschließenden Abschnitt sollte nun geklärt werden, ob eine Rekrutierung von zirkulierenden HSPCs und lokale Differenzierung in myeloide Zellen auch in vivo in atherosklerotisch veränderten Gefäßen nachgewiesen werden kann.

Dazu wurden KSL-Zellen aus dem Knochenmark von MHCII-eGFP-Mäusen mittels FACS-Sort isoliert, wobei während der Zell-Isolierung ein negatives Signal der Zellen für eGFP überprüft wurde. Jeweils 5000 Zellen wurden den ApoE-defizienten Tieren injiziert, die atherosklerotisch veränderten Aorten dieser Empfängertiere nach 2, 6 oder 14 Tagen gewonnen und Immunfluoreszenzfärbungen der Präparate durchgeführt. Als Kontrolle dienten klonogene C57Bl/6J-Tiere, die keine atherosklerotischen Veränderungen aufwiesen. Man prüfte, ob das grün fluoreszierende Protein eGFP, das ausschließlich von MHCII-positiven Zellen exprimiert werden konnte, im Bereich atherosklerotischer Gefäßläsionen und drainierender lymphatischer Gewebe zu detektieren sein würde.

Fluoreszenzmikroskopische Analysen zeigten, dass regelmäßig sowohl im Bereich atherosklerotischer Plaques als auch in der Adventitia atherosklerotisch veränderter Aorten eGFP-positive Zellen zu detektieren waren. Dagegen konnten keine eGFP-positiven Zellen in Gefäßwänden von C57Bl/6J-Tieren ohne atherosklerotische Veränderungen nachgewiesen werden. Auch in Lymphknoten erschienen eGFP-positive Zellen. Als positive Kontrolle der Färbung wurden Lymphknoten von Mäusen des MHCII-eGFP-Stammes verwendet; hier war ein deutliches Signal in nahezu allen

Zellen nachweisbar. Die folgenden Beispiele verdeutlichen die Ergebnisse. In Abbildung 11 ist ein angefärbter Schnitt der Aorta als Übersichtsbild dargestellt, auf dem die Kollagenfasern der Gefäßwand, ein atherosklerotischer Plaque und die Adventitia sichtbar sind. Die Abbildungen 12A und 12B zeigen eGFP-positive Zellen im Plaque bzw. in der Adventitia in vergrößerten Bildausschnitten.

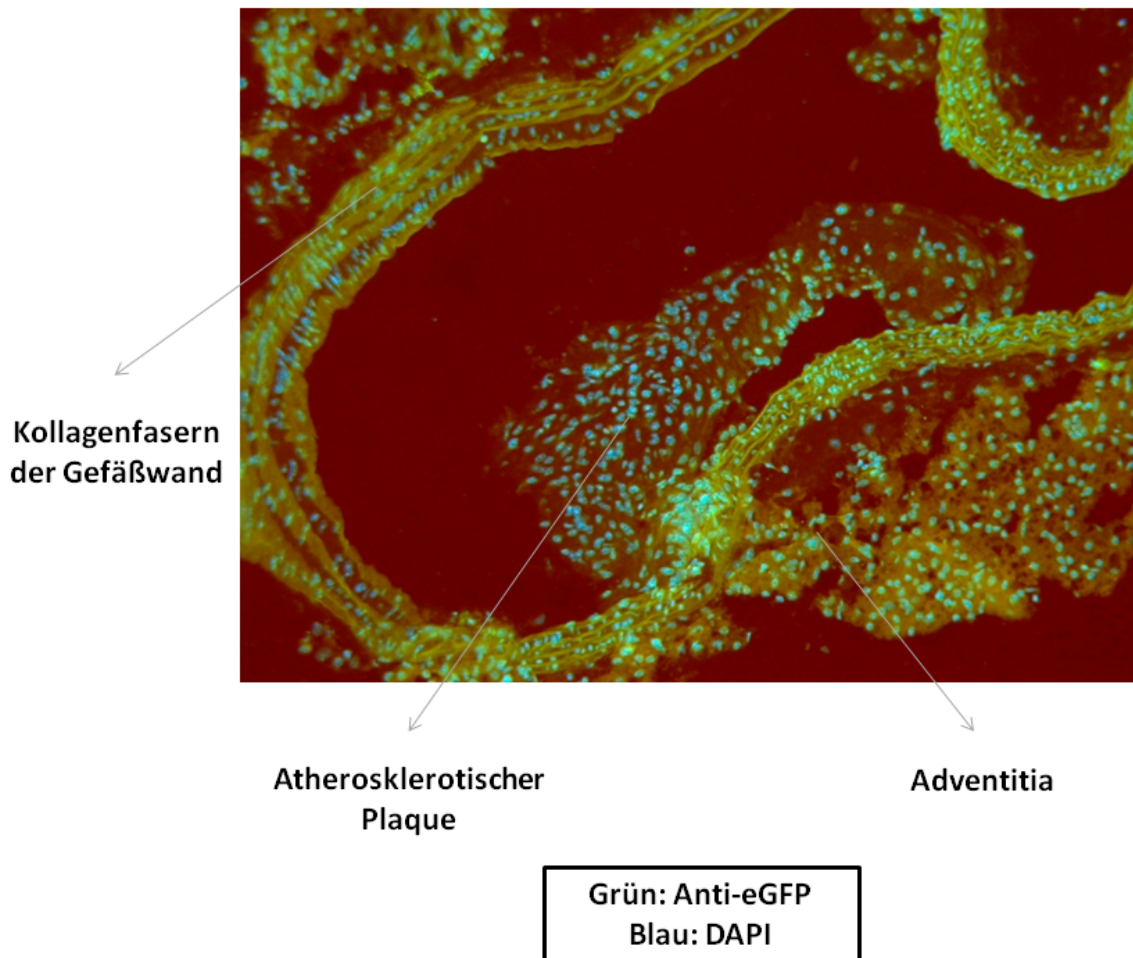


Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung von eGFP in einem Gefrierschnitt einer atherosklerotisch veränderten Aorta

Die Abbildung zeigt ein Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung eines Gefrierschnitts der atherosklerotisch veränderten Aorta einer 12 Wochen angefütterten ApoE-Knockout-Maus 2 Tage nach Injektion von 5000 KSL-Zellen eines MHCII-eGFP-Tieres. Zellkerne sind aufgrund der Anfärbung mittels DAPI in blau dargestellt und Zellen, welche eGFP enthalten, fluoreszieren grün. Man erkennt die Kollagenfasern der Gefäßwand aufgrund ihrer Autofluoreszenz und kann die Adventitia an der Außenseite durch die aufgelockerte Struktur identifizieren. Im Lumen des Gefäßes befindet sich ein atherosklerotischer Plaque, der einige eGFP-positive Zellen enthält.

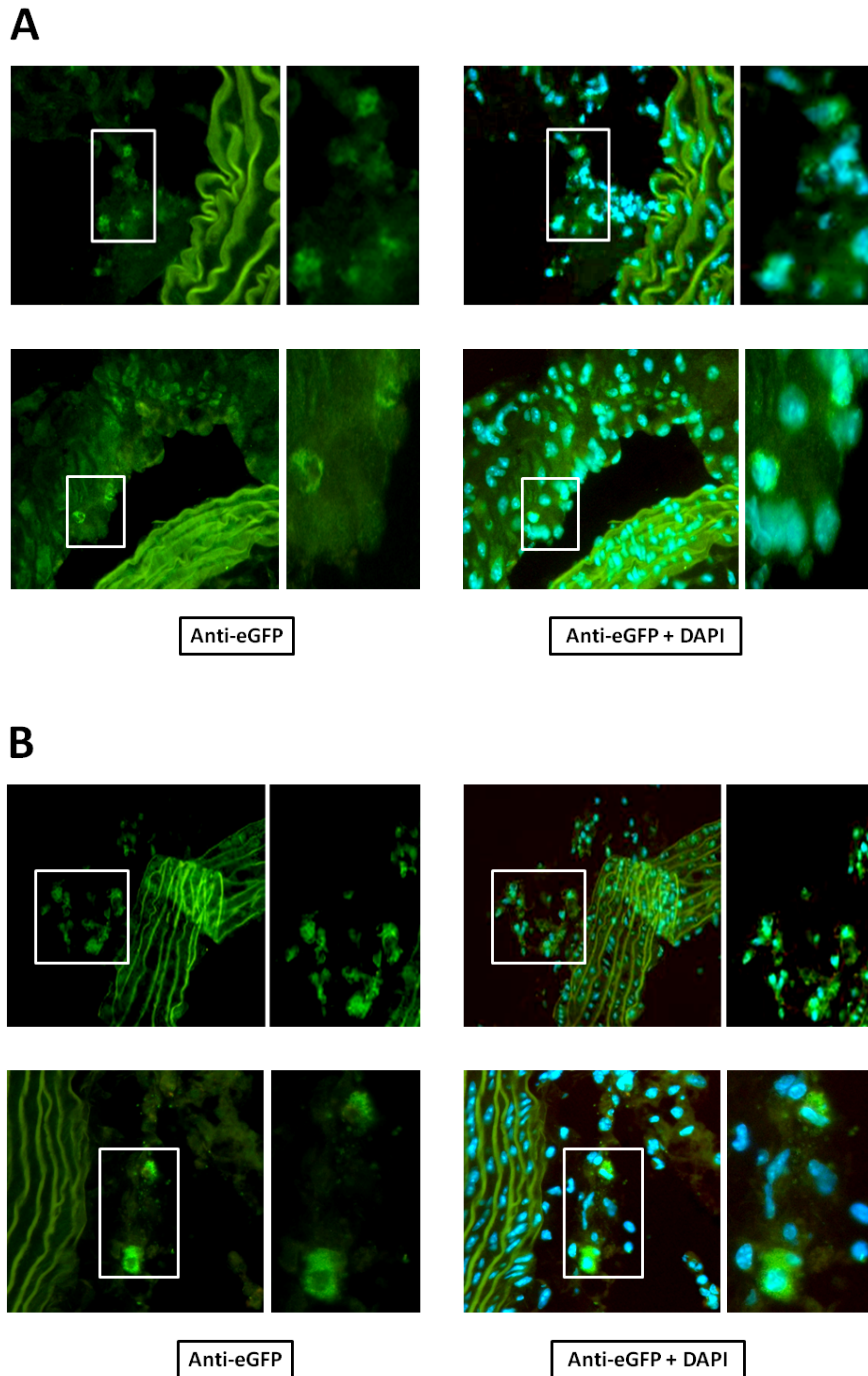


Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbung von eGFP im Plaque und in der Adventitia einer atherosklerotisch veränderten Aorta

Die Abbildung zeigt Immunfluoreszenzfärbungen von Gefrierschnitten atherosklerotisch veränderter Aorten von ApoE-Knockout-Mäusen, welche nach 12-wöchiger cholesterinreicher Diät jeweils 5000 KSL-Zellen aus MHCII-eGFP-Mäusen erhalten hatten. Jede Teilabbildung zeigt links einen Ausschnitt aus dem Gefäß, in welchem eGFP-positive Zellen durch einen weißen Rahmen markiert sind. Dieser Bereich ist jeweils rechts daneben vergrößert dargestellt. Man erkennt in der linken Spalte die Kollagenfasern der Gefäßwand und eGFP-positive Zellen im Plaque (Abb. A) bzw. in der Adventitia (Abb. B). In den Teilabbildungen der rechten Spalte sind jeweils zusätzlich die durch DAPI angefärbten Zellkerne zu erkennen.

A) Immunfluoreszenzmikroskopische Detektion von eGFP-positiven Zellen im Plaque atherosklerotisch veränderter Aorten von 12 Wochen angefügterten ApoE-Knockout-Empfängertieren 6 Tage (obere Reihe) bzw. 2 Tage (untere Reihe) nach Injektion von 5000 KSL-Zellen aus MHCII-eGFP-Mäusen

B) Nachweis von eGFP-positiven Zellen in der Adventita atherosklerotisch veränderter Aorten von 12 Wochen angefügterten ApoE-Knockout-Empfängertieren 6 Tage (oben) bzw. 14 Tage (unten) nach Injektion von 5000 KSL-Zellen aus MHCII-eGFP-Mäusen

5.2.2 Detektion von eGFP-positiven MHCII-exprimierenden Zellen in der Aorta ApoE-defizienter Mäuse mittels 2-Photonen-Mikroskopie

Zusätzlich wurden konfokale 2-Photonen-mikroskopische Analysen durchgeführt, um eine mögliche Rekrutierung eGFP-positiver Zellen in atherosklerotisch verändertes Aortengewebe in dreidimensionaler Darstellung visualisieren zu können. Analog dem in Abschnitt 5.2.1 dargestellten Versuchsaufbau erhielten ApoE-defiziente Tiere 5000 KSL-Zellen von MHCII-eGFP-Mäusen. 2, 6 und 14 Tage nach Zellapplikation wurden die Empfängertiere getötet und die Aorta unmittelbar post mortem freipräpariert und in situ visualisiert. Die Kollagenfasern der Arterienwand konnten aufgrund ihrer Autofluoreszenz sichtbar gemacht werden und stellten sich blau dar. Somit konnte sichergestellt werden, dass man Strukturen der Aortenwand fokussierte. Die gesuchten Zellen leuchteten aufgrund des grün fluoreszierenden Proteins auch ohne Zugabe eines Antikörpers gegen eGFP und waren in der Aorta ApoE-defizienter Empfängertiere nachweisbar (vgl. Abbildung 13). Zur Bestätigung wurden Lymphknoten dieser Tiere visualisiert, in denen viele grüne Zellen detektiert werden konnten. Als Kontrolle wurde die Aorta von ApoE-Knockout-Tieren verwendet, welche zuvor keine KSL-Zellen von MHCII-eGFP-Mäusen erhalten hatten. Hier wurden unter dem 2-Photonen-Mikroskop keine grün fluoreszierenden Zellen entdeckt.

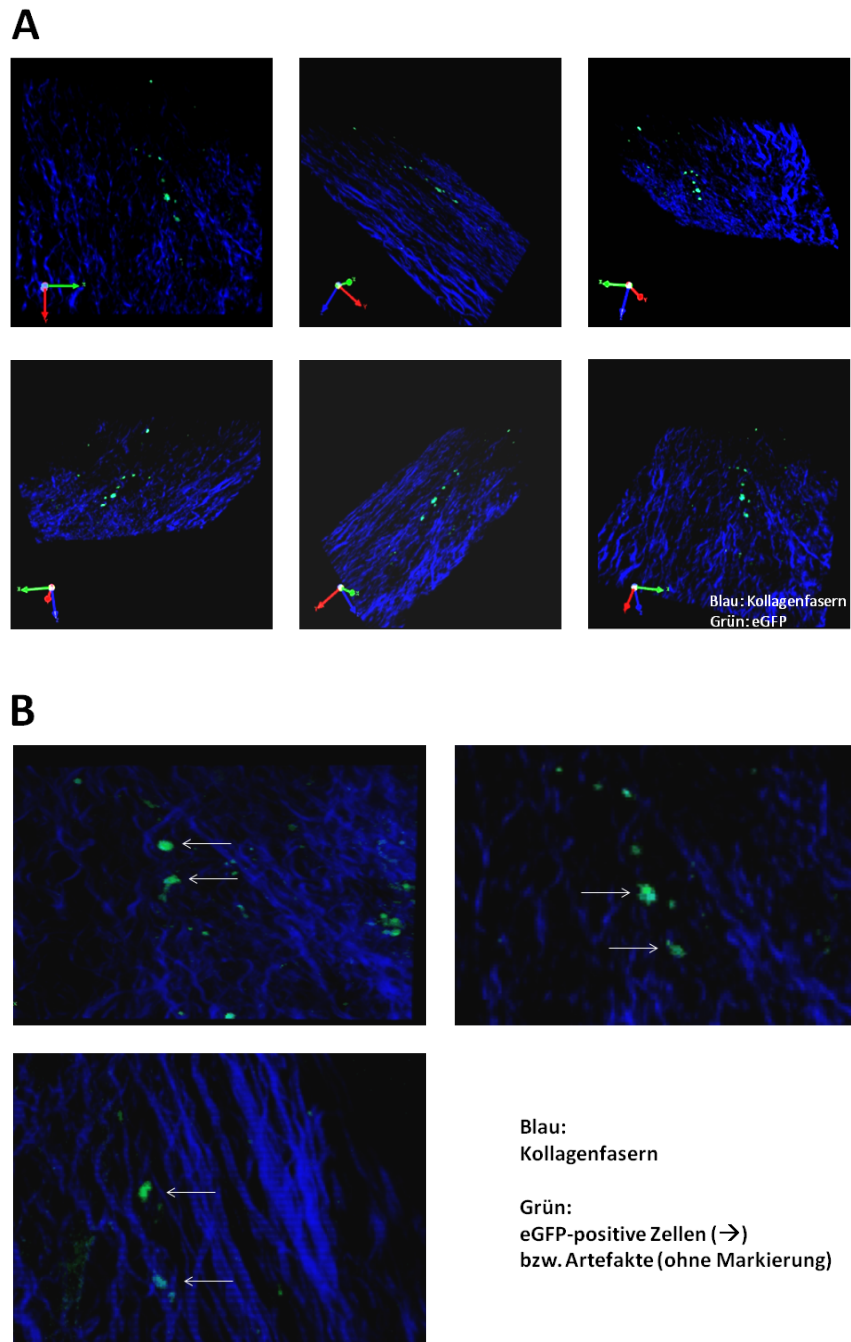


Abbildung 13: 2-Photonen-Mikroskopie von eGFP-positiven Zellen in der Aorta von 12 Wochen angefügterten ApoE-Knockout-Mäusen 2 Tage nach Injektion von 5000 KSL-Zellen aus dem MHCII-eGFP-Stamm

A) Beispielhafte Darstellung einer dreidimensionalen Rekonstruktion einer Aufnahme von eGFP-positiven Zellen in der Aortenwand in 6 Teilabbildungen von links oben nach rechts unten; die Kollagenfasern der Gefäßwand sind durch ihre blaue Autofluoreszenz zu erkennen, eGFP-positive Zellen fluoreszieren grün.

B) Drei repräsentative vergrößerte Ausschnitte von Aufnahmen mit dem 2-Photonen-Mikroskop zeigen eGFP-positive Zellen in der Aortenwand; die Kollagenfasern der Gefäßwand sind durch ihre blaue Autofluoreszenz zu erkennen, eGFP-positive Zellen fluoreszieren grün und sind durch weiße Pfeile markiert.

5.2.3 Untersuchung der Differenzierung der injizierten KSL-Zellen

In den vorhergehenden Abschnitten wurde gezeigt, dass KSL-Zellen, die aus dem Knochenmark von MHCII-eGFP-Spendertieren isoliert werden, nach intravenöser Applikation in ApoE-Knockout-Mäuse als MHCII-differenzierte eGFP-positive Zellen in atherosklerotischen Regionen akkumulieren. In einem sich anschließenden Schritt wurde der zelluläre Phänotyp der identifizierten eGFP-positiven Zellen, welche sich im Bereich atherosklerotischer Plaques befanden, im Detail untersucht.

Durch die Wahl des MHCII-eGFP-Stammes als Spender der KSL-Zellen, war davon auszugehen, dass detektierte eGFP-positive Zellen den Oberflächenmarker MHCII exprimierten. Dieser ist auf Antigen-präsentierenden Zellen zu finden, so dass es sich bei den grün fluoreszierenden Zellen um Makrophagen, Dendritische Zellen oder B-Lymphozyten handeln konnte. Um die Frage zu beantworten, ob es sich bei diesen Zellen um einen einheitlichen Zelltyp handelt oder ob aus den KSL-Zellen verschiedenartige Antigen-präsentierende Zellpopulationen entstehen können, wurden an jeweils drei bis vier Schnitten aus den Bereichen der Aortenbögen von ApoE-Knockout-Tieren unterschiedlicher Gruppen (8, 12 oder 16 Wochen lange Cholesterindiät; Aortenentnahme 2, 6 oder 14 Tage nach KSL-Zellinjektion) Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen angefertigt, bei denen zusammen mit Antikörpern gegen eGFP entweder Antikörper gegen CD11b oder gegen CD11c eingesetzt wurden. Als Positivkontrolle wurden Lymphknoten und Milzen dieser Tiere verwendet, in denen bei der Immunfluoreszenzfärbung Zellen mit einer Koexpression von eGFP und CD11c bzw. eGFP und CD11b detektiert werden konnten. Es wurden auch Isotypkontrollen angefertigt, bei denen unspezifische IgG-Antikörper auf die Schnitte aufgetragen wurden. Hierbei konnte man kein Signal erkennen.

In der eGFP-CD11c-Doppelfärbung der Aortenbögen zeigte die Mehrzahl der unter dem Fluoreszenzmikroskop detektierten Zellen entweder ein positives Signal für eGFP oder für das Antigen CD11c. Dennoch konnten einige Zellen gefunden werden, bei welchen eine Koexpression der beiden Proteine nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 14A). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch in der eGFP-CD11b-Immunfluoreszenzfärbung. In den Schnitten der hier verwendeten Aortenbögen fanden sich viele CD11b-positive Zellen, die kein Signal im eGFP-Kanal aufwiesen.

Daneben gab es einige Zellen, die nur eGFP-positiv waren und einige wenige, bei denen das gleichzeitige Vorhandensein von eGFP und CD11b detektiert werden konnte (vgl. Abb 14B).

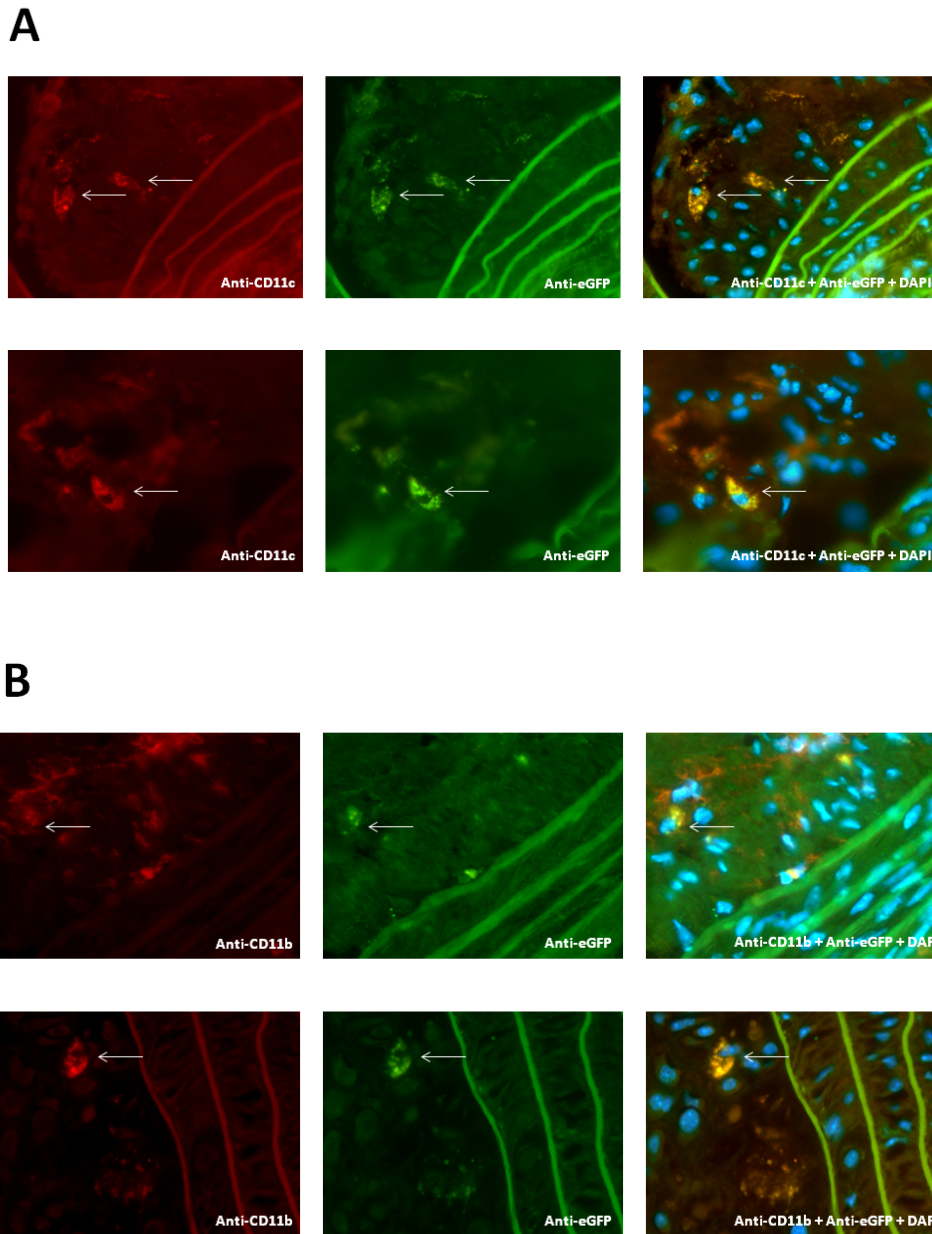


Abbildung 14: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von CD11b und eGFP bzw. CD11c und eGFP in atherosklerotischen Plaques

Die Abbildung zeigt repräsentativ jeweils zwei Ausschnitte pro Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Gefrierschnitten atherosklerotisch veränderter Aorten von ApoE-defizienten-Mäusen jeweils 6 Tage nach Erhalt von 5000 KSL-Zellen von MHCII-eGFP-Tieren. In der linken Spalte ist die Anfärbung der Antigene CD11c (Abb. A) bzw. CD11b (Abb. B) in rot dargestellt. Die mittlere Spalte zeigt das grün fluoreszierende Signal von eGFP und in der rechten Spalte sind beide Bilder übereinander gelegt und die Zellkerne sind mittels DAPI blau angefärbt.

A) Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Koexpression von eGFP und CD11c auf Zellen (weiße Pfeile) in atherosklerotischen Plaques von 12 Wochen angefügterten ApoE-Knockout-Mäusen

B) Fluoreszenzmikroskopische Detektion des gleichzeitigen Vorkommens von eGFP und CD11b auf Zellen (weiße Pfeile) im atherosklerotischen Plaque einer 12 Wochen (oben) bzw. 16 Wochen (unten) angefügterten ApoE-Knockout-Maus

5.2.4 Vergleich der Anzahl der eGFP-positiven Zellen in der Aorta in den verschiedenen Gruppen

Die bisherigen Versuche gaben Aufschluss darüber, dass injizierte hämatopoetische Vorläuferzellen im Empfängerorganismus die Fähigkeit zur Differenzierung bewahren und darüber hinaus als differenzierte Zellen am Ort der Entzündung nachgewiesen werden können. Als nächstes sollte die Rekrutierungsdynamik in die atherosklerotischen Läsionen genauer betrachtet werden.

Dazu wurde die Anzahl der eGFP-positiven Zellen in Plaque und Adventitia 2, 6 und 14 Tage nach der Applikation der KSL-Zellen ermittelt. Wie in Punkt 4 „Material und Methoden“ beschrieben, wurde der Aortenbogen eines jeden Tieres entnommen und jeweils 20 Objektträger mit 5 µm dicken Kryoschnitten angefertigt. Davon wurden jeweils sieben Schnitte (Nr. 2, 5, 8, 11, 14, 17 und 20) verwendet und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen das Antigen eGFP durchgeführt. Anschließend wurden grün fluoreszierende MHCII-positive Zellen sowohl im Bereich atherosklerotischer Plaques als auch in der Adventitia der Aorta quantifiziert. Dabei wurde die durchschnittliche Zellzahl pro Versuchstier ermittelt, d.h. die Summe der eGFP-positiven Zellen der sieben Schnitte berechnet. Zusätzlich wurde mit der Software CapImage die jeweilige Plaquefläche bestimmt und die Zellzahl im Plaque auf 1 mm² Plaquefläche bezogen. Im Bereich der Adventitia wurde die absolute Anzahl der eGFP-positiven Zellen in den einzelnen Gruppen verglichen, ohne dass hier die Fläche bestimmt wurde.

Die Rekrutierungsdynamik wurde in unterschiedlichen Ausprägungsstadien atherosklerotischer Läsionen überprüft. Dazu wurden ApoE-Knockout-Tiere untersucht, die für 8, 12 oder 16 Wochen mit cholesterinreichem Futter ernährt worden sind. Somit wurden drei Fütterungsgruppen zu je drei Zeitpunkten nach Zellapplikation, also insgesamt neun Gruppen, analysiert. Jede Gruppe enthält n=3-4 Tiere.

Abbildung 15A zeigt die durchschnittliche absolute Zahl detektierter grün fluoreszierender Zellen im atherosklerotischen Plaque in den 9 analysierten Gruppen und in Abbildung 15B ist die durchschnittliche Zellzahl pro mm² Plaquefläche in denselben Gruppen dargestellt.

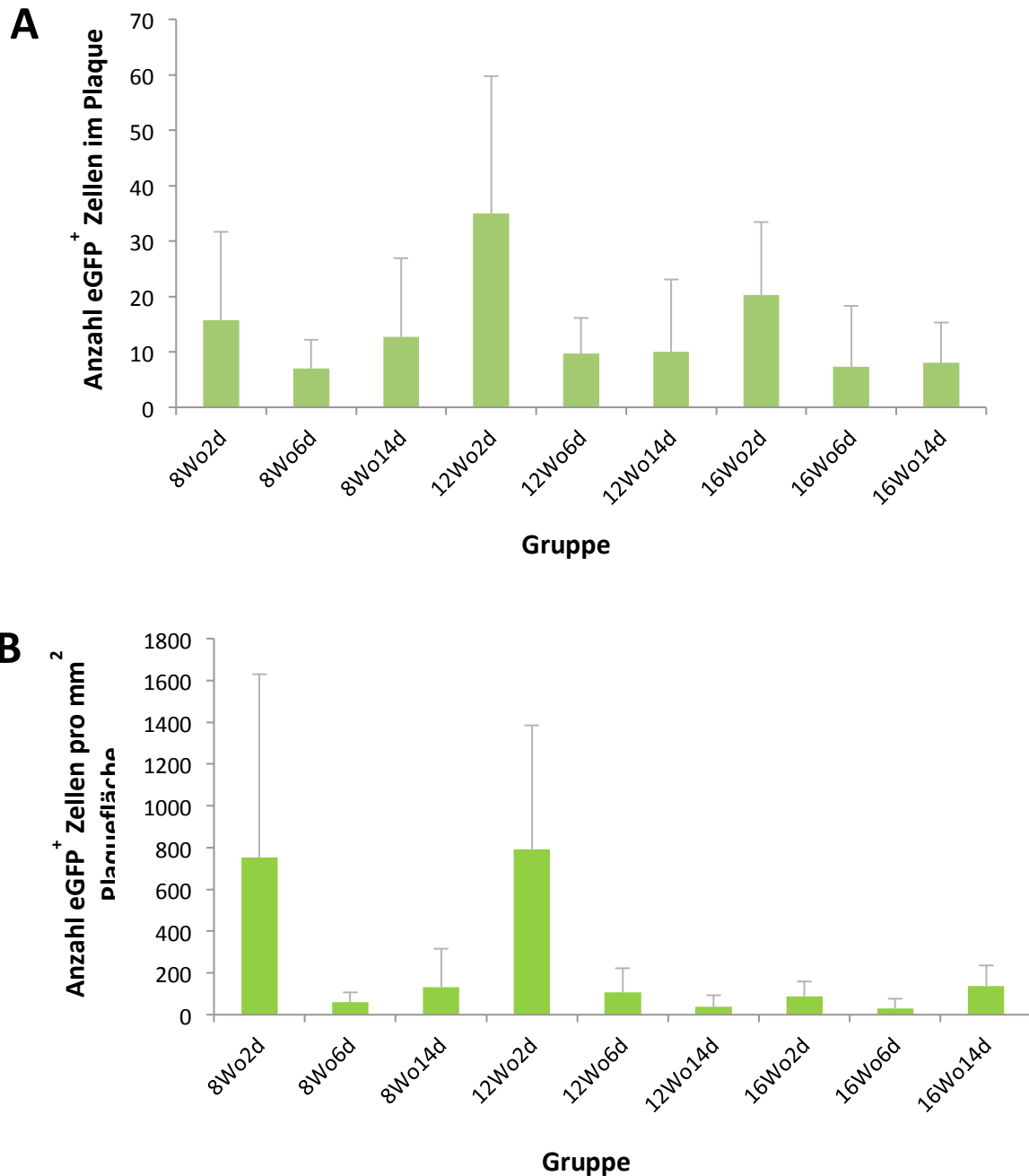


Abbildung 15:

A) Darstellung der durchschnittlichen Anzahl MHCII-eGFP-positiver Zellen in atherosklerotischen Plaques ApoE-defizienter Mäuse, welche 8, 12 oder 16 Wochen lang eine cholesterinreiche Diät erhielten und 2, 6 bzw. 14 Tage nach Applikation von 5000 KSL-Zellen des MHCII-eGFP-Stammes geopfert wurden

B) Darstellung der durchschnittlichen Anzahl MHCII-eGFP-positiver Zellen bezogen auf 1 mm² Plaquefläche in atherosklerotischen Plaques ApoE-defizienter Tiere, die 8, 12 oder 16 Wochen lang mit cholesterinreicher Nahrung angefüttert wurden und 2, 6 bzw. 14 Tage nach Applikation von 5000 KSL-Zellen des MHCII-eGFP-Stammes geopfert wurden

In der 8-Wochen-Gruppe fanden sich nach 2 Tagen absolut gesehen 15.7 ± 16.0 (Mittelwert \pm Standardabweichung) Zellen im Plaque. 6 Tage nach Zellinjektion wurden in dieser Gruppe 7.0 ± 5.2 Zellen gezählt und nach 14 Tagen konnte man 12.7 ± 14.2 Zellen in den atherosklerotischen Plaques detektieren. In der 12-Wochen-Gruppe wurden 2 Tage nach KSL-Zellinjektion im Mittel 35.0 ± 24.8 grün fluoreszierende Zellen im Plaque gefunden, nach 6 Tagen wurden 9.7 ± 6.4 und nach 14 Tagen 10.0 ± 13.1 Zellen im Plaque gezählt. In der 16-Wochen-Gruppe konnten schließlich 2 Tage nach KSL-Zellapplikation 20.3 ± 13.1 Zellen im Plaque nachgewiesen werden, nach 6 Tagen wurden 7.3 ± 11.0 Zellen und nach 14 Tagen 8.0 ± 7.3 Zellen in den atherosklerotischen Plaques gezählt (siehe Abbildung 15A).

In einem zweiten Schritt wurden die gezählten Zellen in jeder Gruppe auf die jeweilige Plaquefläche bezogen, wobei sich folgende Werte ergaben: Für die Gruppe, in welcher die Mäuse 8 Wochen lang eine cholesterinreiche Diät erhielten, wurden zum Analysezeitpunkt 2 Tage nach KSL-Zellapplikation im Mittel 754 ± 875 grün fluoreszierende Zellen pro mm^2 Plaquefläche gemessen, 6 Tage nach Zellapplikation wurden 60 ± 47 Zellen pro mm^2 Plaquefläche und 14 Tage nach Zellapplikation 133 ± 182 Zellen pro mm^2 Plaquefläche detektiert. In der 12-Wochen-Gruppe fand man nach 2 Tagen 792 ± 593 Zellen pro mm^2 Plaquefläche, nach 6 Tagen 108 ± 114 Zellen pro mm^2 Plaquefläche und nach 14 Tagen 38 ± 54 Zellen pro mm^2 Plaquefläche. Bei der Auswertung der 16-Wochen-Gruppe zeigten sich 2 Tage nach KSL-Zellapplikation 87 ± 73 Zellen pro mm^2 Plaquefläche und 6 Tage nach Zellapplikation 31 ± 47 grün fluoreszierende Zellen pro mm^2 Plaquefläche. 14 Tage nach Zellapplikation wurden 138 ± 98 Zellen pro mm^2 Plaquefläche detektiert (siehe Abbildung 15B).

Es zeigte sich, dass applizierte KSL-Zellen bereits 2 Tage nach intravenöser Applikation als MHCII-eGFP-positive Zellen in atherosklerotischen Plaques zu finden waren und zu diesem analysierten Zeitpunkt ihren Höhepunkt erreichten. Im Vergleich dazu war die Anzahl rekrutierter MHCII-eGFP-positiver Zellen sowohl 6 Tage als auch 14 Tage nach Applikation deutlich niedriger. Diese beobachtete Tendenz führte dazu, die Anzahl der Zellen 2, 6 und 14 Tage nach Zellapplikation unabhängig von der Dauer der Cholesterinfütterung zu analysieren. Das Ergebnis zeigt Abbildung 16.

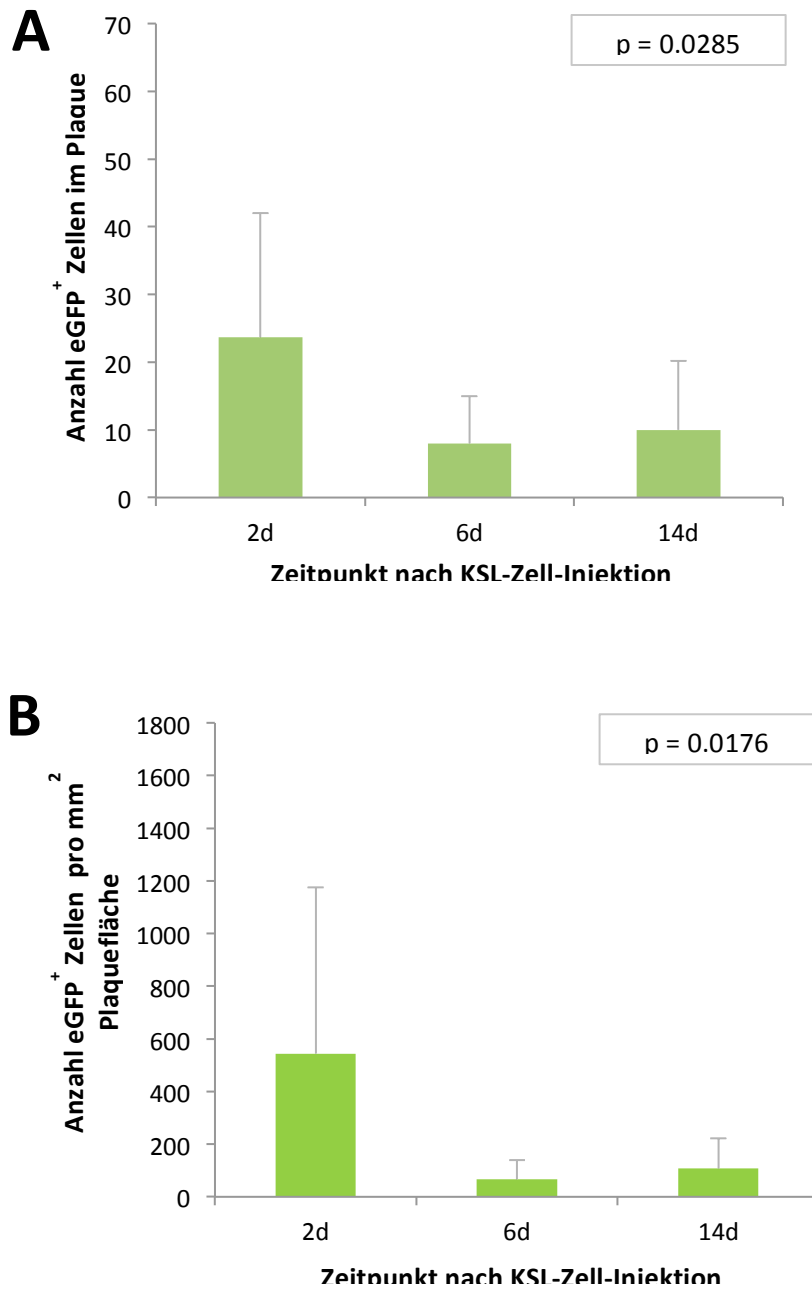


Abbildung 16:

A) Darstellung der durchschnittlichen Anzahl der absolut gezählten grün fluoreszierenden Zellen in den atherosklerotischen Plaques ApoE-defizienter Mäuse 2, 6 und 14 Tage nach Injektion von 5000 KSL-Zellen des MCHI-eGFP-Stammes

B) Darstellung der durchschnittlichen Anzahl der gezählten MHCII-eGFP-positiven Zellen im atherosklerotischen Plaque ApoE-defizienter Mäuse bezogen auf 1 mm² Plaquefläche in den Gruppen 2, 6 und 14 Tage nach KSL-Zellapplikation

Für diese Analyse wurden drei Gruppen gebildet und miteinander verglichen, welche sich, wie bereits erwähnt, durch den Zeitpunkt der Opferung nach Applikation von KSL-Zellen unterscheiden. Die 2-Tage-Gruppe und die 6-Tage-Gruppe enthalten je neun Mäuse, wobei jeweils drei Tiere für 8 Wochen, 12 Wochen bzw. 16 Wochen ein cholesterinreiches Futter erhielten. Die 16-Tage-Gruppe besteht aus zehn Tieren, wobei jeweils drei Mäuse 8 Wochen bzw. 12 Wochen lang mit einer cholesterinreichen Diät angefüttert wurden und vier Tiere für 16 Wochen eine solche Nahrung erhielten. Die unterschiedliche Dauer der Cholesterinfütterung ist somit in den zu untersuchenden Gruppen annähernd gleich. Es wurden nun in diesen Gruppen die Anzahl der eGFP-positiven Zellen in den atherosklerotischen Plaques miteinander verglichen.

Abbildung 16A zeigt, dass 2 Tage nach Applikation von KSL-Zellen aus MHCII-eGFP-Mäusen in ApoE-defiziente Empfängertiere im Mittel 23.7 ± 18.3 grün fluoreszierende Zellen in den atherosklerotischen Plaques detektiert werden konnten. 6 Tage nach KSL-Zell-Applikation zeigten sich 8.0 ± 7.0 Zellen und nach 14 Tagen fand man 10.0 ± 10.2 grün fluoreszierende Zellen in den Plaques (vgl. Abbildung 16A). Diese Mittelwerte waren signifikant unterschiedlich (p -Wert = 0.0285). Allerdings zeigte sich ein signifikanter Unterschied nur zwischen der 2-Tage- und der 6-Tage-Gruppe ($p = 0.0292$). Der p -Wert des Vergleiches der 2-Tage-Gruppe mit der 14-Tage-Gruppe lag bei 0.0577, so dass der Unterschied nicht eindeutig signifikant ist. Die Mittelwerte der 6-Tage-Gruppe und der 14-Tage-Gruppe unterschieden sich nicht ($p = 0.6289$).

Die absoluten Zellzahlen wurden anschließend auf die jeweilige gemessene Plauefläche bezogen und ergaben folgende Werte pro mm^2 Plauefläche, wie in Abbildung 16B dargestellt. In der 2-Tages-Gruppe wurden 544 ± 631 MHCII-eGFP-positive Zellen pro mm^2 Plauefläche und in der 6-Tages-Gruppe 66 ± 74 Zellen pro mm^2 Plauefläche bestimmt. 14 Tage nach intravenöser Zellapplikation befanden sich in den Plaques 107 ± 116 grün fluoreszierende Zellen pro mm^2 Plauefläche. Der One Way ANOVA-Test zeigte, dass auch diese Unterschiede in den 3 Gruppen statistisch signifikant unterschiedlich sind ($p = 0.0176$). Im Einzelnen ergaben sich signifikante Unterschiede der Anzahl der eGFP-positiven Zellen pro mm^2 Plauefläche zwischen der 2-Tage-Gruppe und der 6-Tage-Gruppe ($p = 0.0385$) und zwischen der 2-Tage-Gruppe und der 14-Tage-Gruppe ($p = 0.0456$).

Die Mittelwerte der 6-Tage-Gruppe und der 14-Tage-Gruppe unterschieden sich nicht statistisch signifikant ($p = 0.3845$).

Die Analyse dieser drei Gruppen bestätigte die anfangs beobachtete Tendenz, dass die Anzahl der eGFP-positiven Zellen in den atherosklerotischen Plaques vom Zeitpunkt nach KSL-Zellinjektion abhängig ist und dass sich die meisten Zellen bereits 2 Tage nach intravenöser Applikation von KSL-Zellen in den Plaques finden lassen.

In einer sich anschließenden Auswertung wurde geprüft, ob sich die Anzahl der detektierten grün fluoreszierenden Zellen mit der Dauer der Cholesterinfütterung ändert. Hierbei wurde die Zeit nach KSL-Zellapplikation außer Acht gelassen und es ergaben sich die drei Gruppen 8 Wochen, 12 Wochen und 16 Wochen mit jeweils $n=9-10$ Tieren. Die 8-Wochen- und die 12-Wochen-Gruppe bestehen aus je neun Mäusen, wobei jeweils drei Tiere 2 Tage, 6 Tage bzw. 14 Tage nach KSL-Zellinjektion geopfert wurden. Die 16-Wochen-Gruppe enthält zehn Tiere, wobei jeweils drei Mäuse 2 Tage bzw. 6 Tage nach KSL-Zellapplikation und vier Tiere 14 Tage nach KSL-Zellinjektion analysiert wurden. Die unterschiedlichen Zeitpunkte der Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen sind somit in den zu untersuchenden Gruppen annähernd gleich. Es wurde wiederum die Anzahl der eGFP-positiven Zellen im atherosklerotischen Plaque und pro mm^2 Plaquefläche in den einzelnen Gruppen miteinander verglichen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 17.

Bei der Auswertung fiel auf, dass die durchschnittliche Anzahl der absolut gezählten Zellen in den atherosklerotischen Plaques in den drei Gruppen sehr ähnlich ist. Bei den Mäusen, die 8 Wochen lang cholesterinreiche Nahrung erhalten hatten, ließen sich im Mittel 11.8 ± 11.6 grün fluoreszierende Zellen in den Plaques detektieren. In der 12-Wochen-Gruppe fanden sich 18.2 ± 19.1 MHCII-eGFP-positive Zellen und in der 16-Wochen-Gruppe konnten 11.5 ± 10.9 Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 17A). Der One Way ANOVA-Test ermittelte einen p-Wert von 0.5287, so dass die Unterschiede in den einzelnen Gruppen nicht statistisch signifikant sind.

Nach Bezug der gezählten Zellen auf die Plaquefläche ergaben sich folgende Werte: In der 8-Wochen-Gruppe zeigten sich im Mittel 316 ± 556 grün fluoreszierende Zellen pro mm^2 Plaquefläche, in der 12-Wochen-Gruppe wurden 313 ± 471 Zellen pro mm^2 Plaquefläche bestimmt und in der 16-Wochen-Gruppe konnten 91 ± 84 Zellen pro

mm² Plaquefläche nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 17B). Auch hier zeigt der One Way ANOVA-Test, dass die Ergebnisse nicht statistisch signifikant sind ($p = 0.4075$).

Somit zeigt sich, dass die Dauer der Cholesterinfütterung keinen Einfluss auf die detektierte Anzahl eGFP-positiver Zellen in den atherosklerotischen Plaques hat.

