

Aus dem Institut für Experimentelle Biomedizin

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Alma Zerneck-Madsen

Die Entwicklung und Charakterisierung Dendritischer Zell-Subsets in der gesunden und arteriosklerotischen Aorta



Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Thilo Chou-Jong Westhofen

aus Hamburg

Würzburg, Dezember 2022



Referentin: Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen

Korreferent: Prof. Dr. Manfred Lutz

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	4
2	Zusammenfassung.....	6
3	Einleitung	8
3.1	Dendritische Zellen	8
3.1.1	Einleitung zu Dendritischen Zellen	8
3.1.2	Ontogenese der Dendritischen Zellen.....	11
3.1.3	DC-Subsets	15
3.2	Arteriosklerose	17
3.2.1	Arteriosklerose und ihre klinische Bedeutung	17
3.2.2	Pathogenese der Arteriosklerose	18
3.2.3	Mausmodelle für Arteriosklerose.....	21
3.2.4	Das Immunsystem und Arteriosklerose.....	23
3.2.5	Dendritische Zellen in der Arteriosklerose.....	26
4	Zielsetzung.....	30
5	Material und Methoden	31
5.1	Material	31
5.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	31
5.1.2	Geräte.....	32
5.1.3	Chemikalien.....	33
5.1.3.1	Zellkultur und Durchflusszytometrie	33
5.1.3.2	Histologie und Immunhistochemie	33
5.1.4	Antikörper	34
5.1.4.1	Durchflusszytometrie	34
5.1.4.2	Immunhistochemie	36
5.1.5	Lösungen, Puffer, Medien	36
5.2	Methoden	37
5.2.1	Mausmodell	37
5.2.1.1	Mäuse und Haltung	37
5.2.1.2	Modell zu Entstehung von Arteriosklerose	37
5.2.2	DC-Kulturen aus Knochenmarksstammzellen	38
5.2.3	Präparation von Herzen und Aorten.....	39
5.2.4	Durchflusszytometrie	39
5.2.4.1	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	39
5.2.4.2	Enzymatischer Gewebsverdau und Herstellung der Zellsuspension.....	40
5.2.4.3	Färbung der Zellsuspensionen und Durchflusszytometrische Messung.....	41
5.2.5	Histologie	41
5.2.5.1	Fixierung des Gewebes und Herstellung der Gewebsschnitte	41
5.2.5.2	Oil-Red-O lipid-Färbung von Aortenwurzel-Schnitten	42

5.2.6	Immunfluoreszenz	42
5.2.6.1	Prinzip der Immunfluoreszenz	42
5.2.6.2	Immunfluoreszenzfärbung	43
5.2.7	Statistik	43
6	Ergebnisse	45
6.1	Lokalisation CD11c positiver Zellen in der Aorta	45
6.2	Identifikation und Quantifizierung unterschiedlicher DC-Subsets	47
6.2.1	DC Subsets in vitro	47
6.2.2	DC-Subsets in der Aorta	48
6.3	Kinetik der DC-Subsets während der Atherogenese	50
6.3.1	Histologische Identifikation der DC-Subsets	54
6.4	Immunphänotypische Charakterisierung der Subsets	58
6.4.1	Immunphänotypische Charakterisierung der Subsets in der Aorta	58
6.5	Herkunft aortaler DC-Subsets	59
6.5.1	Flt3/Flt3L abhängige DC-Subsets	59
6.5.2	Monozyten-abgeleitete DCs	63
6.5.2.1	High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor 1 (FcγR1) CD64	63
6.5.2.2	Chemokin-Rezeptor CX ₃ CR1	64
6.5.2.3	Lokalisation CX ₃ CR1 pos Zellen in der Aorta	66
7	Diskussion	68
7.1	DC Subsets in vitro	68
7.2	DC Subsets in vivo	70
7.3	Kinetik der DC-Subsets während der Atherogenese	71
7.4	Immunphänotypische Charakterisierung der Subsets	73
7.5	