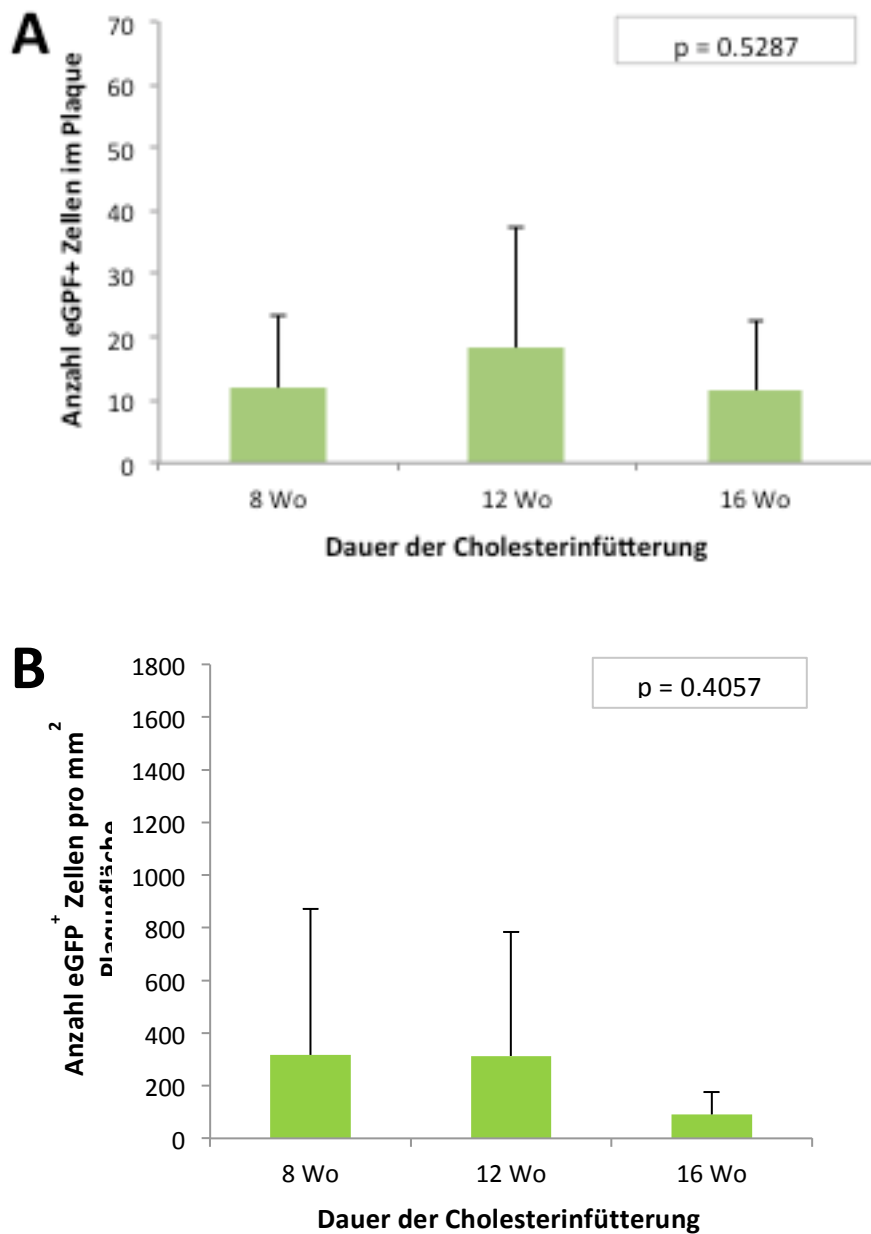


Abbildung 17:

A) Durchschnittliche Anzahl grün fluoreszierender Zellen in atherosklerotischen Plaques ApoE-defizienter Mäuse, welche 8 Wochen, 12 Wochen bzw. 16 Wochen lang eine cholesterinreiche Nahrung erhalten hatten, unabhängig von der Zeit nach Injektion von 5000 KSL-Zellen des MHCII-eGFP-Stammes

B) Durchschnittliche Anzahl grün fluoreszierender Zellen pro mm² Plaquefläche in atherosklerotischen Plaques ApoE-defizienter Mäuse, welche 8 Wochen, 12 Wochen bzw. 16 Wochen mit cholesterinreicher Diät angefüttert wurden, unabhängig von der Zeit nach Injektion von 5000 KSL-Zellen des MHCII-eGFP-Stammes

Die Anzahl der eGFP-positiven Zellen wurde nicht nur im Plaque der Aortenbögen, sondern auch in der Adventitia derselben atherosklerotisch veränderten Gefäße ermittelt. Abbildung 18 zeigt die durchschnittliche Zellzahl in den neun ursprünglichen Gruppen, die sich sowohl in der Dauer der Cholesterinfütterung, als auch in der Zeit nach Applikation der KSL-Zellen des MHCII-eGFP-Stammes unterscheiden (n=3-4).

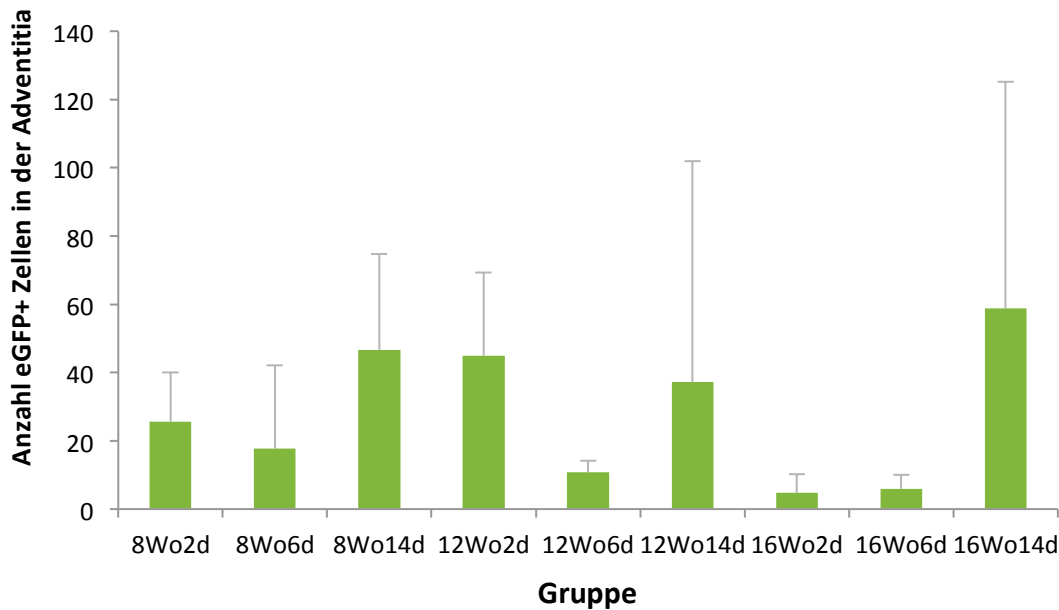


Abbildung 18:

Darstellung der durchschnittlichen Anzahl der detektierten grün fluoreszierenden Zellen in der Adventitia atherosklerotisch veränderter Aorten von ApoE-Knockout-Mäusen, die 8, 12 oder 16 Wochen lang eine cholesterinreiche Nahrung erhalten hatten und 2, 6 bzw. 14 Tage nach Applikation von 5000 KSL-Zellen des MHCII-eGFP-Stammes geopfert wurden

In der 8-Wochen-Gruppe ließen sich 2 Tage nach intravenöser Injektion von 5000 KSL-Zellen des MHCII-eGFP-Stammes im Mittel 25.7 ± 14.3 Zellen in der Adventitia zählen. 6 Tage nach KSL-Zellapplikation fanden sich 17.7 ± 24.5 grün fluoreszierende Zellen, und 14 Tage danach 46.7 ± 28.0 MHCII-eGFP-Zellen. In der 12-Wochen-Gruppe wurden nach 2 Tagen 45 ± 24.4 Zellen, nach 6 Tagen 10.7 ± 3.5 Zellen und nach 14 Tagen 37.3 ± 64.7 grün fluoreszierende Zellen in der Adventitia gezählt. In der Gruppe, die 16 Wochen lang eine cholesterinreiche Nahrung erhalten

hatte, ließen sich 2 Tage nach Zellapplikation 4.7 ± 5.5 MHCII-eGFP-positive Zellen in der Adventitia finden, nach 6 Tagen konnten 6.0 ± 4.0 Zellen detektiert werden und nach 14 Tagen wurden 58.8 ± 66.4 MHCII-eGFP-positive Zellen in der Adventitia nachgewiesen. Aufgrund der niedrigen Anzahl von Tieren pro Gruppen, wurde kein statistischer Test zur Überprüfung der Ergebnisse durchgeführt.

Man erkennt eine Tendenz, dass in der Adventitia die meisten Zellen jeweils 14 Tage nach Zellinjektion detektiert werden konnten. Wie bei der Analyse der Zellzahlen im Plaque wurden auch hier die einzelnen Tiere zu Obergruppen zusammengefasst, die sich nur hinsichtlich der Zeit nach KSL-Zellapplikation unterscheiden, unabhängig von der Dauer der vorangegangenen Cholesterinfütterung. Es ergaben sich wiederum drei Gruppen, 2 Tage, 6 Tage und 14 Tage, mit $n=9-10$ Tieren. Jeweils neun Tiere befanden sich in der 2-Tage- und 6-Tage-Gruppe mit jeweils drei Mäusen, die 8, 12 bzw. 16 Wochen lang cholesterinreiches Futter erhielten. Die 14-Tage-Gruppe enthielt zehn Tiere, wobei jeweils drei Mäuse 8 bzw. 12 Wochen lang cholesterinreiche Nahrung erhalten hatten und vier Mäuse 16 Wochen lang mit cholesterinreicher Diät gefüttert wurden. Die unterschiedliche Dauer der Cholesterinfütterung ist somit in den drei Gruppen annähernd gleich. Es wurden die eGFP-positiven Zellen in der Adventitia in den einzelnen Gruppen miteinander verglichen. Das Ergebnis dieser Auswertung zeigt Abbildung 19.

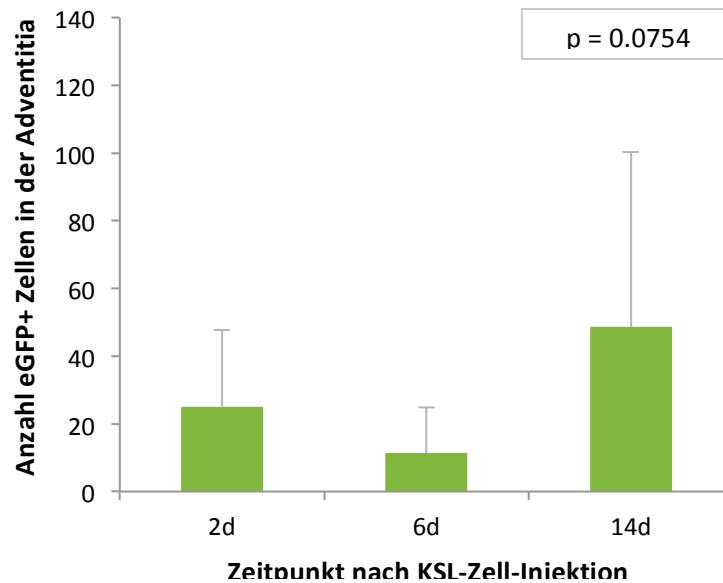


Abbildung 19:

Darstellung der durchschnittlichen Anzahl der in der Adventitia von atherosklerotisch veränderter Aorten detektierten MHCII-eGFP-positiven Zellen 2, 6 bzw. 14 Tage nach Applikation von 5000 KSL-Zellen des MHCII-eGFP-Stammes in ApoE-defiziente Empfängertiere

In der Adventitia atherosklerotisch veränderter Aorten der ApoE-defizienten Empfängertiere ließen sich 2 Tage nach der Injektion von 5000 KSL-Zellen des MHCII-eGFP-Stammes im Mittel 25.1 ± 22.7 grün fluoreszierende Zellen zählen. In der Gruppe, die 6 Tage nach Zellapplikation analysiert wurde, fanden sich durchschnittlich 11.4 ± 13.5 MHCII-eGFP-positiv Zellen und in der 14-Tages-Gruppe 48.7 ± 51.6 Zellen. Der One Way ANOVA-Test zeigte, dass die Unterschiede in den einzelnen Gruppen bei einem p-Wert von 0.0754 nur grenzwertig signifikant sind. Um eine genauere Aussage zur statistischen Signifikanz zu erhalten, wurden jeweils zwei Gruppen mit T-Tests miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich ein fraglich signifikanter Unterschied zwischen der 6-Tage-Gruppe und der 14-Tage-Gruppe ($p = 0.0514$). Die Anzahl der eGFP-positiven Zellen in der Adventitia zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen der 2-Tage-Gruppe und der 6-Tage-Gruppe ($p = 0.1399$) und auch nicht zwischen der 2-Tage-Gruppe und der 14-Tage-Gruppe ($p = 0.2236$).

Diese Ergebnisse können demnach nicht bestätigen, dass die Anzahl der eGFP-positiven Zellen in der Adventitia der atherosklerotisch veränderten Gefäße vom Zeitpunkt nach KSL-Zellinjektion beeinflusst wird.

Zur Vervollständigung der Analyse wurden wie bei der Auswertung der Zellzahlen im atherosklerotischen Plaque die Anzahl der MHCII-eGFP-positiven Zellen in Abhängigkeit von der Dauer der Cholesterinfütterung untersucht. Es ergeben sich wiederum die drei Gruppen 8 Wochen, 12 Wochen und 16 Wochen mit n=9-10 Tieren. Die 8-Wochen- und die 12-Wochen-Gruppe bestehen aus je neun Mäusen, wobei jeweils drei Tiere 2 Tage, 6 Tage bzw. 14 Tage nach KSL-Zellinjektion geopfert wurden. Die 16-Wochen-Gruppe enthält zehn Tiere, wobei jeweils drei Mäuse 2 Tage bzw. 6 Tage nach KSL-Zellapplikation und vier Tiere 14 Tage nach KSL-Zellinjektion untersucht wurden. Die unterschiedlichen Zeitpunkte nach KSL-Zell-Injektion sind somit in den zu untersuchenden Gruppen annähernd gleich. Die Anzahl der eGFP-positiven Zellen in der Adventitia wurde in den drei Gruppen gezählt und die Werte miteinander verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 20 zu sehen.

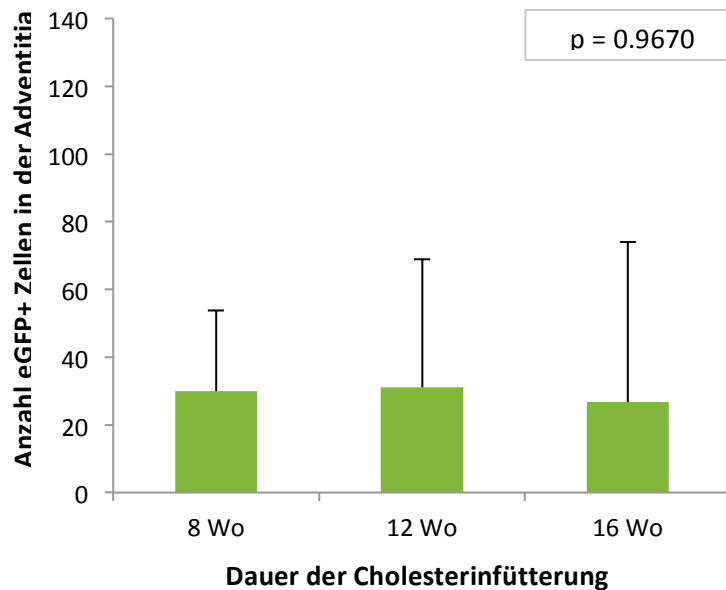


Abbildung 20:

Darstellung der Anzahl der gezählten grün fluoreszierenden Zellen in der Adventitia atherosklerotisch veränderter Aorten von 8, 12 bzw. 16 Wochen mit cholesterinreicher Nahrung gefütterten ApoE-Knockout-Empfängertieren, unabhängig von der Zeit nach Injektion von 5000 KSL-Zellen des MHCII-eGFP-Stammes

Wie bereits bei der Analyse der Zellzahlen im Plaque, ist die durchschnittliche Anzahl der unter dem Fluoreszenzmikroskop detektierten Zellen auch in der Adventitia in diesen drei Gruppen sehr ähnlich. In der 8-Wochen-Gruppe zeigten sich im Mittel 30.0 ± 28.8 Zellen, in der 12-Wochen-Gruppe konnten 31.0 ± 38.0 grün fluoreszierende Zellen und in der 16-Wochen-Gruppe 26.7 ± 47.4 Zellen in der Adventitia nachgewiesen werden. Der One Way ANOVA-Test zeigt, dass die Unterschiede in diesen Gruppen nicht statistisch signifikant sind ($p = 0.9670$).

Somit hat die Dauer der Cholesterinfütterung keinen Einfluss auf die Anzahl der eGFP-positiven Zellen in der Adventitia atherosklerotisch veränderter Gefäße.

Zusammenfassend zeigen all diese Ergebnisse, dass in MHCII-positive Zellen differenzierte KSL-Zellen vorwiegend 2 Tage nach intravenöser Applikation in den atherosklerotischen Plaques der Aorten ApoE-defizienter Empfängertiere detektiert werden können. Es konnte statistisch nicht nachgewiesen werden, dass das Maximum in der Adventitia dieser Aorten 14 Tage nach Zelladministration erreicht

wird, auch wenn die anfängliche Analyse eine Tendenz dazu aufweist. Was die Dauer der Cholesterinfütterung betrifft, so weisen die durchschnittlichen Zahlen der nachgewiesenen Zellen weitgehend ähnliche Werte auf, ganz gleich ob die Tiere 8 Wochen, 12 Wochen oder 16 Wochen lang mit cholesterinreicher Nahrung gefüttert wurden.

5.3. Betrachtung des Migrationsverhaltens der differenzierten eGFP-positiven Zellen im Lymphknoten

Da die aus den injizierten KSL-Zellen entstandenen eGFP-positiven Zellen am ehesten in den sekundär lymphatischen Organen der Empfängermaus erwartet wurden, erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung des eGFP auch in den Lymphknoten. Während der Auswertung dieser in erster Linie als Kontrolle der Methode gedachten Färbungen war aufgefallen, dass sich die eGFP-positiven Zellen nicht über den gesamten Schnitt verteilten, sondern in bestimmten Regionen gehäuft anzufinden waren. Dies wurde zum Anlass genommen, diese Regionen genauer zu bestimmen und die Beziehung der eGFP-positiven Zellen zu den Lymphfollikeln zu betrachten. Da diese vor allem aus B-Lymphozyten bestehen, konnten sie durch Anfärben des Antigens B220 sichtbar gemacht werden. Als Positivkontrolle für diese Färbung wurden Schnitte aus Milzen von MHCII-eGFP-Tieren verwendet, bei denen ein deutliches Signal für eGFP und B220 nachgewiesen werden konnte. Als Kontrolle dienten mit Isotyp-Antikörpern gefärbte Präparate.

Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis dieser Immunfluoreszenzdoppelfärbung. Die eGFP-positiven Zellen wurden einerseits im Randbereich des Lymphknotens in der Nähe der Lymphfollikel, in den sogenannten parakortikalen Regionen, sowie andererseits auch in der Hilusregion gehäuft detektiert. Bei dieser Färbung konnte man auch erkennen, dass das Antigen B220 auf den eGFP-positiven Zellen nicht nachzuweisen war (vgl. Abbildung 21).

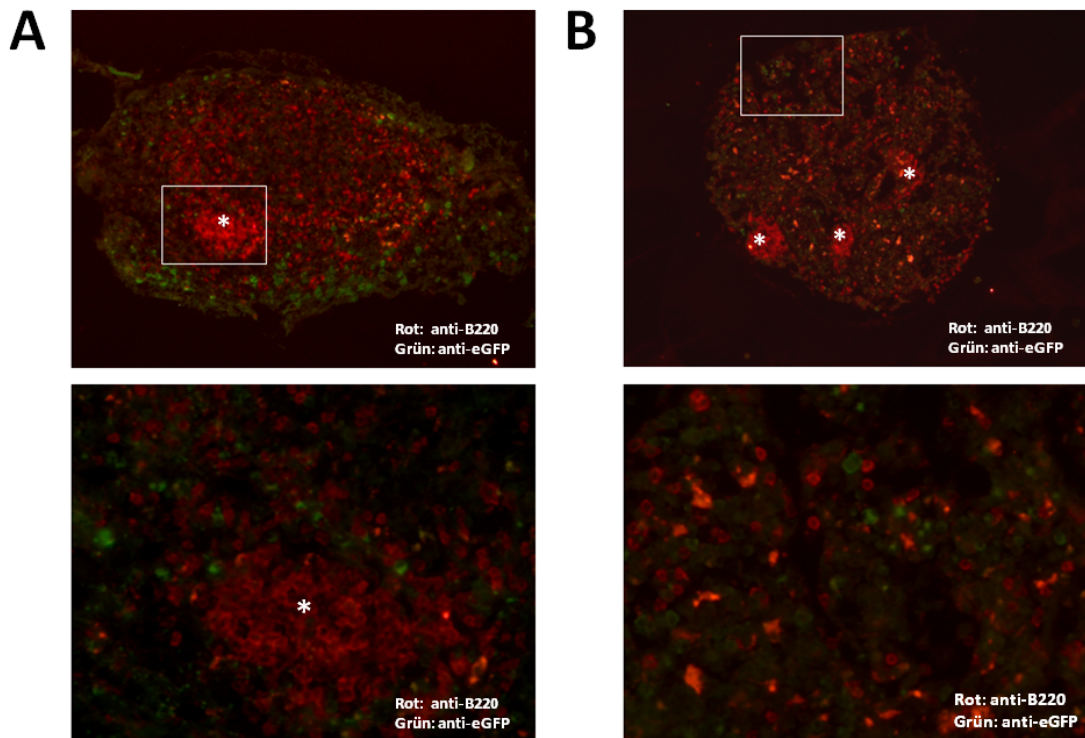


Abbildung 21: MHCII-eGFP-positive Zellen im Lymphknoten

Die Abbildung zeigt die fluoreszenzmikroskopische Detektion von B220-positiven Lymphfollikeln (*) sowie von MHCII-eGFP-positiven Zellen in Lymphknoten von 12 Wochen (A) bzw. 16 Wochen (B) angefügterten ApoE-Knockout-Mäusen jeweils 6 Tage nach Erhalt von 5000 KSL-Zellen aus dem MHCII-eGFP-Stamm. Der in der oberen Hälfte der Teilabbildungen weiß eingerahmte Bereich ist jeweils in der unteren Hälfte vergrößert dargestellt. B220-positive Zellen leuchten rot, wohingegen MHCII-eGFP-positive Zellen ein grünes Signal aufweisen.

A) Nachweis von MHCII-eGFP-positiven Zellen in engem Bezug zu den B220-positiven Lymphfollikeln eines Lymphknotens

B) Detektion der MHCII-eGFP-positiven Zellen in der Hilusregion eines Lymphknotens

5.4. Untersuchung der Proliferation der injizierten KSL-Zellen in den atherosklerotischen Plaques

Nachdem Versuche zur Migration der HSPCs in atherosklerotische Läsionen und in Lymphknoten gemacht wurden und die Differenzierung dieser Zellen analysiert wurde, blieb die Frage offen, ob eine Proliferation der Vorläuferzellen in den atherosklerotischen Plaques möglich ist. Dazu wurde zunächst überprüft, ob aus HSPCs entstandene MHCII-eGFP-positive Zellen im atherosklerotischen Plaque proliferieren. Anschließend wurde unter Zuhilfenahme von Mäusen des β -Aktin-eGFP-Stammes untersucht, ob in den atherosklerotischen Läsionen überhaupt eine Proliferationstätigkeit eingewanderter Zellen nachgewiesen werden kann.

Es wurden Immunfluoreszenzdoppelfärbungen der Aortenbögen aus ApoE-Knockout-Tieren angefertigt, welche KSL-Zellen aus MHCII-eGFP-Spendertieren erhalten hatten. Für diese Färbungen wurden Antikörper gegen eGFP und ki-67 verwendet, wobei das letztgenannte Antigen nur in proliferierenden Zellen während der Mitose synthetisiert wird und in ruhenden, sich nicht teilenden Zellen nicht exprimiert wird.⁸⁶ Als Positivkontrolle für die ki-67-Färbung wurden Schnitte des Darms von ApoE-Knockout-Tieren verwendet, welche in den Krypten ein positives Signal aufwiesen. IgG-Isotyp-Antikörper dienten als Kontrolle.

In den angefärbten Schnitten konnte im Plaque eine Expression von ki-67 auf einigen Zellen nachgewiesen werden. Diese Zellen waren jedoch nicht gleichzeitig eGFP-positiv und umgekehrt (vgl. Abbildung 22A). In einer daraufhin durchgeführten Doppelfärbung der Milz eines MHCII-eGFP-Spendertieres konnte man die eGFP-positiven Zellen deutlich von den rot angefärbten, ki-67-positiven Zellen unterscheiden und fand ebenfalls keine Zelle, welche beide Marker trug (vgl. Abbildung 22B).

Daraufhin wurden Versuche durchgeführt, bei denen Tiere des β -Aktin-eGFP-Mausstammes als Spender für die KSL-Zellen herangezogen wurden. Da β -Aktin ein ubiquitär exprimiertes Protein ist, werden den Empfängertieren bei dieser Versuchsplanung also fluoreszierende KSL-Zellen injiziert. Diese konnten im Empfängerorganismus unabhängig von ihrem Differenzierungsgrad nachgewiesen werden. Mit dieser Methode sollte untersucht werden, ob in den atherosklerotischen

Läsionen überhaupt eine Proliferationstätigkeit eingewanderter Spenderzellen gefunden werden kann. Es wurden mehrere Färbungen angefertigt, in denen zu den untersuchten Zeitpunkten 2, 6 bzw. 14 Tage nach KSL-Zellinjektion keine doppelt positive Zelle nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 23).

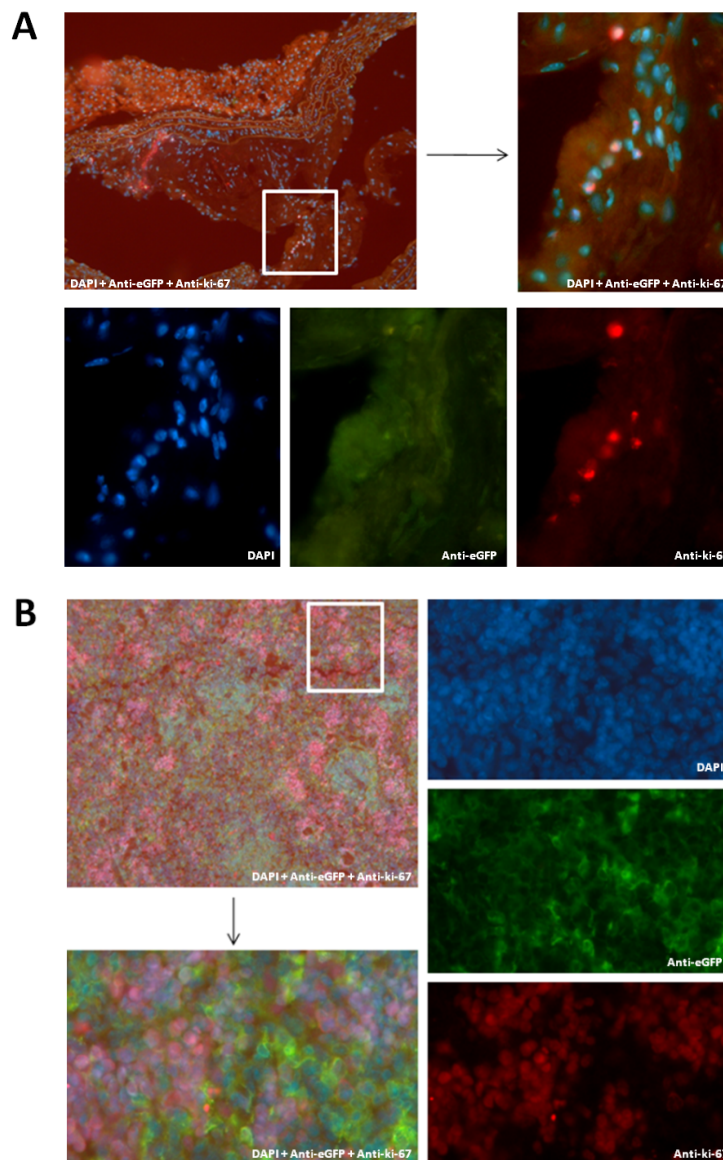


Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbung von eGFP und ki-67 nach Injektion von 5000 KSL-Zellen aus dem MHCII-eGFP-Stamm

A) Die Abbildung zeigt eine beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Anfärbung von eGFP und ki-67 in der Aorta einer 12 Wochen angefügterten ApoE-Knockout-Maus nach Injektion von 5000 KSL-Zellen aus dem MHCII-eGFP-Stamm (links oben). Der weiß eingerahmte Bezirk ist rechts daneben vergrößert dargestellt. In der unteren Reihe der Abbildung ist ebenfalls die Vergrößerung des weiß eingerahmten Bereiches dargestellt. Links erkennt man die Zellkerne durch die Anfärbung mit DAPI, in der Mitte erkennt man anti-eGFP-positive Zellen und rechts sind anti-ki-67-positive Zellen zu sehen.

B) Dargestellt ist beispielhaft eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Anfärbung von eGFP und ki-67 in der Milz eines MHCII-eGFP-Spendertieres (oben links). Der weiß eingerahmte Bezirk ist unterhalb dieser Teilabbildung vergrößert zu sehen. Die rechte Spalte zeigt ebenfalls den weiß eingerahmten Ausschnitt, wobei die Signale einzeln dargestellt sind. Oben sind die Zellkerne mittels DAPI zu sehen, in der Mitte erkennt man anti-eGFP-positive Zellen und unten sind anti-ki-67-positive Zellen zu finden.

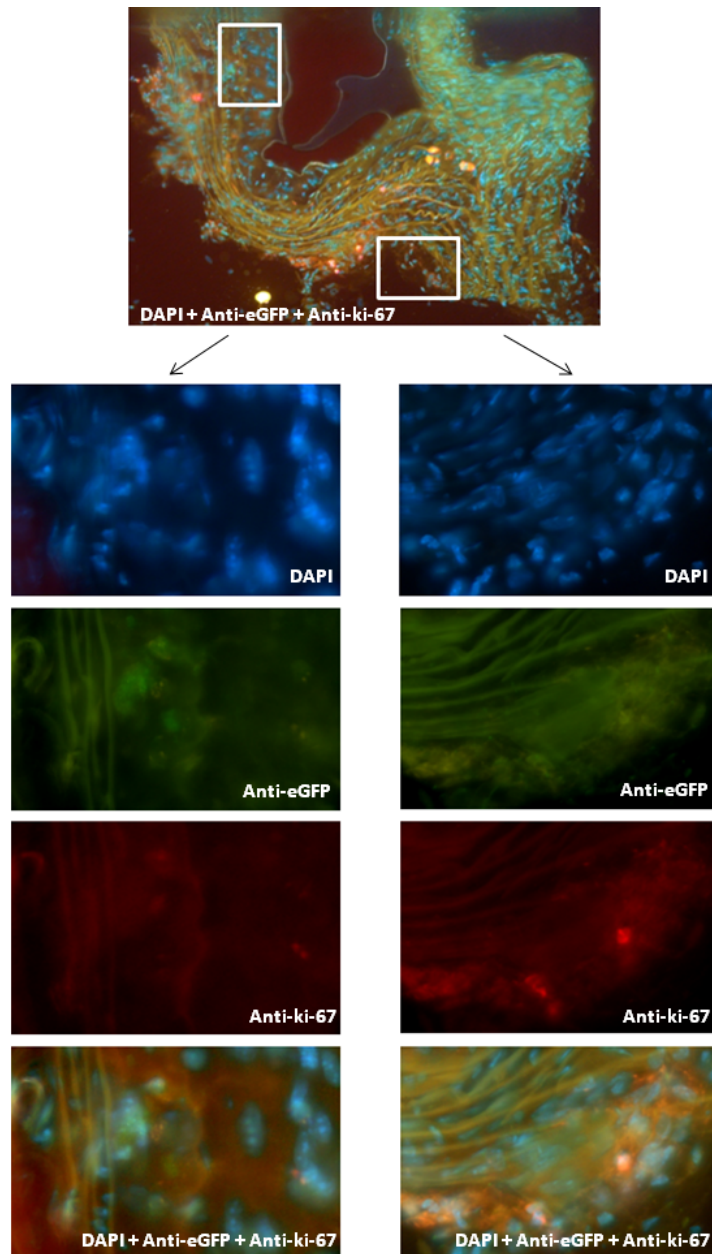


Abbildung 23: Immunfluoreszenzfärbung von eGFP und ki-67 nach Injektion von 50000 KSL-Zellen aus dem β -Aktin-eGFP-Stamm

Die Abbildung zeigt eine beispielhafte Aufnahme der Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten der Aorta einer 16 Wochen mit cholesterinreicher Nahrung gefütterten ApoE-defizienten Maus 2 Tage nach Injektion von 50000 KSL-Zellen aus dem β -Aktin-eGFP-Stamm. In der Übersichtsaufnahme (oben) erkennt man zwei weiß eingerahmte Bezirke, welche im unteren Teil der Abbildung jeweils vergrößert dargestellt sind. Man erkennt in der linken Spalte die einzelnen Signale des links im Übersichtsbild eingerahmten Bereichs und in der rechten Spalte die einzelnen Fluoreszenzen des rechts im Übersichtsbild markierten Ausschnittes. Von oben nach unten sind sieht man jeweils die Anfärbung der Zellkerne mit DAPI, die Immunfluoreszenzfärbungen von eGFP und ki-67 und die Überlagerung dieser drei Fluoreszenzen.

6 DISKUSSION

Im Jahr 2007 veröffentlichten Massberg et al. eine Publikation, in der beschrieben wurde, dass hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSPCs) die Fähigkeit besitzen, aus dem Knochenmark über das Blut zu peripheren Organen zu wandern und über die Lymphflüssigkeit zu ihren Nischen im Knochenmark zurückzukehren. Darüber hinaus wurde in dieser Veröffentlichung postuliert, dass sich die Vorläuferzellen in den extramedullären Geweben zu Leukozyten, vornehmlich Dendritischen Zellen, differenzieren können.⁵⁶

Im Rahmen des hier vorliegenden Projektes wurde daher untersucht, ob im Falle einer chronischen vaskulären Entzündung nicht nur differenzierte Entzündungszellen an den Ort der Inflammation gelangen, sondern auch eine Rekrutierung von zirkulierenden HSPCs stattfindet. Als Beispiel hierfür wurde die Atherosklerose gewählt, bei der eine Beteiligung verschiedener Immunzellen nachgewiesen ist.^{79,97} Mit Hilfe von in-vitro- und in-vivo-Versuchen wurde untersucht, ob eine Migration von HSPCs zu den atherosklerotisch veränderten Gefäßregionen stattfindet und ob sich diese Vorläuferzellen lokal zu verschiedenen Immunzellen weiterentwickeln können. Es wurde somit die Hypothese analysiert, dass lokale Entzündungszellen nicht nur in differenzierter Form an den Ort des Geschehens einwandern, sondern auch hämatopoetische Vorläuferzellen an der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion beteiligt sind, in dem sie sich vor Ort in Antigen-präsentierende Zellen weiterentwickeln.

6.1. Charakterisierung der Colony Forming Units aus Blut und Aorta

Um eine mögliche Beteiligung von HSPCs am Prozess der Atherosklerose zu prüfen, wurden im ersten Abschnitt des Projektes Colony Forming Unit (CFU) Assays aus atherosklerotischen Aorten von ApoE-Knockout-Mäusen und aus deren Blut durchgeführt (eine detaillierte Beschreibung des Versuchsaufbaus wird in der Dissertation von Frau Zuzana Hajdu, Medizinische Fakultät der TU München, geschildert) und die Differenzierungskapazität der entstandenen Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie analysiert. Der gewählte

Tierstamm ist ein gängiges Modell für die Erforschung der Atherosklerose, da die Mäuse Läsionen entwickeln, die denen der humanen Atherogenese sehr ähnlich sind.⁶²

Das Prinzip der CFU Assays besteht darin, dass sich hämatopoetische Vorläuferzellen in einem speziellen Medium teilen und klonale Zellpopulationen bilden können, die jeweils aus monoklonalen Tochterzellen bestehen.^{11,69} Die Anzahl der gebildeten Kolonien gibt einen Hinweis auf den Gehalt an HSCPs in den ursprünglich ausgesäten Zellen. Die Differenzierung der Klone, z.B. in granulozytäre oder erythrozytäre Zellen, indiziert zusätzlich die Differenzierungskapazität der vorliegenden HSPCs, die je nachdem bi-, tri- oder multipotent sein kann.⁹⁶

Durch die Bildung von Zellkolonien in den durchgeführten CFU Assays konnte geschlossen werden, dass sich unter den ausgesäten Zellen aus Aorta und Blut auch hämatopoetische Vorläuferzellen befinden mussten, die zu der Entstehung dieser Zellpopulationen geführt haben. Somit konnten HSPCs sowohl aus Blut, als auch aus Aortengewebe isoliert werden. Vor allem der Nachweis von CFUs in den Versuchen mit den Aorten führte zu der Überlegung, dass im Rahmen der Atherogenese-Entstehung beteiligte Zellen auch lokal aus hämatopoetischen Vorläuferzellen entstanden sein könnten. Deshalb wurden die in den CFU Assays entstandenen Zellen auf leukozytäre Oberflächenmarker hin untersucht, um zu prüfen, welche Arten von Entzündungszellen aus den HSPCs in Aorta und Blut der ApoE-Knockout-Maus entstehen können.

Um zu überprüfen, dass der Nachweis von hämatopoetischen Vorläuferzellen in der Gefäßwand der Aorta durch die atherosklerotischen Veränderungen bedingt ist, wurden Kontrollversuche mit gesunden C57/Bl6-Mäusen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Es konnten nahezu keine koloniebildenden Zellen aus Aortenpools gesunder Mäuse detektiert werden, wogegen regelmäßig Zellen in den CFU Assays aus atherosklerotisch veränderten Aorten zu finden waren.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen und FACS-Analysen konnten auf den CFUs aus der Aorta die Antigene CD11b, MHCII, CD11c und F4/80 nachgewiesen werden. Diese werden vor allem von Zellen der myeloiden Reihe exprimiert, zu denen Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen gezählt werden. Somit war davon auszugehen, dass aus der Aorta der ApoE-defizienten Mäuse myeloide Vorläuferzellen kultiviert wurden. Daneben konnten auf einigen Zellen auch die

Antigene B220 und Ly-6G detektiert werden, die von B-Zellen bzw. Granulozyten exprimiert werden. Diese Tatsache weist darauf hin, dass die In-Vitro-Bedingungen auch eine andere Differenzierung als die der myeloiden Zellreihe zulassen.

Die Arbeitsgruppe um Julie Sainz et al. konnte Vorläuferzellen aus Aorten gesunder C57/Bl6-Mäuse isolieren, welche jedoch in Methylzellulose-haltigem Zellmedium keine hämatopoetischen Kolonien entstehen ließen. Vielmehr konnte aus diesen Vorläuferzellen die Differenzierung zu endothelialen Zellen induziert werden.⁸¹ Vaskuläre Vorläuferzellen in der Adventitia von Gefäßen ApoE-defizienter Mäuse wurden auch von Hu et al. beschrieben. Sie scheinen nicht dem Knochenmark zu entstammen und können sich zu glatten Muskelzellen und Endothelzellen weiterentwickeln.³⁶ Desweiteren konnten Montfort et al. im Jahr 2002 zeigen, dass sich in adulten Blutgefäßen Zellen befinden, welche in einem Empfängerorganismus hämatopoetische Vorläuferzellen gegen Bestrahlungsschäden schützen können, ohne selbst in den Wiederaufbau der Blutzellen einzugreifen.⁶⁰

Das Vorkommen von hämatopoetischen Vorläuferzellen in atherosklerotisch veränderten Gefäßen und deren Differenzierungskapazität in mature Leukozyten wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Die vorliegenden Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass aus atherosklerotischen Läsionen muriner Aorten Zellen isoliert werden können, welche die Fähigkeit zu klonaler Expansion und zumindest das Potenzial zur Differenzierung in mature myeloide Zellen besitzen. Somit scheinen nicht nur differenzierte Immunzellen im Bereich atherosklerotischer Läsionen rekrutiert zu werden, sondern auch hämatopoetische Vorläuferzellen lokal zu akkumulieren.

Im Gegensatz zu den Zellen, die aus Zellisolaten der Aorta entstanden waren, zeigten klonogene Zellen von isolierten Blutzellen ein leicht erweitertes Antigenpektrum auf. Es konnten neben den Antigenen CD11b, MHCII, CD11c und F4/80 auch die Oberflächenmarker CD115 und CD8a detektiert werden, welche auf Makrophagen bzw. auf Dendritischen Zellen zu finden sind. Außerdem waren auch hier die Antigene B220 und Ly-6G auf einigen koloniebildenden Zellen vorhanden. Zusammenfassend scheinen sich aus dem peripheren Blut ApoE-defizienter Mäuse isolierte Vorläuferzellen vorrangig zu myeloiden Zellen zu differenzieren, wobei auch hier das Erscheinen von B220 und Ly-6G darauf hinweisen könnte, dass neben der

myeloiden Linie eine weitere Differenzierung möglich sein könnte. Das Auftreten von hämatopoetischen Stammzellen im peripheren Blut wurde bereits im Jahr 1962 von Goodman und Hodgson beschrieben. In dieser Studie wurde hauptsächlich eine Differenzierung zu Lymphozyten beobachtet, was durch die angewendete Technik erklärt wird, die einen zytotoxischen Effekt auf Granulozyten beinhaltet.³¹ In den CFU Assays der vorliegenden Arbeit konnten hingegen klonogene Zellpopulationen aus peripherem Blut von ApoE-defizienten Mäusen generiert werden, welche hauptsächlich myeloide Zellen enthalten. Daraus lässt sich schließen, dass im Blut zirkulierende HSPCs das Potenzial besitzen, sich in einem atherosklerotisch veränderten Organismus zu myeloiden Zellen zu differenzieren.

Massberg et al. gelang es zu zeigen, dass sich migrierende hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen in peripheren Geweben vornehmlich in Dendritische Zellen differenzieren.⁵⁶ Um im Detail zu untersuchen, inwiefern klonal expandierende Zellen aus Zellisolaten atherosklerotischer Aorten die Fähigkeit besaßen, sich in Dendritische Zellen zu differenzieren, wurden im Anschluss Koexpressions-Analysen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen der Kolonien mit Antikörpern gegen die Antigenkombination CD11c und MHCII versehen, welche auf Dendritischen Zellen zu finden sind.¹⁰³ Ebenso charakteristisch ist die Koexpression von CD11c und CD11b, welche ebenfalls geprüft wurde. Dabei handelt es sich um Dendritische Zellen, die aus Monozyten entstehen und vor allem im Rahmen entzündlicher Prozesse auftreten.⁸⁸ Eine Koexpression von CD11c und MHCII sowie CD11c und CD11b konnte in Immunfluoreszenzfärbungen der Zellen nachgewiesen werden, welche aus Zellisolaten der atherosklerotisch veränderten Aorten entstanden waren. Dieselben Färbungen wurden auch mit den klonogenen Zellen aus peripherem Blut durchgeführt, wobei die beschriebenen Antigenkombinationen ebenfalls detektiert werden konnten. Dies ist ein Hinweis dafür, dass eine Entwicklung der zirkulierenden HSPCs zu Dendritischen Zellen im atherosklerotisch veränderten Organismus möglich ist.

Auf einigen Zellen der Kolonien aus Aorta und Blut konnte auch das Antigen CD34 nachgewiesen werden, welches auf HSPCs gefunden werden kann. Dies könnte dafür sprechen, dass sich in der Zellkultur nicht alle hämatopoetischen Vorläuferzellen zu reifen Leukozyten entwickelt haben, sondern auch eine nicht oder weniger differenzierte Population bestehen blieb.

6.2. Untersuchung des Migrationsverhaltens von HSPCs in der Aorta der ApoE-Knockout-Maus

Im weiteren Verlauf des Projektes leitete sich die Frage ab, auf welchem Weg die HSPCs in die Gefäßwand gelangen. Es ist bekannt, dass HSPCs aus dem Blutstrom austreten und in periphere Gewebe einwandern können.⁸² Daher entstand die Vermutung, dass HSPCs auch in atherosklerotische Läsionen migrieren und dort die Entzündungsreaktion durch Differenzierung in Immunzellen verstärken können.

Um dieses Migrationsverhalten genauer zu untersuchen, wurde im vorliegenden Projekt mit zwei Mauslinien gearbeitet. Zunächst wurden KSL-Zellen ($c\text{-kit}^+$ Sca-1^+ lineage $^-$) aus dem Knochenmark von MHCII-eGFP-Mäusen isoliert, die selbst nicht grün fluoreszieren, jedoch nach Differenzierung zu MHCII-positiven Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop aufgrund der Expression von eGFP detektiert werden können. Daraufhin wurden jeweils 5000 dieser KSL-Zellen in die Schwanzvene von ApoE-Knockout-Mäusen injiziert und somit in deren Blutkreislauf gebracht. Die ApoE-defizienten Tiere hatten dabei entweder für 8 Wochen, für 12 Wochen oder für 16 Wochen eine cholesterinreiche Nahrung erhalten. Die Zahl 5000 wurde gewählt, um einerseits genug Zellen zu haben, die später detektiert werden können und andererseits einen physiologischen Gehalt an HSPCs im Blutkompartiment zu erreichen. Der Literatur kann entnommen werden, dass im Blut zirkulierende hämatopoetische Stammzellen weniger als 0.1% der Gesamtzellzahl des Blutes ausmacht.⁶⁹ Das Differentialblutbild der C57Bl6-Maus zeigt, dass die Leukozytenkonzentration bei männlichen Tieren im Mittel 8750 Zellen und bei weiblichen Tieren durchschnittlich 8090 Zellen pro Mikroliter Blut beträgt (siehe http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_rm_r_C57BL6_mouse_hematology.pdf).

Die 5000 injizierten Zellen sind in 500 Mikroliter Puffer gelöst, was eine Konzentration von 10 Zellen pro Mikroliter ergibt. Gemessen an der Gesamtzellzahl der Leukozyten machen die Fremdzellen somit 0.11% bei männlichen Tieren bzw. 0.12% bei weiblichen Tieren aus, so dass eine Zellkonzentration erreicht wurde, die mit der physiologischen Zahl zirkulierender HSPCs vergleichbar ist. Nach 2, 6 bzw. 14 Tagen wurden die Empfängertiere geopfert, deren Aortenbögen und Lymphknoten entnommen und Kryoschnitte angefertigt, die für Immunfluoreszenzfärbungen von

eGFP verwendet wurden. Mit diesen Versuchen sollte untersucht werden, ob in den atherosklerotisch veränderten Aorten sowie in den Lymphknoten MHCII-positive und damit grün fluoreszierende Zellen nachgewiesen werden können, die aus den injizierten KSL-Zellen entstanden waren. Tatsächlich konnten zu allen Entnahmezeitpunkten (2, 6 und 14 Tage nach KSL-Zell-Applikation) eGFP-positive Zellen in den Plaques und in der Adventitia der Aorten detektiert werden.

Um zu klären, ob zum einen die Dauer der Cholesterinfütterung und zum anderen die Zeit nach Stammzellinjektion einen Einfluss auf die Rekrutierung der MHCII-positiven Zellen hat, wurden die aus den Spendertieren stammenden eGFP-positiven Zellen in Plaque und Adventitia in den einzelnen Schnitten gezählt und die Zahlen in den verschiedenen Gruppen miteinander verglichen. Bei der Auswertung ließ sich feststellen, dass die Dauer der Cholesterinfütterung, und damit das Ausmaß der Plaquegröße, möglicherweise keine signifikante Rolle bei der Einwanderung der Zellen in die atherosklerotisch veränderten Gefäße spielt, da in allen drei Gruppen ähnliche Zellzahlen gefunden wurden. Im Plaque sind dies unabhängig von der Plaquefläche in der 8-Wochen-Gruppe 11.7 ± 11.6 Zellen, in der 12-Wochen-Gruppe 18.2 ± 19.1 Zellen und in der 16-Wochen-Gruppe 11.5 ± 10.9 Zellen. In der Adventitia ist die Situation ähnlich mit 30.0 ± 23.8 Zellen nach 8 Wochen Cholesterinfütterung, 31.0 ± 38.0 Zellen nach 12 Wochen und 26.7 ± 47.4 Zellen nach 16 Wochen cholesterinreicher Diät. Dieses Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, dass die Dauer der Cholesterinfütterung zwischen 8 und 16 Wochen zwar einen Einfluss auf Plaquegröße, -morphologie und -zusammensetzung hat, sich die Mäuse aber alle im Initialstadium der Atherogenese bzw. im Intermediärstadium der Plaqueformation befinden. ApoE-defiziente Mäuse, die mit normalem Nagetierfutter ernährt werden, entwickeln ab dem Alter von 10 Wochen die ersten Fatty-Streak-Läsionen und ab dem Alter von 15 Wochen intermediäre Läsionen mit Schaumzellbildung und Einwanderung von glatten Muskelzellen. Fibröse Plaques kann man bei dieser Ernährung ab dem Alter von 20 Wochen beobachten.⁷⁵ Späte Stadien mit Stenosierung des Gefäßlumens, Rarefizierung der fibrösen Kappe und Plaqueruptur sind erst ab einem Alter von 8 bis 9 Monaten beschrieben.^{77,84,100} Eine cholesterinreiche Diät beschleunigt die Vorgänge der Atherogenese⁷⁵ und die Dauer der Cholesterinfütterung beeinflusst den Grad der Atherosklerose.¹⁰¹ Getz und Reardon postulieren, dass die einzelnen Stadien der Atherosklerose in ApoE-Knockout-Mäusen unter cholesterinreicher Diät ungefähr sechs Wochen früher

entstehen als in Tieren, welche normales Nagetierfutter erhalten.²⁹ Eine von Zhang et al. publizierte Studie zeigte eine Verdoppelung des Okklusionsgrades der Arterien ApoE-defizienter Mäuse durch atherosklerotische Plaques nach 12-wöchiger Fütterung einer cholesterinreichen Diät im Vergleich zu einer 6 Wochen langen Aufnahme dieser Nahrung.¹⁰¹ In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine Zunahme der Plaquefläche in Abhängigkeit von der Dauer der Cholesterinfütterung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Ein hoher Stenosegrad bzw. eine vollständige Gefäßokklusion wurde in keiner Gruppe beobachtet. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen scheint die Dauer der Cholesterinfütterung keine Rolle bei der Rekrutierung der MHCII-eGFP-positiven Zellen in atherosklerotische Läsionen zu spielen. Dabei ist es überraschend, dass das Ausmaß der Plaqueexpansion keinen darstellbaren Einfluss auf die Einwanderung dieser Zellen hat.

Es zeigte sich, dass sich die meisten MHCII-eGFP positiven Zellen im atherosklerotischen Plaque nach 2 Tagen finden ließen (23.7 ± 18.3 Zellen bzw. 544 ± 631 Zellen/mm² Plaquefläche) und deren Anzahl zu den späteren Beobachtungszeitpunkten 6 und 14 Tage nach KSL-Zell-Injektion abnimmt (8.0 ± 7.0 Zellen bzw. 66 ± 74 Zellen/mm² Plaquefläche in der 6-Tage-Gruppe; 10.0 ± 10.2 Zellen bzw. 107 ± 116 Zellen/mm² Plaquefläche in der 14-Tage-Gruppe). Dies ist möglicherweise ein Hinweis dafür, dass die sich im Blutkreislauf befindlichen KSL-Zellen rasch an den Ort der Atherosklerose, also des Entzündungsgeschehens, rekrutiert werden und dort als differenzierte Immunzellen benötigt werden. In der Adventitia des atherosklerotisch veränderten Aortenbogens zeigte sich ein gegenläufiges Bild, wobei bereits nach 2 und 6 Tagen nach KSL-Zell-Applikation grün fluoreszierende Zellen detektiert werden konnten (25.1 ± 22.7 Zellen in der 2-Tage-Gruppe; 11.4 ± 13.5 Zellen in der 6-Tage-Gruppe), die größte Anzahl dieser eingewanderten Zellen jedoch nach 14 Tagen zu finden war (48.7 ± 51.6 Zellen). Die Unterschiede in den drei Gruppen sind dabei nicht statistisch signifikant.

Neueste Forschungsergebnisse verschiedener Gruppen zeigen, dass sich mit Progression der Atherosklerose zunehmend Lymphozytenansammlungen mit Ausbildung von sog. tertiären lymphatischen Organen in der Adventitia nachweisen lassen.^{26,35} Diese entstehen nur an Stellen, an denen das Gefäß atherosklerotisch verändert ist und nehmen proportional zur Plaquefläche zu.^{33,35,83} Die Funktion dieser tertiären lymphatischen Organe besteht am ehesten darin, die Rekrutierung von

Lymphozyten und die Antigen-abhängige Immunantwort zu unterstützen.³³ Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten ebenfalls an, dass die Adventitia in die Atheroskleroseentstehung und -progression involviert ist. In Übereinstimmung mit der Arbeit von Gräbner et al., welche unter anderem Lymphozytenansammlungen in der Adventitia der Aorta von ApoE-Knockout-Mäusen beschreibt³³, konnten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls in den Aorten der ApoE-Knockout-Mäuse MHCII-eGFP-positive Immunzellen in der Adventitia detektiert werden. Auf welchem Weg die Zellen dorthin gelangen, kann im Rahmen dieser Arbeit nur vermutet werden. Das gehäufte Auftreten der MHCII-eGFP-positiven Zellen im atherosklerotischen Plaque bereits 2 Tage nach KSL-Zell-Injektion lässt jedoch annehmen, dass die Zellen zunächst die Intima erreichen. Desweiteren kann vermutet werden, dass sie von dort aus in die Adventitia der Gefäßwand gelangen. Zum Zeitpunkt der maximalen Akkumulation von eGFP-positiven Zellen in der Adventitia kann keine Aussage gemacht werden, da die statistische Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen den gewählten Beobachtungszeitpunkten ergibt.

Von Dal Canto et al. wurde im Jahre 2001 postuliert, dass die Media der elastischen Arterien von inflammatorischen Zellen, v.a. Lymphozyten und Makrophagen, nicht durchquert werden kann.¹⁸ Allerdings ist im Rahmen der Atherosklerose neben der Tunica intima auch die Media der Gefäßwand pathologisch verändert.⁹⁵ Dies könnte zu einer Störung der beschriebenen Barrierefunktion führen, wodurch die Möglichkeit bestünde, dass die Entzündungszellen auf direktem Weg die Gefäßwand durchqueren könnten. Anhalt für diese Vermutung gibt eine im Jahr 2010 veröffentlichte Publikation, in der beschrieben wird, dass die glatten Muskelzellen der Tunica media als sog. „Organisatoren für lymphatisches Gewebe“ fungieren können. Durch Produktion chemotaktischer Stimuli tragen die glatten Muskelzellen dazu bei, dass an den Stellen im Gefäß, an denen sich atherosklerotische Plaques gebildet haben, lymphoide Aggregate in der Adventitia entstehen.⁵²

Eine andere Möglichkeit könnte darin bestehen, dass die MHCII-eGFP-positiven Zellen mit dem Blutstrom über Vasa vasorum in die Adventitia gelangen. Wildtyp-Mäuse besitzen keine Vasa vasorum an ihren Gefäßen. Bei genetisch veränderten Tieren, die atherosklerotische Läsionen entwickeln, kommt es allerdings zur Ausbildung von Vasa vasorum, deren Zahl mit der Anzahl der Leukozyten in der Adventitia korreliert. Dadurch kann die Gefäßperfusion trotz einer luminalen

Diffusionsbarriere durch die atherosklerotischen Plaques aufrechterhalten werden.⁴⁷ Diese Gefäße könnten daneben als Leitung für Entzündungszellen dienen.^{16,47}

Bereits im Jahr 2008 wurde von Randolph et al. die Vermutung geäußert, dass die Möglichkeit bestehe, dass Zellen in atherosklerotischen Gefäßen durch die Media hindurch zur Adventitia gelangen können, es jedoch auch möglich sei, dass sie einen Weg über den Blutstrom nehmen.⁷⁴ Die Frage, wie die beobachteten Leukozyten in die Adventitia kommen, kann hier nicht beantwortet werden und muss in weiteren Experimenten aufgeklärt werden. Jedoch bietet die vorliegende Arbeit Hinweise dafür, dass migrierende HSPCs, die als differenzierte Entzündungszellen in atherosklerotisch veränderten Regionen nachweisbar sind, an der Atherogenese beteiligt sind und auch in die Bildung von tertiären lymphatischen Organen in der Adventitia involviert sind.

6.3. Untersuchung des Differenzierungsverhaltens injizierter

KSL-Zellen in der ApoE-Knockout-Maus

Im weiteren Verlauf des Projektes wurde das Augenmerk auf die Differenzierungskapazität der injizierten KSL-Zellen gelegt. Um diese zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzdoppelfärbungen an Kryoschnitten von Aorten der ApoE-defizienten Empfängertiere durchgeführt. Durch die Auswahl des MHCII-eGFP-Stammes als Spender der KSL-Zellen konnte davon ausgegangen werden, dass alle detektierten eGFP-positiven Zellen das Oberflächenantigen MHCII exprimieren. Dieses Molekül ist vor allem auf Antigen-präsentierenden Zellen zu finden, so dass bei der weiteren Analyse des Differenzierungsmusters weitere Oberflächenmarker von Antigen-präsentierenden Zellen untersucht wurden. Von Massberg et al. wurde eine vorwiegende Differenzierung von migrierenden HSPCs zu Dendritischen Zellen postuliert⁵⁶, so dass für die Immunfluoreszenzdoppelfärbungen die Expression der Antigene CD11b oder CD11c jeweils zusammen mit der Expression von eGFP geprüft wurden.

Es ließen sich Zellen in der atherosklerotisch veränderten Aorta finden, die einerseits eine Koexpression von eGFP und CD11b aufwiesen und andererseits eGFP und CD11c gleichzeitig auf der Zelloberfläche trugen. Diese Ergebnisse sprechen dafür,

dass sich die injizierten KSL-Zellen der MHCII-eGFP-Spendertiere im atherosklerotischen Plaque sowohl zu Monozyten bzw. Makrophagen als auch zu Dendritischen Zellen differenzieren können. In atherosklerotisch veränderten Gefäßen sind diese Zelltypen vornehmlich vorzufinden.^{8,26,67}

Um weitere indirekte Hinweise auf den Typ der eGFP-positiven Zellen zu erhalten, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Lymphknoten der ApoE-Knockout-Empfängertiere angefertigt, bei denen die eGFP-positiven Zellen sichtbar gemacht wurden. In weiteren Färbungen wurde zusätzlich ein Antikörper gegen den B-Zell-Marker B220 verwendet, um die Assoziation der MHCII-eGFP-positiven Zellen zu den B-Zell-reichen Lymphfollikeln darzustellen. Die grün fluoreszierenden Zellen, die aus den injizierten Stammzellen entstanden waren, ließen sich vor allem in der parakortikalen Zone um die Follikel, welche vor allem aus T-Lymphozyten besteht⁹⁸, sowie in der Hilusregion finden. In dieser B220-eGFP-Doppelfärbung konnten keine Zellen nachgewiesen werden, auf denen eGFP gleichzeitig mit B220 exprimiert wurde, so dass es unwahrscheinlich erscheint, dass sich die injizierten KSL-Zellen zu B-Lymphozyten differenziert haben.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzdoppelfärbungen von Aorta und Lymphknoten zeigen die Tendenz, dass aus migrierenden HSPCs myeloide Antigen-präsentierende Zellen entstehen können. Dies sind allgemein sowohl Makrophagen als auch Dendritische Zellen, die ihren Ursprung in zirkulierenden Monozyten haben.⁷⁰ Monozyten, die in der subendothelialen Matrix atherosklerotischer Läsionen einen phagozytischen Stimulus erhalten, entwickeln sich allerdings eher zu Dendritischen Zellen.⁷² Diese wandern vornehmlich in die regionalen Lymphknoten weiter, wohingegen Makrophagen eher sesshafte Zellen sind, die im Gewebe verbleiben.⁵¹ Die Fähigkeit, aus einem Gewebe auszuwandern, um in regionale Lymphknoten einzuwandern, ist als Charakteristikum von Dendritischen Zellen beschrieben.^{51,72,74} Somit bieten die Ergebnisse der vorliegenden Färbungen einen Hinweis dafür, dass es sich bei den Zellen, welche aus den ursprünglich injizierten KSL-Zellen von MHCII-eGFP-Spendertieren entstanden ist und als mature Zelle in der ApoE-Knockout-Empfängermaus detektiert werden können, am ehesten um Dendritische Zellen handeln könnte. Neben der direkten Anfärbung der Oberflächenantigene und der Tatsache, dass die Zellen sowohl im atherosklerotisch veränderten Gefäß als auch im Lymphknoten zu finden sind, wird diese Vermutung durch die Lokalisation der eingewanderten Zellen im Lymphknoten untermauert.

Dendritische Zellen wandern vornehmlich in die parakortikale Zone sowie in den Hilusbereich ein^{71,73}, wo auch die grün fluoreszierenden Zellen zu finden waren. Makrophagen wären hingegen eher im subkapsulären Raum bzw. im Mark anzutreffen.⁷³

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die für den Prozess der Atherosklerose-Entstehung benötigten Entzündungszellen möglicherweise auch aus zirkulierenden Stammzellen entstehen können, welche gegebenenfalls eine enorme Kapazität besitzen, sich zu Dendritischen Zellen zu differenzieren.

6.4. Zusammenfassende Hypothese zur Migration und Differenzierung der HSPCs

Im vorliegenden Projekt konnte gezeigt werden, dass sich grün fluoreszierende MHCII-eGFP-positive Tochterzellen von injizierten KSL-Zellen aus MHCII-eGFP-Spendertieren sowohl im atherosklerotischen Plaque als auch in der Adventitia der Aorta ApoE-defizienter Empfängertiere finden lassen. Desweiteren konnten diese eGFP-positiven Zellen auch in den Lymphknoten der ApoE-Knockout-Mäuse identifiziert werden, wo sie vor allem die parakortikalen T-Zell-Regionen besiedeln. Diese Ergebnisse lassen folgendes hypothetisches Modell zu (vgl. Abbildung 24).

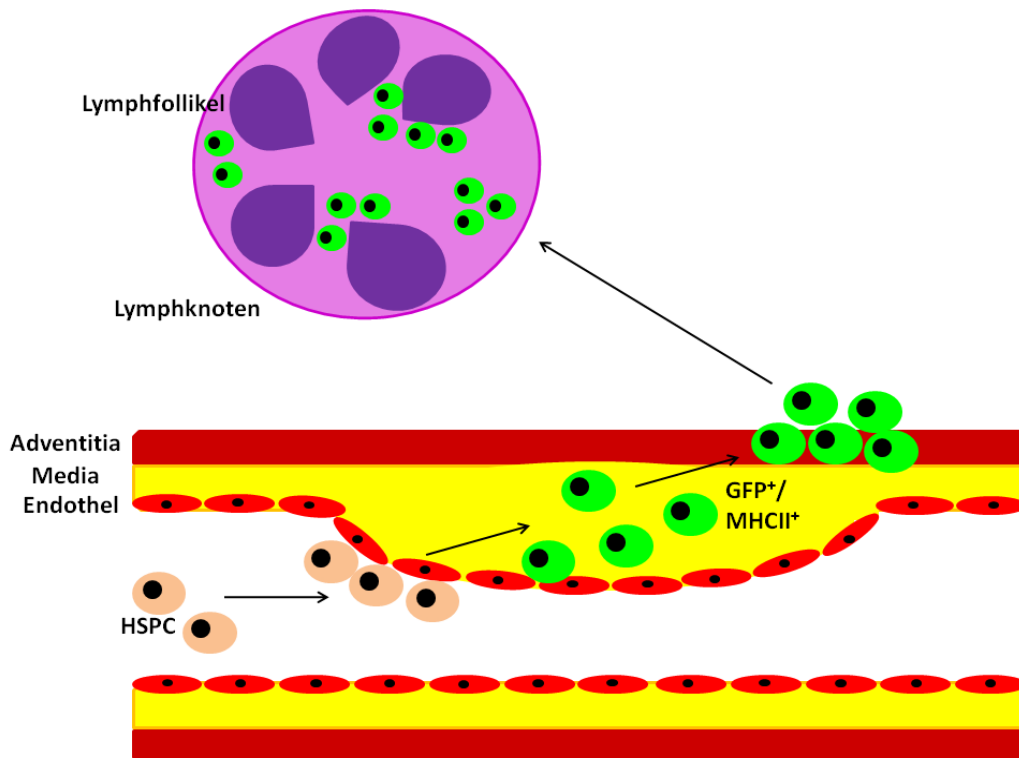


Abbildung 24:

Hypothetisches Modell zur Migration und Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen im atherosklerotisch veränderten Organismus (Erläuterungen im Text)

Die intravenös in ApoE-Knockout-Mäuse injizierten zirkulierenden HSPCs und ihre Nachkommen gelangen über den Blutstrom zu den atherosklerotischen Plaques und werden dort adhärent (vgl. Dissertation von Frau Zuzana Hajdu). Desweiteren können sie kurze Zeit später als differenzierte Antigen-präsentierende Zellen im Bereich der atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden. Zunächst ist eine starke Akkumulation im atherosklerotischen Plaque zu beobachten, wobei die Zellen dort bereits als differenzierte Zellen zu finden sind, auf denen die Oberflächenmarker der myeloiden Zelllinie detektiert werden können (CD11b, CD11c, MHCII). Es wird eine anschließende Migration in die Adventitia angenommen, da regelmäßig grün-fluoreszierende Zellen in dieser Region gefunden werden können. Die eGFP-positiven Zellen lassen sich auch in den drainierenden Lymphknoten detektieren, hier vor allem in der parakortikalen T-Zell-reichen Region, so dass angenommen wird, dass diese Zellen aus der Adventitia aus- und in die Lymphknoten einwandern können.

Aufgrund der Anwesenheit der Oberflächenmerkmale MHCII, CD11c und CD11b, der Fähigkeit zur Migration und der vornehmlichen Akkumulation in den T-Zell-reichen Regionen der Lymphknoten, spricht vieles dafür, dass sich die zirkulierenden HSPCs überwiegend zu Dendritischen Zellen weiterentwickeln.

6.5 Untersuchung der Proliferation der injizierten KSL-Zellen

Es bleibt noch zu klären, an welchem Ort im Organismus die Proliferation und Differenzierung der injizierten HSPCs in Antigen-präsentierende Zellen stattfindet. Normalerweise findet diese in speziellen Nischen im Knochenmark statt⁴⁹, von wo aus die reifen Zellen ins Blut ausgeschwemmt werden. Unter bestimmten Umständen, zu denen man den Zustand einer chronischen Entzündung zählt, erlangen HSPCs jedoch die Fähigkeit, erst in extramedulläre Gewebe zu wandern und dann dort zu proliferieren.⁵⁶ Es wurde deshalb geprüft, inwiefern eine Zellteilung der HSPCs mit nachfolgender Ausreifung zu Entzündungszellen auch im atherosklerotischen Plaque möglich ist.

Daher wurde ein Antikörper gegen den Proliferationsmarker ki-67 verwendet, der zusammen mit einem Antikörper gegen eGFP eingesetzt wurde. Zellen, die ki-67 exprimieren, befinden sich gerade in der Phase der Zellteilung. In den atherosklerotischen Läsionen von 12 Wochen alten ApoE-Knockout-Mäusen, welche zwei Tage zuvor KSL-Zellen von MHCII-eGFP-Mäusen erhalten hatten, gelang der Nachweis doppelt positiver Zellen nicht. Obwohl pro Tier nur 5000 KSL-Zellen injiziert wurden, konnten 2 Tage nach Zellapplikation pro 5- μ m-dickem Schnitt bis zu 20 Zellen gezählt werden, so dass eine umfangreiche Expansion der HSPCs schon vor diesem ersten Beobachtungszeitpunkt stattgefunden haben muss.

In einem nächsten Schritt wurden β -Aktin-eGFP-Tiere als KSL-Zell-Donor verwendet, um sicherzustellen, dass der fehlende Nachweis doppelt positiver Zellen nicht daran lag, dass es sich bei den MHCII-positiven eGFP-positiven Zellen des ursprünglichen Donorstammes um reife, ausdifferenzierte Zellen handelt, die sich nicht mehr so häufig teilen. Beim β -Aktin-eGFP-Stamm exprimieren alle kernhaltigen Zellen das grün fluoreszierende eGFP. Die isolierten KSL-Zellen konnten auf diese Weise unabhängig vom Differenzierungsgrad im Empfängertier detektiert werden.

Doch auch bei diesem Versuchsaufbau konnte keine Expression von ki-67 auf eGFP-positiven Zellen nachgewiesen werden. Mit der gewählten Methode konnte somit keine Proliferationstätigkeit der HSPCs in atherosklerotischen Läsionen dargestellt werden. Auch bei den Experimenten mit den β -Aktin-eGFP-Tieren wurde der Zeitpunkt 2 Tage nach Zellapplikation zur Auswertung verwendet. Möglicherweise ist zu diesem Zeitpunkt die Proliferation der HSPCs schon abgeschlossen, was eine Erklärung dafür wäre, dass in den Immunfluoreszenzfärbungen keine Zellen gefunden wurden, die sowohl ki-67 als auch eGFP exprimierten.

6.6 Ausblick und klinischer Nutzen

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass im Rahmen der Atherosklerose HSPCs in Gefäßläsionen rekrutiert werden und zu Antigen-präsentierenden Zellen, insbesondere Dendritischen Zellen, differenzieren. Es konnte zudem eine Rekrutierungsdynamik mit einer Anhäufung der Antigen-präsentierenden Zellen im Plaque zu einem frühen Zeitpunkt und einer Akkumulierung dieser Zellen in der Adventitia zu einem späteren Zeitpunkt nachgewiesen werden. Dies gibt Anlass für neue Forschungsvorhaben zur Klärung des exakten Rekrutierungsweges und zum besseren Verständnis der Proliferation der HSPCs im atherosklerotisch veränderten Organismus. Dieses Grundlagenwissen erlaubt in Zukunft möglicherweise völlig neue prophylaktische Therapieansätze, zum Beispiel durch die Entwicklung von Wirkstoffen, welche die Migration der HSPCs beeinflussen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Atherosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Gefäße, die in der heutigen Zeit eine hohe Prävalenz aufweist. Vieles ist über die beteiligten Leukozyten, ihre Interaktionen und den Pathomechanismus der Läsionen bereits bekannt. Dennoch ist der Prozess der Krankheitsentstehung noch nicht gänzlich verstanden und es konnte bislang keine kausale Therapie entwickelt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte das Verständnis für diese Prozesse erweitert werden, indem gezeigt wurde, dass hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSPCs) im Bereich der atherosklerotischen Läsionen regelmäßig zu finden sind, welche das Potenzial besitzen, sich in myeloide Zellen zu differenzieren. Diese Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass nicht nur adulte Immunzellen, sondern möglicherweise auch HSPCs eine essentielle Rolle bei der Atherosklerose spielen. Migrierende HSPCs könnten in der atherosklerotisch veränderten Aorta eine Quelle für rasch verfügbare Entzündungszellen darstellen und somit zur Aufrechterhaltung der chronischen Entzündungsreaktion beitragen.

8 SUMMARY

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease holding a high prevalence in today's time. There is yet a lot of knowledge concerning the pathogenesis of the lesions and the interactions between the different types of leukocytes which are involved in the process. However, the formation of this disease has not yet been fully understood and there is no causal therapy developed yet.

In this present work, the comprehension of these processes could be extended with showing that hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) are regularly found in the regions of atherosclerotic lesions and are able to differentiate into myeloid cells. These results are suggestive of the fact, that not only mature immune cells, but potentially also HSPCs play an essential role in atherosclerosis. In the aorta modified with atherosclerotic lesions, migrating HSPCs could function as a source for rapidly available inflammatory cells and contribute to the maintenance of a chronic inflammatory reaction.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Adams GB, Scadden DT (2006): The hematopoietic stem cell in its place. In: *Nature Immunology*, H. 7(4), S. 333–337.
- (2) Angeli V, Llodrá J, Rong JX, Satoh K, Ishii S, Shimizu T, Fisher EA, Randolph GJ (2004): Dyslipidemia associated with atherosclerotic disease systemically alters dendritic cell mobilization. In: *Immunity*, H. 21(4), S. 561–574.
- (3) Babaev VR, Bobryshev YV, Sukhova GK, Kasantseva IA (1993): Monocyte/macrophage accumulation and smooth muscle cell phenotypes in early atherosclerotic lesions of human aorta. In: *Atherosclerosis*, H. 100(2), S. 237–248.
- (4) Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000): Immunobiology of dendritic cells. In: *Annual Review of Immunology*, H.18, S. 767–811.
- (5) Banchereau J, Steinmann RM (1998): Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature*, H. 392(6673), S. 245–252.
- (6) Barreiro O, Martin P, González-Amaro R, Sánchez-Madrid F (2010): Molecular cues guiding inflammatory responses. In: *Cardiovascular Research*, H. 86(2), S. 174–182.
- (7) Bobryshev YV, Lord, RSA (1995): S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions. In: *Cardiovascular Research*, H. 29(5) S. 689–696.
- (8) Bobryshev YV, Lord RSA (1998): Mapping of vascular dendritic cells in atherosclerotic arteries suggests their involvement in local immune-inflammatory reactions. In: *Cardiovascular Research*, H. 37(3), S. 799–810.
- (9) Boes M, Cerny J, Massol R, Op den Brouw M, Kirchhausen T, Chen J, Ploegh HL (2002): T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport. In: *Nature*, H. 418 (6901), S. 983–988.
- (10) Bonifer C, Hume DA (2008): The transcriptional regulation of the colony-stimulating factor 1 receptor (*csf1r*) gene during hematopoiesis. In: *Frontiers in Bioscience*, H. 13, S. 549–560.
- (11) Bradley TR, Metcalf D (1966): The growth of mouse bone marrow cells in vitro. In: *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, H. 44(3), S. 287–299.
- (12) Bubnoff D von, De La Salle H, Weßendorf J, Koch S, Hanau D, Bieber T (2002): Antigen-presenting cells and tolerance induction. In: *Allergy*, H. 57(1), S. 2–8.
- (13) Chen X, Jensen PE (2008): MHC class II antigen presentation and immunological abnormalities due to deficiency of MHC class II and its associated genes. In: *Experimental and Molecular Pathology*, H. 85(1), S. 40–44.

-
- (14) Chisolm GM, Hazen SL, Fox PL, Cathcart MK (1995): The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms. In: *The Journal of Biological Chemistry*, H. 274(37), S. 25959–25962.
- (15) Chow A, Toomre D, Garret W, Mellman I (2002): Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. In: *Nature*, H. 418(6901), S. 988–994.
- (16) Csányi G, Taylor WR, Pagano PJ (2009): Nox and inflammation in the vascular adventitia. In: *Free Radical Biology and Medicine*, H. 47(9), S. 1254–1266.
- (17) Curtiss LK, Boisvert WA (2000): Apolipoprotein E and atherosclerosis. In: *Current Opinion in Lipidology*, H. 11(3), S. 243–251.
- (18) Dal Canto AJ, Swanson PE, O’Guin AK, Speck SH, Virgin HW (2001): IFN-gamma action in the media of the great elastic arteries, a novel immunoprivileged site. In: *Journal of Clinical Investigation*, H. 107(2), S. R15-R22.
- (19) Davies MJ, Thomas A (1984): Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. In: *The New England Journal of Medicine*, H. 310(18), S. 1137–1140.
- (20) Dawicki W, Jawdat DW, Xu N, Marshall JS (2010): Mast cells, histamine, and IL-6 regulate the selective influx of dendritic cell subsets into an inflamed lymph node. In: *Journal of Immunology*, H. 184(4), S. 2116–2123.
- (21) Dykhuizen M, Ceman J, Mitchen J, Zayas M, MacDougall A, Helgeland J, Rakasz E, Pauza CD (2000): Importance of the CD3 marker for evaluating changes in rhesus macaque CD4/CD8 T-cell ratios. In: *Cytometry*, H. 40(1), S. 69–75.
- (22) Erbel C, Sato K, Meyer FB, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, Weyand CM (2007): Functional profile of activated dendritic cells in unstable atherosclerotic plaque. In: *Basic Research in Cardiology*, H. 102(2), S. 123–132.
- (23) Faggiotto A, Ross R, Harker L (1984): Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. In: *Arteriosclerosis*, H. 4(4), S. 323–340.
- (24) Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR (1993): Selective expression of Ly-6C on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. In: *Journal of Immunology*, H. 151(5), S. 2399–2408.
- (25) Fu B, Wang F, Sun R, Ling B, Tian Z, Wei H (2011): CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells. In: *Immunology*, H. 133(3), S. 350–359.
- (26) Galkina E, Kadi A, Sanders J, Varughese D, Sarembock IJ, Ley K (2006): Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent. In: *The Journal of Experimental Medicine*, H. 203(5), S. 1273–1282.
- (27) Galkina E, Ley K (2009): Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. In: *Annual Review of Immunology*, H. 27, S. 165–197.

- (28) Gerrity RG, Naito HK, Richardson M, Schwartz CJ (1979): Dietary induced atherogenesis in swine. Morphology of the intima in prelesion stages. In: *The American Journal of Pathology*, H. 95(3), S. 775–792.
- (29) Getz GS, Reardon CA (2006): Diet and murine atherosclerosis. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, H. 26, S. 242–249
- (30) Gimbrone MA, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G (1999): Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. In: *The American Journal of Pathology*, H. 155(1), S. 1–5
- (31) Goodman JW, Hodgson G (1962): Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. In: *Blood*, H. 19, S. 702–714.
- (32) Gown AM, Tsukada T, Ross R (1986): Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. In: *The American Journal of Pathology*, H. 125(1), S. 191–207.
- (33) Gräbner R, Lötzer K, Döpping S, Hildner M, Radke D, Beer M, Spanbroek R, Lippert B, Reardon CA, Getz GS, Fu Y, Hehlgans T, Mebius RE, van der Wall M, Kruspe D, Englert C, Lovas A, Hu D, Randolph GJ, Weih F, Habenicht AJR (2009): Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE^{-/-} mice. In: *The Journal of Experimental Medicine*, H. 206(1), S. 233–248.
- (34) Hansson GK, Libby P (2006): The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. In: *Nature Reviews. Immunology*, H. 6(7), S. 508–519.
- (35) Houtkamp MA, de Boer OJ, van der Loos CM, van der Wal AC, Becker AE (2001): Adventitial infiltrates associated with advanced atherosclerotic plaques: structural organization suggests generation of local humoral immune responses. In: *The Journal of Pathology*, H. 193(2), S. 263–269.
- (36) Hu Y, Zhang Z, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B, Xu Q (2004): Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. In: *The Journal of Clinical Investigation*, H. 113(9), S. 1258–1265.
- (37) Inaba K, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M, Pack M, Subklewe M, Sauter B, Sheff D, Albert M, Bhardwaj N, Mellman I, Steinmann RM (1998): Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. In: *The Journal of Experimental Medicine*, H. 188(11), S. 2163–2173.
- (38) Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J (1993): Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. In: *The Journal of Clinical Investigation*, H. 92(2), S. 883–893.
- (39) Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS (1994): The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, H. 91(10), S. 4431–4435.

-
- (40) Ishikawa H, Tsuyama N, Mahmoud MS, Fujii R, Abroun S, Liu S, Li FJ, Kawano MM (2002): CD19 expression and growth inhibition of tumours in human multiple myeloma. In: *Leukemia & Lymphoma*, H. 43(3), S. 613–616.
- (41) Jawien J, Nastalek P, Korbut R (2004): Mouse models of experimental atherosclerosis. In: *Journal of Physiology and Pharmacology*, H. 55(3), S. 503–517.
- (42) Kawaguchi S (2005): B-cell reconstitution by transplantation of B220+ CD117+ B-lymphoid progenitors into irradiated mice. In: *Immunology*, H. 114(4), S. 461–467.
- (43) Kendziorra K, Barthel H, Erbs S, Emmrich F, Hambrecht R, Schuler G, Sabri O, Kluge R (2008): Effect of progenitor cells on myocardial perfusion and metabolism in patients after recanalization of a chronically occluded coronary artery. In: *Journal of Nuclear Medicine*, H. 49(4), S. 557–563.
- (44) Kiernan TJ, Boilson BA, Witt TA, Dietz AB, Lerman A, Simari RD (2009): Vasoprotective effects of human CD34+ cells: towards clinical applications. In: *Journal of Translational Medicine*, H. 7, S. 66–72.
- (45) Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, van Veen CJH, van Hellemond JJ, Neeffjes JJ, Kast WM, Melief CJM, Geuze HJ (1995): MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. In: *Journal of Immunology*, H. 154(11), S.5715-5724.
- (46) Kleijmeer MJ, Ramm G, Schuurhuis D, Griffith J, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, Rudensky AY, Ossendorp F, Melief CJM, Stoorvogel W, Geuze HJ (2001): Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. In: *The Journal of Cell Biology*, H. 155(1), S. 53–63.
- (47) Langheinrich AC, Michniewicz A, Sedding DG, Walker G, Beighley PE, Rau WS, Bohle RM, Ritman EL (2006): Correlation of vasa vasorum neovascularization and plaque progression in aortas of apolipoprotein E(-/-)/low density lipoprotein(-/-)double knockout mice. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, H. 26(2), S. 347–352.
- (48) Larsson J, Karlsson S (2005): The role of Smad signaling in hematopoiesis. In: *Oncogene*, H. 24(37), S. 5676–5692.
- (49) Li Z, Li L (2006): Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. In: *Trends in Biochemical Sciences*, H. 31(10), S. 589–595.
- (50) Libby P (2002): Inflammation in Atherosclerosis. In: *Nature*, H. 420(6917), S. 868–874.
- (51) Llodrà J, Angeli V, Liu J, Trogan E, Fisher EA, Randolph GJ (2004): Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, H. 101(32), S. 11779–11784.

- (52) Lötzer K, Döpping S, Connert S, Gräbner R, Spanbroek R, Lemser B, Beer M, Hildner M, Hehlhans T, van der Wall M, Mebius RE, Lovas A, Randolph GJ, Weih F, Habenicht AJ (2010): Mouse aorta smooth muscle cells differentiate into lymphoid tissue organizer-like cells on combined tumor necrosis factor receptor-1/lymphotoxin beta-receptor NF-kappaB signaling. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, H. 30(3), S. 395–402.
- (53) Lusis AJ (2000): Atherosclerosis. In: *Nature*, H. 407(6801), S. 233–241.
- (54) Major AS, Fazio S, Linton MF (2002): B-lymphocyte deficiency increases atherosclerosis in LDL receptor-null mice. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, H. 22(11), S. 1892–1898.
- (55) Maldonado-López R, De Smedt T, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, Maliszewski CR, Moser M (1999): Role of CD8alpha+ and CD8alpha- dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo. In: *Journal of Leukocyte Biology*, H. 66(2), S. 242–246.
- (56) Massberg S, Schaerli P, Knezevic-Maramica I, Köllnberger M, Tubo N, Moseman EA, Huff IV, Junt T, Wagers AJ, Mazo IB, von Andrian UH (2007): Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. In: *Cell*, H. 131(5), S. 994–1008.
- (57) Matsuzaki Y, Kinjo K, Mulligan RC, Okano H (2004): Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cells. In: *Immunity*, H. 20(1), S. 87–93.
- (58) Millonig G, Niederegger H, Rabl W, Hochleitner BW, Hofer D, Romani N, Wick G (2001): Network of vascular-associated dendritic cells in intima of healthy young individuals. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, H. 21(4), S. 503–508.
- (59) Mitchison NA (2004): T-cell-B-cell-cooperation. In: *Nature Reviews. Immunology*, H. 4(4), S. 308–312.
- (60) Montfort MJ, Olivares CR, Mulcahy JM, Fleming WH (2002): Adult blood vessels restore host hematopoiesis following lethal irradiation. In: *Experimental Hematology*, H. 30(8), S. 950–956.
- (61) Mora R, Lupu F, Simionescu N (1987): Prelesional events in atherogenesis. Colocalization of apolipoprotein B, unesterified cholesterol and extracellular phospholipid liposomes in the aorta of hyperlipidemic rabbit. In: *Atherosclerosis*, H. 67(2-3), S. 143–154.
- (62) Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R (1994): ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, H. 14(1), S. 133–140.
- (63) Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM (1996): The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, H. 16(7), S. 831–842.

- (64) Newman PJ, Newman DK (2003): Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, H. 23(6), S. 953–964.
- (65) Niiro H, Clark EA (2002): Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. In: *Nature Reviews. Immunology*, H. 2(12), S. 945–956.
- (66) Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997): 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. In: *FEBS Letters*, H. 407(3), S. 313–319.
- (67) Osterud B, Bjorklid E(2003): Role of monocytes in atherogenesis. In: *Physiological Reviews*, H. 83(4), S. 1069–1112.
- (68) Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL (1989): Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, H. 86(4), S. 1372–1376.
- (69) Parent-Massin D, Hymery N, Sibiril Y (2010): Stem cells in myelotoxicity. In: *Toxicology*, H. 267(1-3), S. 112–117.
- (70) Piedrahita JA, Zhang SH, Hagan JR, Oliver PM, Maeda N (1992): Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, H. 89(10), S. 4471–4475.
- (71) Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinmann RM, Muller WA (1998): Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. In: *Science*, H. 282(5388), S. 480–483.
- (72) Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinmann RM, Muller WA (1999): Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. In: *Immunity*, Jg. 11(6), S. 753–761.
- (73) Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA (2005): Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. In: *Nature Reviews. Immunology*, H. 5(8), S. 617–628.
- (74) Randolph GJ(2008): Emigration of monocyte-derived cells to lymph nodes during resolution of inflammation and its failure in atherosclerosis. In: *Current Opinion in Lipidology*, H. 19(5), S. 462–468.
- (75) Reddick RL, Zhang SH, Maeda N (1994): Atherosclerosis in mice lacking Apo E. Evaluation of lesional development and progression. In: *Arteriosclerosis and Thrombosis*, H. 14(1), S. 141–147.
- (76) Rocha N, Neefjes J (2008): MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation. In: *The EMBO Journal*, H. 27(1), S. 1–5.
- (77) Rosenfeld ME, Polinsky P, Virmani R, Kauser K, Rubanyi G, Schwartz SM (2000): Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, Jg. 20(12), S. 2587–2592.

- (78) Ross R (1993): The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. In: *Nature*, H. 362(6423), S. 801–809.
- (79) Ross R (1999): Atherosclerosis -- an inflammatory disease. In: *The New England Journal of Medicine*, H. 340(2), S. 115–126.
- (80) Ross R, Glomset JA (1973): Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. In: *Science*, H. 180(4093), S. 1332–1339.
- (81) Sainz J, Al Haj Zen A, Caligiuri G, Demerens C, Urbain D, Lemitre M, Lafont A (2006): Isolation of "side population" progenitor cells from healthy arteries of adult mice. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, H. 26(2), S. 281–286.
- (82) Schulz C, von Andrian UH, Massberg S (2009): Trafficking of murine hematopoietic stem and progenitor cells in health and vascular disease. In: *Microcirculation*, H. 16(6), S. 497–507.
- (83) Schwartz CJ, Mitchell JR (1962): Cellular infiltration of the human arterial adventitia associated with atheromatous plaques. In: *Circulation*, H. 26, S. 73–78.
- (84) Seo HS, Lombardi DM, Polinsky P, Powell-Braxton L, Bunting S, Schwartz SM, Rosenfeld ME (1997): Peripheral vascular stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. Potential role of lipid deposition, medial atrophy and adventitial inflammation. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, H. 17(12), S. 3593–3601.
- (85) Shortman K, Naik SH (2007): Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. In: *Nature Reviews. Immunology*, H. 7(1), S. 19–30.
- (86) Soares A, Govender L, Hughes J, Mavakla W, de Kock M, Barnard C, Pienaar B, van Rensburg EJ, Jacobs G, Khomba G, Stone L, Abel B, Scriba TJ, Hanekom WA (2010): Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. In: *Journal of Immunological Methods*, H. 362(1-2), S. 43–50.
- (87) Steinmann RM (1991): The dendritic cell system and its role in immunogenicity. In: *Annual Review of Immunology*, H.9, S. 271–296.
- (88) Steinmann RM, Idoyaga J (2009): Features of the dendritic cell lineage. In: *Immunological Reviews*, H. 234(1), S. 5–17.
- (89) Strong JP, McGill HC (1969): The pediatric aspect of atherosclerosis. In: *Journal of Atherosclerosis Research*, H. 9(3), S. 251–265.
- (90) Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R, Pittet MJ (2007): Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. In: *The Journal of Clinical Investigation*, H. 117(1), S. 195–205.
- (91) Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, von Rooijen N, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ (2007): Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. In: *The Journal of Clinical Investigation*, H. 117(1), S. 185–194.

- (92) Tsubakimoto Y, Yamada H, Yokoi H, Kishida S, Takata H, Kawahito H, Matsui A, Urao N, Nozawa Y, Hirai H, Imanishi J, Ashihara E, Maekawa T, Takahashi T, Okigaki M, Matsubara H (2009): Bone marrow angiotensin AT1 receptor regulates differentiation of monocyte lineage progenitors from hematopoietic stem cells.
In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, H. 29(19), S. 1529–1536.
- (93) Turley SJ, Inaba K, Garrett WS, Ebersold M, Unternaehrer J, Steinmann RM, Mellman I (2000): Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. In: *Science*, H. 288(5465), S. 522–527.
- (94) van den Berg TK, Kraal G (2005): A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction.
In: *Trends in Immunology*, H. 26(10), S. 506–509.
- (95) van der Wal AC, Becker AE, Das PK (1993): Medial thinning and atherosclerosis – evidence for involvement of a local inflammatory effect.
In: *Atherosclerosis*, H. 103(1), S. 55–64.
- (96) Watt SM, Gilmore DJ, Davis JM, Clark MR, Waldmann H (1987): Cell-surface markers on haemopoietic precursors. Reagents for the isolation and analysis of progenitor cell subpopulations.
In: *Molecular and Cellular Probes*, H. 1(4), S. 297–326.
- (97) Weber C, Zernecke A, Libby P (2008): The multifaceted contribution of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models.
In: *Nature Reviews. Immunology*, H. 8(10), S. 802–815.
- (98) Weissmann D, Barker TD, Fauci AS (1996): The efficiency of acute infection of CD4+ T cells is markedly enhanced in the setting of antigen-specific immune activation. In: *The Journal of Experimental Medicine*, H. 183(2), S. 687–692
- (99) Wu H, Gower RM, Wang H, Dai Perrard XY, Ma R, Bullard DC, Burns AR, Paul A, Smith CW, Simon SI, Ballantyne CM (2009): Functional role of CD11c+ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia.
In: *Circulation*, H. 119(20), S. 2708–2717.
- (100) Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N (1992): Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E.
In: *Science*, H. 258(5081), S. 468–471.
- (101) Zhang SH, Reddick RL, Burkey B, Maeda N (1994): Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. In: *The Journal of Clinical Investigation*, H. 94, S. 937-945
- (102) Zhu J, Paul WE (2008): CD4 T cells: fates, functions, and faults.
In: *Blood*, H. 112(5), S. 1557–1569.
- (103) Zhu SN, Chen M, Jongstra-Bilen J, Cybulsky MI (2009): GM-CSF regulates intimal cell proliferation in nascent atherosclerotic lesions.
In: *The Journal of Experimental Medicine*, H. 206(10), S. 2141–2149.

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Kombinationen der Antikörper für die FACS-Färbungen.....	22
Tabelle 2: Gruppen für Migrationsversuche	24

11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Arterienwand (nach Lusic, Nature, 2000).....	2
Abbildung 2: Übersicht über die Hämatopoese (modifiziert nach Larsson, Oncogene, 2005)	12
Abbildung 3: Immunfluoreszenzfärbung von CD45 und CD34 auf Zellen der CFU Assays aus Blut und Aortengewebe.....	38
Abbildung 4: Immunfluoreszenzfärbung von CD11b, MHCII, CD11c, CD3, B220 und Ly-6G auf Zellen der CFU Assays aus Blut.....	41
Abbildung 5: Immunfluoreszenzfärbung von CD11b, MHCII, CD11c, CD3, B220 und Ly-6G auf Zellen der CFU Assays aus Aortengewebe.....	43
Abbildung 6: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von CD11c und MHCII bzw. CD11c und CD11b auf Zellen der CFU Assays aus Aortengewebe und Blut.....	46
Abbildung 7: FACS-Analyse der Oberflächenmarker CD45, CD11b, MHCII, CD11c und CD34 auf Zellen von CFU Assays aus Aortengewebe und Blut.....	49
Abbildung 8: FACS-Analyse der Oberflächenmarker MHCII und CD11b auf CD11c- positiven Zellen aus CFU-Assays aus Blut.....	51
Abbildung 9: FACS-Analyse der Oberflächenmarker CD115, F4/80, CD4, CD8a, B220 und CD19 auf Zellen aus CFU-Assays aus Aortengewebe und Blut.....	53
Abbildung 10: FACS-Analyse der Oberflächenmarker CD106, CD62E und CD31 auf Zellen aus CFU-Assays aus Aortengewebe und Blut.....	55
Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung von eGFP in einem Gefrierschnitt einer atherosklerotisch veränderten Aorta.....	57
Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbung von eGFP im Plaque und in der Adventitia einer atherosklerotisch veränderten Aorta.....	58
Abbildung 13: 2-Photonen-Mikroskopie von eGFP-positiven Zellen in der Aorta von 12 Wochen angefügterten ApoE-Knockout-Mäusen 2 Tage nach Injektion von 5000 KSL-Zellen aus dem MHCII-eGFP-Stamm.....	60
Abbildung 14: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von CD11b und eGFP bzw. CD11c und eGFP in atherosklerotischen Plaques.....	63

Abbildung 15: A) Darstellung der durchschnittlichen Anzahl MHCII-eGFP-positiver Zellen in atherosklerotischen Plaques ApoE-defizienter Mäuse, welche 8, 12 oder 16 Wochen lang eine cholesterinreiche Diät erhielten und 2, 6 bzw. 14 Tage nach Applikation von 5000 KSL-Zellen des MHCII-eGFP-Stammes geopfert wurden
 B) Darstellung der durchschnittlichen Anzahl MHCII-eGFP-positiver Zellen bezogen auf 1 mm² Plauefläche in atherosklerotischen Plaques ApoE-defizienter Tiere, die 8, 12 oder 16 Wochen lang mit cholesterinreicher Nahrung angefüttert wurden und 2, 6 bzw. 14 Tage nach Applikation von 5000 KSL-Zellen des MHCII-eGFP-Stammes geopfert wurden..... 65

Abbildung 16: A) Darstellung der durchschnittlichen Anzahl der absolut gezählten grün fluoreszierenden Zellen in den atherosklerotischen Plaques ApoE-defizienter Mäuse 2, 6 und 14 Tage nach Injektion von 5000 KSL-Zellen des MCHI-eGFP-Stammes
 B) Darstellung der durchschnittlichen Anzahl der gezählten MHCII-eGFP-positiven Zellen im atherosklerotischen Plaque ApoE-defizienter Mäuse bezogen auf 1mm² Plauefläche in den Gruppen 2, 6 und 14 Tage nach KSL-Zellapplikation..... 67

Abbildung 17: A) Durchschnittliche Anzahl grün fluoreszierender Zellen in atherosklerotischen Plaques ApoE-defizienter Mäuse, welche 8 Wochen, 12 Wochen bzw. 16 Wochen lang eine cholesterinreiche Nahrung erhalten hatten, unabhängig von der Zeit nach Injektion von 5000 KSL-Zellen des MHCII-eGFP-Stammes
 B) Durchschnittliche Anzahl grün fluoreszierender Zellen pro mm² Plauefläche in atherosklerotischen Plaques ApoE-defizienter Mäuse, welche 8 Wochen, 12 Wochen bzw. 16 Wochen mit cholesterinreicher Diät angefüttert wurden, unabhängig von der Zeit nach Injektion von 5000 KSL-Zellen des MHCII-eGFP-Stammes..... 71

Abbildung 18: Darstellung der durchschnittlichen Anzahl der detektierten grün fluoreszierenden Zellen in der Adventitia atherosklerotisch veränderter Aorten von ApoE-Knockout-Mäusen, die 8, 12 oder 16 Wochen lang eine cholesterinreiche Nahrung erhalten hatten und 2, 6 bzw. 14 Tage nach Applikation von 5000 KSL-Zellen des MHCII-eGFP-Stammes geopfert wurden..... 72

Abbildung 19: Darstellung der durchschnittlichen Anzahl der in der Adventitia von atherosklerotisch veränderten Aorten detektierten MHCII-eGFP-positiven Zellen 2, 6 bzw. 14 Tage nach Applikation von 5000 KSL-Zellen des MHCII-eGFP-Stammes in ApoE-defiziente Empfängertiere..... 74

Abbildung 20: Darstellung der Anzahl der gezählten grün fluoreszierenden Zellen in der Adventitia atherosklerotisch veränderter Aorten von 8, 12 bzw. 16 Wochen mit cholesterinreicher Nahrung gefütterten ApoE-Knockout-Empfängertieren, unabhängig von der Zeit nach Injektion von 5000 KSL-Zellen des MHCII-eGFP-Stammes.....	76
Abbildung 21: MHCII-eGFP-positive Zellen im Lymphknoten.....	78
Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbung von eGFP und ki-67 nach Injektion von 5000 KSL-Zellen aus dem MHCII-eGFP-Stamm.....	81
Abbildung 23: Immunfluoreszenzfärbung von eGFP und ki-67 nach Injektion von 50000 KSL-Zellen aus dem β -Aktin-eGFP-Stamm	82
Abbildung 24: Hypothetisches Modell zur Migration und Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen im atherosklerotisch veränderten Organismus (Erläuterungen im Text).....	94

12 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	Allophycocyanin
ApoB	Apolipoprotein B
ApoE	Apolipoprotein E
BSA	Bovines Serum-Albumin
CD	Cluster Of Differentiation Molecule
CFC	Colony Forming Cell
CFU	Colony Forming Unit
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FACS	Fluorescence Antibody Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothyocyanat
FSC	Forward Scatter
HSPC	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
KSL-Zellen	c-kit ⁺ sca-1 ⁺ lin ⁻ -Zellen
LDL	Low Density Lipoprotein
Ly-6G	Lymphocyte Antigen 6 Complex Locus G
MHCII	Major Histocompatibility Complex Klasse II
PBS	Phosphate Buffered Saline

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PE	Phycoerythrin
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PECy5	Phycoerythrin-Cy5
Sca-1	Stem Cell Antigen 1
SSC	Side Scatter

13 DANKSAGUNG

Vielen Dank an Prof. Dr. A. Schömig für die Übernahme der Arbeit und die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. S. Massberg für die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens, für die Überlassung des Projekts und für die hervorragende fachliche Unterstützung hinsichtlich der Bearbeitung des Themas.

Ein herzliches Dankeschön gilt Dr. med. vet. K. Echter für die exzellente Betreuung. Vielen Dank dafür, dass sie mich für das Thema der Atherosklerose und die Arbeit am Mausmodell begeisterte und mir unermüdlich mit fachkundigen Ratschlägen und äußerstem Engagement zur Seite stand.

Desweiteren möchte ich mich ganz herzlich bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken. Vielen Dank für eure stete Hilfsbereitschaft, die gute Atmosphäre und die kollegiale Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich dabei Sandra Kerstan danken, die sich sehr viel Zeit für meine Einarbeitung genommen hatte und mir stets mit kompetenten Ratschlägen geholfen hat.

Ich möchte mich auch bei Maren Bathge und Nicole Blount für die zuverlässige Tierpflege bedanken, sowie bei den MTAs des Instituts für Mikrobiologie der Technischen Universität München für die Durchführung der Zellsorts.

Schließlich möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken, ohne die es wesentlich schwerer für mich gewesen wäre, Studium und Doktorarbeit zu vereinen. Ich danke ihnen sowohl für die finanzielle Unterstützung als auch dafür, dass sie mich stets zum Durchhalten motiviert haben.

ANHANG

- I Liste der verwendeten Materialien
- II Färbeprotokolle
 - 1. Färben von Colony Forming Units in Einzelzellsuspension
 - 2. Immunfluoreszenzfärbung von eGFP
 - 3. Immunfluoreszenzfärbung von eGFP und CD11b
 - 4. Immunfluoreszenzfärbung von eGFP und CD11c
 - 5. Immunfluoreszenzfärbung von eGFP und B220
 - 6. Immunfluoreszenzfärbung von eGFP und ki-67
- III Statistische Auswertung
 - 1. Statistische Auswertung der Gruppen 8 Wochen / 2 Tage, 8 Wochen / 6 Tage, 8 Wochen / 14 Tage, 12 Wochen / 2 Tage, 12 Wochen / 6 Tage, 12 Wochen / 14 Tage, 16 Wochen / 2 Tage, 16 Wochen / 6 Tage und 16 Wochen / 14 Tage
 - 2. Statistische Auswertung der Gruppen 2 Tage, 6 Tage und 14 Tage nach KSL-Zellinjektion unabhängig von der Dauer der Cholesterinfütterung
 - 3. Statistische Auswertung der Gruppen 8 Wochen, 16 Wochen und 14 Wochen unabhängig von der Zeit nach KSL-Zellinjektion

I Liste der verwendeten Materialien

Puffer und Chemikalien:

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x (PBS)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Bovines Serum Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blue Solution	Fluka , Buchs, Schweiz
16% Formaldehyde Solution (w/v), Methanol-free	Pierce, Rockford, IL, USA
Triton ® X-100, Sigma-Ultra	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako, Glostrup, Dänemark
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
0.5 M EDTA, pH 8.0 (2 mM)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ammoniumchlorid-Lösung (0.8% NH ₄ Cl mit 0,1 mM EDTA)	Stemcell Technologies, Vancouver, Canada
Rattenserum	Stemcell Technologies, Vancouver, Canada
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Clean	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Delta Select, Dreieich, Deutschland
O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Tokyo, Japan
Kochsalzlösung 0.9%	Delta Select, Dreieich, Deutschland
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat zur Analyse	AppliChem, Gatersleben, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei zur Analyse	AppliChem, Gatersleben, Deutschland
L-Lysin-Monohydrochlorid	AppliChem, Gatersleben, Deutschland
Sodium periodate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sucrose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isofluran	Baxter, Deerfield, IL, USA
Poly-L-Lysin Solution 0.1% (w/v) in H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Antikörper und Farbstoffe:

a) Immunfluoreszenzfärbung in Einzelzellsuspension

Fc-Block	Anti-mouse CD16/32 blocks Fc binding, Clone 93, 0.5 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA
MHCII	• FITC conjugated anti-mouse MHC class II, clone NIMR-4, 0.5 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA

	<ul style="list-style-type: none"> • Isotyp-Kontrolle: FITC conjugated Rat IgG_{2b,κ}, clone A95-1, 0.5 mg/ml 	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
	<ul style="list-style-type: none"> • Sekundär-Antikörper: Goat anti-rat IgG Alexa Fluor 488, 2 mg/ml 	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
CD11c	<ul style="list-style-type: none"> • PE conjugated anti-mouse CD11c, clone N418, 0.2 mg/ml 	eBioscience, San Diego, CA, USA
	<ul style="list-style-type: none"> • Isotyp-Kontrolle: Hamster IgG purified antibody, clone 530-6, 0.1 mg/ml 	Caltag Laboratories, Bangkok, Thailand
	<ul style="list-style-type: none"> • Sekundär-Antikörper: Goat anti-hamster IgG Alexa Fluor 594, 2 mg/ml 	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
CD11b	<ul style="list-style-type: none"> • PE anti-mouse CD11b, clone M1/70, 0.2 mg/ml 	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
	<ul style="list-style-type: none"> • Isotyp-Kontrolle: Rat IgG_{2b} PE, Clone KLH/G_{2b}-1-2, 0.1 mg/ml 	Beckman Coulter, Fullteron, CA, USA
	<ul style="list-style-type: none"> • Sekundär-Antikörper: Donkey anti-rat IgG Alexa Fluor 594, 2 mg/ml 	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
CD45	<ul style="list-style-type: none"> • PE conjugated anti-mouse CD45, 0.2 mg/ml 	eBioscience, San Diego, CA, USA
	<ul style="list-style-type: none"> • Isotyp-Kontrolle: Rat IgG_{2b} PE, Clone KLH/G_{2b}-1-2, 0.1 mg/ml 	Beckman Coulter, Fullteron, CA, USA

	<ul style="list-style-type: none"> • Sekundär-Antikörper: Donkey anti-rat IgG Alexa Fluor 594, 2 mg/ml 	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ly-6G	<ul style="list-style-type: none"> • PE conjugated anti-mouse Ly-6G (Gr-1), 0.2 mg/ml 	eBioscience, San Diego, CA, USA
	<ul style="list-style-type: none"> • Isotyp-Kontrolle: Rat IgG2b PE, Clone KLH/G2b-1-2, 0.1 mg/ml 	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
	<ul style="list-style-type: none"> • Sekundär-Antikörper: Donkey anti-rat IgG Alexa Fluor 594, 2 mg/ml 	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Phalloidin	<ul style="list-style-type: none"> • Rhodamine phalloidin, 1 mg/ml 	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	<ul style="list-style-type: none"> • Alexa Fluor 488 phalloidin, 1 mg/ml 	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid, 5 mg/ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland

b) Durchflusszytometrie

Anti-mouse CD16/32 blocks Fc binding, clone 93, 0.5 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA
FITC conjugated anti-mouse MHC class II, clone NIMR-4, 0.5 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA
PE conjugated anti-mouse CD11c, clone N418, 0.2 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA

PE-Cy5.5 conjugated anti-mouse CD45.2, clone 104, 0.2 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA
APC anti-mouse CD11b, clone M1/70, 0.2 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA
FITC rat anti-mouse CD11b, clone M1/70, 0.5 mg/ml	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
PE conjugated anti-mouse CD115, clone AFS98, 0.2 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA
PE-Cy5 conjugated anti-mouse F4/80 Antigen, clone BM8, 0.2 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA
FITC rat anti-mouse CD19, clone ID3, 0.5 mg/ml	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
PE anti-mouse CD8a, clone 53-6.7, 0.2 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA
PE-Cy5 anti-mouse/human CD45R (B220), clone RA3-6B2, 0.2 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA
APC rat anti-mouse CD4, clone RM4-5, 0.2 mg/ml	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FITC rat anti-mouse CD106 (VCAM-1), clone 429, 0.5 mg/ml	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
R-PE conjugated rat anti-mouse CD62E (E-Selectin), clone 10E9.6, 0.2 mg/ml	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
PE/Cy5 anti-mouse CD34, clone MEC14.7, 0.2 mg/ml	Biolegend, San Diego, CA, USA

APC anti-mouse CD31 (PECAM-1), clone 390, 0.2 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA
FITC conjugated Rat IgG _{2b} ,K, clone A95-1, 0.5 mg/ml	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Rat IgG _{2b} -PE, clone KLH/G2b-1-2, 0.1 mg/ml	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
PE-Cy5 conjugated Rat IgG _{2a} Isotype Control, clone eBR2a, 0.2 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA
APC anti-mouse CD45.1, clone A20, 0.2 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA

c) Zellsort und eGFP-Färbungen

Lineage Cell Depletion Kit, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
PE Streptavidin, 0.2 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA
PE-Cy5.5 anti-mouse Ly-6A/E (Sca-1), clone D7, 0.2 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA
APC anti-mouse CD117 (c-Kit), clone 2B8, 0.2 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-GFP rabbit IgG fraction, 2 mg/ml	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488, 2mg/ml	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488, 2 mg/ml	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

4',6-diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI), 5 mg/ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rabbit IgG, chromatographically purified, 5 mg/ml	Zymed Laboratories über Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PE anti-mouse CD11b, clone M1/70, 0.2 mg/ml	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Rat IgG2b PE, Clone KLH/G2b-1-2, 0.1 mg/ml	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Donkey anti-rat IgG Alexa Fluor 594, 2 mg/ml	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PE conjugated anti-mouse CD11c, clone N418, 0.2 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA
Hamster IgG purified antibody, clone 530-6, 0.1 mg/ml	Caltag Laboratories, Bangkok, Thailand
Goat anti-hamster IgG Alexa Fluor 594, 2 mg/ml	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PE anti-mouse/human CD45R (B220), clone RA3-6B2, 0.2 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-mouse CD16/32 blocks FC binding, clone 93, 0.5 mg/ml	eBioscience, San Diego, CA, USA
Ki-67 PE-conjugated reagent set: <ul style="list-style-type: none"> • PE-conjugated Mouse anti-human ki-67 Antibody, clone B56 • PE-conjugated Mouse IgG₁, κ Isotype control, clone MOPC-21 	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Rhodamine conjugated affinity purified anti-R-phycoerythrin (goat), 1 mg/ml	Rockland, Gilbertsville, PA, USA

Geräte:

Sterilbank: Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Brutschrank: IG150	Jouan, Unterhaching, Deutschland
Zentrifugen:	Heraeus, Hanau, Deutschland
Megafuge 1.0R	
Biofuge fresco	
Mikroskop: Leica DBMR	Leica, Wetzlar, Deutschland
Digitalkamera: AxioCam color	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Software: Axiovision 3.1	
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Durchflusszytometer: FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Software: Cellquest 3.3	
OP-Lupen:	
KL200	Zeiss, Göttingen, Deutschland
KL2500	
KL1500 electronic	Leica, Wetzlar, Deutschland
Rotilabo ® Färbekammern aus ABS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Färbekästen nach Hellendahl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Kryotom CM1850	Leica, Wetzlar, Deutschland

2-Photonen-Mikroskop:

- Ti:Sa Laser Mai Tai, Spectra Physics, Darmstadt, Deutschland
- TriM Scope Scanhead LaVision Bio Tec, Bielefeld, Deutschland
- 20x Objektiv (NA = 0,95) Olympus, Hamburg, Deutschland

Software: Imspector Pro

LaVision Bio Tec, Bielefeld, Deutschland

Volocity

Improvision, Lexington, MA, USA

Software CapImage

Ingenieurbüro Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland

Software STATA 10.1

StataCorp LP, College Station, Texas, USA

Gebrauchsmaterialien:

Safe-Lock Reaktionsgefäße

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml

BD Microlance Kanülen 22G und 26G

Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Spritzen Injekt ® 1 ml und 2 ml

Braun, Melsungen, Deutschland

Sterile Einwegskalpelle (Sterile Disposable Scalpels) No.11

Feather, Osaka, Japan

70 µm Zellsieb

Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Konische Röhrcchen aus Polystyrol, 15 ml und 50 ml

BD Falcon, Heidelberg, Deutschland

Easypet ® Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Costar ® Stripette	Corning Inc., Corning, NY, USA
Research ® Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
e.p. T.I.P.S. Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Teflon beschichtete Objektträger, 12-Loch, 5 mm Durchmesser	Science Services, München, Deutschland
Deckgläser 24 x 50 mm	Diagonal, Münster, Deutschland
Menzel-Gläser Superfrost ® Plus	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Microtome Blade, C35	Feather, Osaka, Japan
Korkscheiben	Science Services, München, Deutschland
Fettstift DakoPen	Dako, Glostrup, Dänemark
Tissue Loc ® Histo Screen ® Biopsiekassetten	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

II FÄRBEPROTOKOLLE

1. Färben von Colony Forming Units in Einzelzellsuspension

- 1) Zellen aus Methylcellulose-Medium (Methocult) entnehmen und in ein 50ml-Reaktionsgefäß geben

Mit 4°C kaltem PBS auffüllen und eine Stunde in den Kühlschrank stellen

- 2) 3x waschen

- zentrifugieren: 5 min bei 400g (1500 rpm)
- resuspendieren in 50ml PBS
- zentrifugieren: 5 min bei 400g (1500 rpm)
- resuspendieren in 50ml PBS
- zentrifugieren: 5 min bei 400g (1500 rpm)

- 3) Zellen in 500 µl PBS + 1% BSA (4°C) resuspendieren

- 4) Zellen zählen und auf 1 000 000 Zellen/ml konzentrieren

- 10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblau mischen
- davon 10 µl in Zählkammer geben
- alle 4 Quadrate zählen
- Ergebnis : $4 \times 20\,000 = \text{Zellen/ml}$

- 5) Verteilen der Zellsuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße: 150 µl pro Reaktionsgefäß

- 6) Zugabe des Fc-Rezeptor-Blocks (anti-mouse CD16/32, 0.5 mg/ml)

Konzentration 1:100 gelöst in 150 µl PBS + 1% BSA (4°C)

→ Endkonzentration 1:200 (= 2.5 µg/ml)

Inkubationszeit: 20 min bei 4°C

- 7) 1x waschen mit PBS + 1% BSA (4°C)

- auffüllen mit 1200 µl PBS + 1% BSA (4°C)
- zentrifugieren: 5 min bei 400g (2100 rpm)

8) Resuspendieren in 150 µl PBS + 1% BSA (4°C)

9) Zugabe von Primär-Antikörper bzw. Isotyp-Kontrolle

(FITC-Antikörper und -Isotyp-Kontrolle: 0.5 mg/ml, PE-Antikörper: 0.2 mg/ml, PE-Isotyp-Kontrollen: 0.1 mg/ml)

Konzentration 1:50 gelöst in 150 µl PBS + 1% BSA (4°C)

→ Endkonzentration 1:100

(FITC-Antikörper und -Isotyp-Kontrolle: 5 µg/ml, PE-Antikörper: 2 µg/ml, PE-Isotyp-Kontrollen: 1 µg/ml)

Inkubationszeit: 1h bei 4°C

10) 1x waschen mit PBS + 1% BSA (4°C)

- auffüllen mit 1200 µl PBS + 1% BSA (4°C)
- zentrifugieren: 5 min bei 400g (2100 rpm)

11) Resuspendieren in 150 µl PBS + 1% BSA (4°C)

12) Zugabe von Sekundär-Antikörper (2 mg/ml)

Konzentration 1:100 gelöst in 150 µl PBS + 1% BSA (4°C)

→ Endkonzentration 1:200 (= 10 µg/ml)

Inkubationszeit: 1h bei 4°C

13) 1x waschen mit PBS + 1% BSA (4°C)

- auffüllen mit 1200 µl PBS + 1% BSA (4°C)
- zentrifugieren: 5 min bei 400g (2100 rpm)

14) Resuspendieren in 300 µl 1% Paraformaldehyd und 10 min bei 4°C inkubieren

15) 1x waschen mit PBS + 1% BSA (4°C)

- auffüllen mit 1200 µl PBS + 1% BSA (4°C)
- zentrifugieren: 5 min bei 400g (2100 rpm)

16) Resuspendieren in 300 µl PBS + 1% BSA + 0.1% Triton-X-100 und 5 min bei 4°C inkubieren

17) 1x waschen mit PBS + 1% BSA (4°C)

- auffüllen mit 1200 µl PBS + 1% BSA (4°C)
- zentrifugieren: 5 min bei 400g (2100 rpm)

18) Resuspendieren in 150 µl PBS + 1% BSA (4°C)

19) Zugeben von Phalloidin (1 mg/ml)

Konzentration 1:25 gelöst in 150 µl PBS + 1% BSA (4°C)

→ Endkonzentration 1:50 (= 20 µg/ml)

Inkubationszeit: 30 min bei 4°C

20) 1x waschen mit PBS + 1% BSA (4°C)

- auffüllen mit 1200 µl PBS + 1% BSA (4°C)
- zentrifugieren: 5 min bei 400g (2100 rpm)

21) Resuspendieren in 150 µl PBS + 1% BSA (4°C)

22) Zugeben von DAPI

Konzentration 1:1500 gelöst in 150 µl PBS + 1% BSA (4°C)

→ Endkonzentration 1:3000 (= 1.7 µg/ml)

Inkubationszeit: 10 Sekunden

23) 1x waschen mit PBS + 1% BSA (4°C)

- auffüllen mit 1200 µl PBS + 1% BSA (4°C)
- zentrifugieren: 5 min bei 400g (2100 rpm)

24) Resuspendieren in 60 µl PBS + 1% BSA (4°C)

25) Suspension in beschichtete 12-Well-Objektträger geben, 15 µl pro well

(Beschichtung: Poly-L-Lysin 0,01% oder Gelatine 0,1%)

26) Trocknen lassen bei 37°C

27) Eindeckeln mit Mounting Medium (Dako Fluorescent Mounting Medium)

2. Immunfluoreszenzfärbung von eGFP

- 1) Schnitte mit Fettstift umranden
- 2) etwas PBS mit Pasteur-Pipette in der Färbekammer verteilen und Objektträger in die Färbekammer legen
- 3) 4% Paraformaldehyd-Lösung auf die umrandeten Schnitte geben
(100 µl pro Objektträger)

Inkubationszeit: 3 min
- 4) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 5) Objektträger in PBS + 2% Glycin geben (in Färbeküvette),

Inkubationszeit: 20 min
- 6) 1x waschen mit PBS + 0.1% Tween
- 7) Schnitte mit PBS + 0.2% Triton-X-100 permeabilisieren

(in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger), Inkubationszeit: 20 min
- 8) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 9) Blockieren von unspezifischen Bindungen mit PBS + 3% BSA

(in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger), Inkubationszeit: 30 min
- 10) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 11) Zugabe des Primär-Antikörpers (in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger):
anti green fluorescent protein rabbit IgG fraction, 2 mg/ml, invitrogen

Konzentration 1:100 (= 20 µg/ml), Inkubationszeit: 1 h
- 12) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 13) Zugabe des Sekundär-Antikörpers (in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger):

Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG, 2 mg/ml, invitrogen

Konzentration 1:200 (= 10 µg/ml), Inkubationszeit: 1 h

14) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)

15) Anfärben der Zellkerne mit DAPI, (in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger)

Konzentration 1:1500 (= 3.3 µg/ml), Inkubationszeit: 1 min

16) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)

17) Eindeckeln mit Mounting Medium (Dako Fluorescent Mounting Medium)

3. Immunfluoreszenzfärbung von eGFP und CD11b

1) Schnitte mit Fettstift umranden

2) etwas PBS mit Pasteur-Pipette in der Färbekammer verteilen und Objektträger in die Färbekammer legen

3) 4% Paraformaldehyd-Lösung auf die umrandeten Schnitte geben
(100 µl pro Objektträger)

Inkubationszeit: 3 min

4) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)

5) Objektträger in PBS + 2% Glycin geben (in Färbeküvette)

Inkubationszeit: 20 min

6) 1x waschen mit PBS + 0.1% Tween

7) Schnitte mit PBS + 0.2% Triton-X-100 permeabilisieren

(in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger), Inkubationszeit: 20 min

8) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)

9) Blockieren von unspezifischen Bindungen mit PBS + 3% BSA

(in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger), Inkubationszeit: 30 min

10) 3x waschen mit PBS + 0,1% Tween (in Färbeküvette)

11) Zugeben der Primär-Antikörper (in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger):

- anti green fluorescent protein rabbit IgG fraction, 2 mg/ml, invitrogen
- PE anti-mouse CD11b, 0,2 mg/ml, BD Pharmingen

Konzentration 1:100 (anti-GFP: 20 µg/ml, anti-CD11b: 2 µg/ml),

Inkubationszeit: 1 h

12) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)

13) Zugeben der Sekundär-Antikörper, (in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger)

- Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG, 2 mg/ml, invitrogen
- Alexa Fluor 594 donkey anti-rat IgG, 2 mg/ml, invitrogen

Konzentration 1:200 (= 10 µg/ml), Inkubationszeit: 1 h

14) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)

15) Anfärben der Zellkerne mit DAPI, (in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger)

Konzentration 1:1500 (= 3.3 µg/ml), Inkubationszeit: 1 min

16) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)

17) Eindeckeln mit Mounting Medium (Dako Fluorescent Mounting Medium)

4. Immunfluoreszenzfärbung von eGFP und CD11c

1) Schnitte mit Fettstift umranden

2) etwas PBS mit Pasteur-Pipette in der Färbekammer verteilen und Objektträger in die Färbekammer legen

3) 4% Paraformaldehyd-Lösung auf die umrandeten Schnitte geben
(100 µl pro Objektträger)

Inkubationszeit: 3 min

4) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)

5) Objektträger in PBS + 2% Glycin geben (in Färbeküvette)

Inkubationszeit: 20 min

6) 1x waschen mit PBS + 0.1% Tween

7) Schnitte mit PBS + 0.2% Triton-X-100 permeabilisieren

(in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger), Inkubationszeit: 20 min

8) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)

9) Blockieren von unspezifischen Bindungen mit PBS + 3% BSA

(in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger), Inkubationszeit: 30 min

10) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)

11) Zugabe der Primär-Antikörper (in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger):

- anti green fluorescent protein rabbit IgG fraction, 2 mg/ml, invitrogen
- PE conjugated anti-mouse CD11c, 0,2 mg/ml, eBioscience

Konzentration 1:100 (anti-GFP: 20 µg/ml, anti-CD11c: 2 µg/ml)

Inkubationszeit: 1 h

12) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)

13) Zugabe der Sekundär-Antikörper (in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger)

- Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG, 2 mg/ml, invitrogen
- Alexa Fluor 594 goat anti-hamster IgG, 2 mg/ml, invitrogen

Konzentration 1:200 (= 10 µg/ml), Inkubationszeit: 1 h

14) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)

15) Anfärben der Zellkerne mit DAPI (in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger)

Konzentration 1:1500 (= 3.3 µg/ml), Inkubationszeit: 1 min

16) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)

17) Eindeckeln mit Mounting Medium (Dako Fluorescent Mounting Medium)

5. Immunfluoreszenzfärbung von eGFP und B220

- 1) Schnitte mit Fettstift umranden
- 2) etwas PBS mit Pasteur-Pipette in der Färbekammer verteilen und Objektträger in die Färbekammer legen
- 3) 4% Paraformaldehyd-Lösung auf die umrandeten Schnitte geben
(100 µl pro Objektträger)

Inkubationszeit: 3 min
- 4) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 5) Objektträger in PBS + 2% Glycin geben (in Färbeküvette)

Inkubationszeit: 20 min
- 6) 1x waschen mit PBS + 0.1% Tween
- 7) Blockieren von unspezifischen Bindungen mit PBS + 3% BSA

(in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger), Inkubationszeit: 30 min
- 8) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 9) Zugabe des ersten Primär-Antikörpers (in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger):

PE anti-mouse/human CD45R, 0.2 mg/ml, eBioscience

Konzentration 1:500 (= 0.4 µg/ml), Inkubationszeit: 45 min
- 10) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 11) Zugabe des ersten Sekundär-Antikörpers (in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger)

Alexa Fluor 594 donkey anti-rat IgG, 2 mg/ml, invitrogen

Konzentration 1:200 (= 10 µg/ml), Inkubationszeit: 45 min

- 12) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 13) Schnitte mit PBS + 0.2% Triton-X-100 permeabilisieren
(in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger), Inkubationszeit: 20 min
- 14) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 15) Blockieren von unspezifischen Bindungen mit PBS + 3% BSA
(in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger), Inkubationszeit: 30 min
- 16) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 17) Zugeben des zweiten Primär-Antikörpers (in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger):
anti green fluorescent protein rabbit IgG fraction, 2 mg/ml, invitrogen
Konzentration 1:100 (= 20 µg/ml), Inkubationszeit: 45 min
- 18) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 19) Zugeben des zweiten Sekundär-Antikörpers (in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger):
Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG, 2 mg/ml, invitrogen
Konzentration 1:200 (= 10 µg/ml), Inkubationszeit: 45 min
- 20) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 21) Anfärben der Zellkerne mit DAPI (in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger)
Konzentration 1:1500 (= 3.3 µg/ml), Inkubationszeit: 1 min
- 22) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 23) Eindeckeln mit Mounting Medium (Dako Fluorescent Mounting Medium)

6. Immunfluoreszenzfärbung von eGFP und ki-67

1) Schnitte mit Fettstift umranden

2) etwas PBS mit Pasteur-Pipette in der Färbekammer verteilen und Objektträger in die Färbekammer legen

3) 4% Paraformaldehyd-Lösung auf die umrandeten Schnitte geben
(100 µl pro Objektträger)

Inkubationszeit: 3 min

4) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)

5) Objektträger in PBS + 2% Glycin geben (in Färbeküvette),

Inkubationszeit: 20 min

6) 1x waschen mit PBS + 0.1% Tween

7) Zugeben eines Fc-Rezeptor-Blocks (anti-mouse CD16/32, 0.5 mg/ml)

(in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger),

Konzentration 1:200 (= 2.5 µg/ml), Inkubationszeit: 20 min

8) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)

9) Zugeben des ersten Primär-Antikörpers (in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger)

PE conjugated mouse anti-human ki-67 antibody, BD Pharmingen

Konzentration 1:50, Inkubationszeit: über Nacht

10) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)

11) Zugeben des ersten Sekundär-Antikörpers (in Färbekammer, 100 µl pro Objektträger):

Rhodamine conjugated affinity purified anti-R-phycoerythrin, 1 mg/ml, Rockland

Konzentration 1:200 (= 5 µg/ml), Inkubationszeit: 1 h

- 12) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 13) Schnitte mit PBS + 0.2% Triton-X-100 permeabilisieren
(in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger), Inkubationszeit: 20 min
- 14) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 15) Zugabe des zweiten Primär-Antikörpers (in Färbekammer, 100 µl pro Objektträger)

anti green fluorescent protein rabbit IgG fraction, 2 mg/ml, invitrogen

Konzentration 1:50 (= 40 µg/ml), Inkubationszeit: 1 h
- 16) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 17) Zugabe des zweiten Sekundär-Antikörpers (in Färbekammer, 100 µl pro Objektträger)

Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG, 2 mg/ml, invitrogen

Konzentration 1:200 (= 10 µg/ml), Inkubationszeit: 1 h
- 18) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 19) Anfärben der Zellkerne mit DAPI (in Färbekammer; 100 µl pro Objektträger)

Konzentration 1:1500 (= 3.3 µg/ml), Inkubationszeit: 1 min
- 20) 3x waschen mit PBS + 0.1% Tween (in Färbeküvette)
- 21) Eindeckeln mit Mounting Medium (Dako Fluorescent Mounting Medium)

III Statistische Auswertung

1. Statistische Auswertung der Gruppen 8 Wochen / 2 Tage, 8 Wochen / 6 Tage, 8 Wochen / 14 Tage, 12 Wochen / 2 Tage, 12 Wochen / 6 Tage, 12 Wochen / 14 Tage, 16 Wochen / 2 Tage, 16 Wochen / 6 Tage und 16 Wochen / 14 Tage

ug	zp	zppfmm	za
1	32	1714,13882	29
1	0	0	10
1	15	548,375831	38
2	13	85,6523277	46
2	4	88,6549856	3
2	4	5,47675119	4
3	10	60,0049204	16
3	0	0	71
3	28	340,815353	53
4	54	738,427935	62
4	44	226,709781	56
4	7	1409,49336	17
5	6	49,527377	7
5	17	35,4761557	11
5	6	239,315918	14
6	4	8,8178756	0
6	1	4,75490825	0
6	25	100,544384	112
7	16	41,2360824	1
7	35	171,088233	11
7	19	48,3105791	2
8	2	7,66336376	6
8	0	0	2
8	20	85,6479697	10
9	5	95,6956114	13
9	8	225,383743	40
9	1	20,0493213	25
9	18	211,905833	157

ug = untergruppe

1 = 8 Wochen Cholesterinfutter, Organentnahme 2 Tage nach Injektion von KSL-Zellen

2 = 8 Wochen Cholesterinfutter, Organentnahme 6 Tage nach Injektion von KSL-Zellen

3 = 8 Wochen Cholesterinfutter, Organentnahme 14 Tage nach Injektion von KSL-Zellen

4 = 12 Wochen Cholesterinfutter, Organentnahme 2 Tage nach Injektion von KSL-Zellen

5 = 12 Wochen Cholesterinfutter, Organentnahme 6 Tage nach Injektion von KSL-Zellen

6 = 12 Wochen Cholesterinfutter, Organentnahme 14 Tage nach Injektion von KSL-Zellen

7 = 16 Wochen Cholesterinfutter, Organentnahme 2 Tage nach Injektion von KSL-Zellen

8 = 16 Wochen Cholesterinfutter, Organentnahme 6 Tage nach Injektion von KSL-Zellen

9 = 16 Wochen Cholesterinfutter, Organentnahme 14 Tage nach Injektion von KSL-Zellen

zp = absolut gezählte Zellen im Plaque, jeweils 7 Schnitte

zppfmm = Zellzahl bezogen auf einen mm^2 Plaquefläche, jeweils 7 Schnitte

za = absolut gezählte Zellen in der Adventitia, jeweils 7 Schnitte

Mittelwerte und Standardabweichungen in den einzelnen Gruppen
a) absolute Zellzahl im atherosklerotischen Plaque

```
. summarize zp if ug==1
```

variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zp	3	15.66667	16.01041	0	32

```
. summarize zp if ug==2
```

variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zp	3	7	5.196152	4	13

```
. summarize zp if ug==3
```

variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zp	3	12.66667	14.1892	0	28

```
. summarize zp if ug==4
```

variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zp	3	35	24.75884	7	54

```
. summarize zp if ug==5
```

variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zp	3	9.666667	6.350853	6	17

```
. summarize zp if ug==6
```

variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zp	3	10	13.0767	1	25

```
. summarize zp if ug==7
```

variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zp	3	20.33333	13.05118	10	35

```
. summarize zp if ug==8
```

variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zp	3	7.333333	11.01514	0	20

```
. summarize zp if ug==9
```

variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zp	4	8	7.25718	1	18

b) Zellzahl im atherosklerotischen Plaque pro mm² Plaquefläche

. summarize zppfmm if ug==1

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zppfmm	18	125.6953	207.1561	0	606.1708

. summarize zppfmm if ug==2

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zppfmm	19	10.84264	18.41613	0	61.06497

. summarize zppfmm if ug==3

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zppfmm	18	22.26779	43.5752	0	157.4456

. summarize zppfmm if ug==4

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zppfmm	20	118.7316	215.0177	0	924.2144

. summarize zppfmm if ug==5

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zppfmm	15	21.6213	28.58071	0	84.17981

. summarize zppfmm if ug==6

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zppfmm	21	5.434151	14.67872	0	64.8831

. summarize zppfmm if ug==7

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zppfmm	20	13.03174	26.04418	0	103.8889

. summarize zppfmm if ug==8

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zppfmm	20	4.665567	19.13794	0	85.64797

. summarize zppfmm if ug==9

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zppfmm	21	26.33498	44.16042	0	140.2446

c) Absolute Zellzahl in der Adventitia

. summarize za if ug==1

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
za	18	4.277778	7.002567	0	27

. summarize za if ug==2

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
za	19	2.789474	4.076749	0	10

. summarize za if ug==3

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
za	21	6.666667	6.514087	0	24

. summarize za if ug==4

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
za	19	7.105263	6.471259	0	22

. summarize za if ug==5

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
za	15	2.133333	2.16685	0	7

. summarize za if ug==6

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
za	21	5.333333	9.525405	0	31

. summarize za if ug==7

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
za	20	.7	1.894591	0	8

. summarize za if ug==8

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
za	20	.9	2.291862	0	10

. summarize za if ug==9

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
za	23	10.21739	13.36874	0	60

2. Statistische Auswertung der Gruppen 2 Tage, 6 Tage und 14 Tage nach KSL-Zellinjektion unabhängig von der Dauer der Cholesterinfütterung

og	zp	zppfmm	za
1	32	1714,139	29
1	0	0	10
1	15	548,3758	38
1	54	738,4279	62
1	44	226,7098	56
1	7	1409,493	17
1	16	41,23608	1
1	35	171,0882	11
1	10	48,31058	2
2	13	85,65233	46
2	4	88,65499	3
2	4	5,476751	4
2	6	49,52738	7
2	17	35,47616	11
2	6	239,3159	14
2	2	7,663364	6
2	0	0	2
2	20	85,64797	10
3	10	60,00492	16
3	0	0	71
3	28	340,8154	53
3	4	8,817876	0
3	1	4,754908	0
3	25	100,5444	112
3	5	95,69561	13
3	8	225,3837	40
3	1	20,04932	25
3	18	211,9058	157

og = obergruppe

1 = 2 Tage nach Injektion von KSL-Zellen

2 = 6 Tage nach Injektion von KSL-Zellen

3 = 14 Tage nach Injektion von KSL-Zellen

zp = absolut gezählte Zellen im Plaque, jeweils 7 Schnitte

zppfmm = Zellzahl bezogen auf einen mm² Plaquefläche, jeweils 7 Schnitte

za = absolut gezählte Zellen in der Adventitia, jeweils 7 Schnitte

a) Absolute Zellzahl im atherosklerotischen Plaque

Mittelwert und Standardabweichung in den Gruppen 1, 2 und 3

sum zp if og ==1

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zp	9	23.66667	18.33712	0	54

. sum zp if og ==2

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zp	9	8	6.98212	0	20

sum zp if og ==3

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zp	10	10	10.21981	0	28

One-Way-Anova-Test:

og	Summary of zp		Freq.
	Mean	Std. Dev.	
1	23.666667	18.337121	9
2	8	6.98212	9
3	10	10.219806	10
Total	13.75	14.067628	28

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	1323.25	2	661.625	4.11	0.0285
within groups	4020	25	160.8		
Total	5343.25	27	197.898148		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 7.1472$ Prob> $\chi^2 = 0.028$

T-Test für die Gruppen 1 und 2, 1 und 3 und 2 und 3

. ttest zp, by (og)

Two-sample t test with equal variances

Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
1	9	23.66667	6.112374	18.33712	9.571508	37.76183
2	9	8	2.327373	6.98212	2.633067	13.36693
combined	18	15.83333	3.69795	15.68907	8.03134	23.63533
diff		15.66667	6.540472		1.801485	29.53185

diff = mean(1) - mean(2) t = 2.3953
 Ho: diff = 0 degrees of freedom = 16
 Ha: diff < 0 Ha: diff != 0 Ha: diff > 0
 Pr(T < t) = **0.9854** Pr(|T| > |t|) = **0.0292** Pr(T > t) = **0.0146**

. ttest zp, by (og)

Two-sample t test with equal variances

Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
1	9	23.66667	6.112374	18.33712	9.571508	37.76183
3	10	10	3.231787	10.21981	2.689191	17.31081
combined	19	16.47368	3.633316	15.83726	8.840371	24.107
diff		13.66667	6.714047		-.498735	27.83207

diff = mean(1) - mean(3) t = 2.0355
 Ho: diff = 0 degrees of freedom = 17
 Ha: diff < 0 Ha: diff != 0 Ha: diff > 0
 Pr(T < t) = **0.9712** Pr(|T| > |t|) = **0.0577** Pr(T > t) = **0.0288**

ttest zp, by (og)

Two-sample t test with equal variances

Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
2	9	8	2.327373	6.98212	2.633067	13.36693
3	10	10	3.231787	10.21981	2.689191	17.31081
combined	19	9.052632	1.986024	8.656877	4.88015	13.22511
diff		-2	4.06403		-10.57435	6.574354

diff = mean(2) - mean(3) t = -0.4921
 Ho: diff = 0 degrees of freedom = 17
 Ha: diff < 0 Ha: diff != 0 Ha: diff > 0
 Pr(T < t) = **0.3145** Pr(|T| > |t|) = **0.6289** Pr(T > t) = **0.6855**

b) Zellzahl im atherosklerotischen Plaque pro mm² Plaquefläche

Mittelwert und Standardabweichung in den Gruppen 1, 2 und 3

. sum zppfmm if og ==1

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zppfmm	9	544.1978	631.4939	0	1714.139

. sum zppfmm if og ==2

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zppfmm	9	66.37943	74.11806	0	239.3159

. sum zppfmm if og ==3

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zppfmm	10	106.7972	116.0318	0	340.8154

One-Way-Anova-Test:

. oneway zppfmm og, t

og	Summary of zppfmm		Freq.
	Mean	Std. Dev.	
1	544.19785	631.49391	9
2	66.379428	74.118061	9
3	106.79719	116.03178	10
Total	234.39884	414.37459	28

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	1280675.33	2	640337.663	4.77	0.0176
within groups	3355394.72	25	134215.789		
Total	4636070.04	27	171706.298		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 35.6430 Prob>chi2 = 0.000

T-Test für die Gruppen 1 und 2, 1 und 3 und 2 und 3

. ttest zppfmm, by (og)

Two-sample t test with equal variances

Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
1	9	544.1978	210.498	631.4939	58.78866	1029.607
2	9	66.37943	24.70602	74.11806	9.407242	123.3516
combined	18	305.2886	118.0121	500.6831	56.30477	554.2725
diff		477.8184	211.9429		28.51959	927.1172

diff = mean(1) - mean(2) t = 2.2545
 Ho: diff = 0 degrees of freedom = 16

Ha: diff < 0 Ha: diff != 0 Ha: diff > 0
 Pr(T < t) = 0.9807 Pr(|T| > |t|) = 0.0385 Pr(T > t) = 0.0193

. ttest zppfmm, by (og)

Two-sample t test with equal variances

Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
1	9	544.1978	210.498	631.4939	58.78866	1029.607
3	10	106.7972	36.69247	116.0318	23.79306	189.8013
combined	19	313.987	111.0515	484.0625	80.67634	547.2976
diff		437.4007	202.7869		9.557611	865.2437

diff = mean(1) - mean(3) t = 2.1569
 Ho: diff = 0 degrees of freedom = 17

Ha: diff < 0 Ha: diff != 0 Ha: diff > 0
 Pr(T < t) = 0.9772 Pr(|T| > |t|) = 0.0456 Pr(T > t) = 0.0228

. ttest zppfmm, by (og)

Two-sample t test with equal variances

Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
2	9	66.37943	24.70602	74.11806	9.407242	123.3516
3	10	106.7972	36.69247	116.0318	23.79306	189.8013
combined	19	87.65194	22.48172	97.99556	40.41959	134.8843
diff		-40.41777	45.28232		-135.9551	55.11957

diff = mean(2) - mean(3) t = -0.8926
 Ho: diff = 0 degrees of freedom = 17

Ha: diff < 0 Ha: diff != 0 Ha: diff > 0
 Pr(T < t) = 0.1923 Pr(|T| > |t|) = 0.3845 Pr(T > t) = 0.8077

c) Absolute Zellzahl in der Adventitia

Mittelwert und Standardabweichung in den Gruppen 1, 2 und 3

sum za if og ==1

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
za	9	25.11111	22.65196	1	62

. sum za if og ==2

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
za	9	11.44444	13.54724	2	46

sum za if og ==3

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
za	10	48.7	51.61406	0	157

One-Way-Anova-Test:

. oneway za og, t

og	Summary of za		Freq.
	Mean	Std. Dev.	
1	25.11111	22.651956	9
2	11.44444	13.547242	9
3	48.7	51.614059	10
Total	29.142857	36.686575	28

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	6790.21746	2	3395.10873	2.87	0.0754
Within groups	29549.2111	25	1181.96844		
Total	36339.4286	27	1345.90476		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 13.5377$ Prob> $\chi^2 = 0.001$

T-Test für die Gruppen 1 und 2, 1 und 3 und 2 und 3

. ttest za, by (og)

Two-sample t test with equal variances

Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
1	9	25.11111	7.550652	22.65196	7.699276	42.52295
2	9	11.44444	4.515747	13.54724	1.031112	21.85778
combined	18	18.27778	4.578156	19.42347	8.618713	27.93684
diff		13.66667	8.797973		-4.984202	32.31754

diff = mean(1) - mean(2) t = 1.5534
 Ho: diff = 0 degrees of freedom = 16

Ha: diff < 0 Ha: diff != 0 Ha: diff > 0
 Pr(T < t) = 0.9301 Pr(|T| > |t|) = 0.1399 Pr(T > t) = 0.0699

. ttest za, by (og)

Two-sample t test with equal variances

Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
1	9	25.11111	7.550652	22.65196	7.699276	42.52295
3	10	48.7	16.3218	51.61406	11.77753	85.62247
combined	19	37.52632	9.477079	41.30963	17.61571	57.43692
diff		-23.58889	18.674		-62.98758	15.8098

diff = mean(1) - mean(3) t = -1.2632
 Ho: diff = 0 degrees of freedom = 17

Ha: diff < 0 Ha: diff != 0 Ha: diff > 0
 Pr(T < t) = 0.1118 Pr(|T| > |t|) = 0.2236 Pr(T > t) = 0.8882

ttest za, by (og)

Two-sample t test with equal variances

Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
2	9	11.44444	4.515747	13.54724	1.031112	21.85778
3	10	48.7	16.3218	51.61406	11.77753	85.62247
combined	19	31.05263	9.67588	42.17618	10.72436	51.3809
diff		-37.25556	17.77569		-74.75899	.2478774

diff = mean(2) - mean(3) t = -2.0959
 Ho: diff = 0 degrees of freedom = 17

Ha: diff < 0 Ha: diff != 0 Ha: diff > 0
 Pr(T < t) = 0.0257 Pr(|T| > |t|) = 0.0514 Pr(T > t) = 0.9743

3. Statistische Auswertung der Gruppen 8 Wochen, 16 Wochen und 14 Wochen unabhängig von der Zeit nach KSL-Zellinjektion

og	zp	zppfmm	za
1	32	1714,13882	29
1	0	0	10
1	15	548,375831	38
1	13	85,6523277	46
1	4	88,6549856	3
1	4	5,47675119	4
1	10	60,0049204	16
1	0	0	71
1	28	340,815353	53
2	54	738,427935	62
2	44	226,709781	56
2	7	1409,49336	17
2	6	49,527377	7
2	17	35,4761557	11
2	6	239,315918	14
2	4	8,8178756	0
2	1	4,75490825	0
2	25	100,544384	112
3	16	41,2360824	1
3	35	171,088233	11
3	10	48,3105791	2
3	2	7,66336376	6
3	0	0	2
3	20	85,6479697	10
3	5	95,6956114	13
3	8	225,383743	40
3	1	20,0493213	25
3	18	211,905833	157

og = obergruppe

1 =8 Wochen Cholesterinfutter

2 = 12 Wochen Cholesterinfutter

3 = 16 Wochen Cholesterinfutter

zp = absolut gezählte Zellen im Plaque, jeweils 7 Schnitte

zppfmm = Zellzahl bezogen auf einen mm² Plaquefläche, jeweils 7 Schnitte

za = absolut gezählte Zellen in der Adventitia, jeweils 7 Schnitte

a) Absolute Zellzahl im atherosklerotischen Plaque

Mittelwert und Standardabweichung in den Gruppen 1, 2 und 3

```
.
.
. summarize zp if og==1
```

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zp	9	11.77778	11.6488	0	32

```
. summarize zp if og==2
```

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zp	9	18.22222	19.09043	1	54

```
. summarize zp if og==3
```

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zp	10	11.5	10.93669	0	35

One-Way-Anova-Test:

oneway zp og, t

og	Summary of zp			Freq.
	Mean	Std. Dev.		
1	11.777778	11.648796		9
2	18.222222	19.090428		9
3	11.5	10.936686		10
Total	13.75	14.067628		28

Source	Analysis of variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	265.638889	2	132.819444	0.65	0.5287
within groups	5077.61111	25	203.104444		
Total	5343.25	27	197.898148		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 3.1462$ Prob> $\chi^2 = 0.207$

b) Zellzahl im atherosklerotischen Plaque pro mm² Plaquefläche

Mittelwert und Standardabweichung in den Gruppen 1, 2 und 3

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zppfmm	9	315.9021	556.3073	0	1714.139

. summarize zppfmm if og==2

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zppfmm	9	312.5631	471.0728	4.754908	1409.493

. summarize zppfmm if og==3

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
zppfmm	10	90.69807	84.12949	0	225.3837

One-Way-Anova-Test :

. oneway zppfmm og, t

og	Summary of zppfmm		Freq.
	Mean	Std. Dev.	
1	315.90211	556.30729	9
2	312.56308	471.07281	9
3	90.698074	84.129494	10
Total	234.39884	414.37459	28

Source	Analysis of variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	321270.981	2	160635.491	0.93	0.4075
within groups	4314799.06	25	172591.963		
Total	4636070.04	27	171706.298		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 20.9426 Prob>chi2 = 0.000

c) Absolute Zellzahl in der Adventitia

Mittelwert und Standardabweichung in den Gruppen 1, 2 und 3

. summarize za if og==1

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
za	58	4.655172	6.12029	0	27

. summarize za if og==2

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
za	55	5.072727	7.256809	0	31

. summarize za if og==3

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
za	63	4.238095	9.328614	0	60

One-Way-Anova-Test:

. oneway za og, t

og	Summary of za		Freq.
	Mean	Std. Dev.	
1	30	23.80126	9
2	31	37.963799	9
3	26.7	47.352226	10
Total	29.142857	36.686575	28

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	97.3285714	2	48.6642857	0.03	0.9670
Within groups	36242.1	25	1449.684		
Total	36339.4286	27	1345.90476		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 3.4537 Prob>chi2 = 0.178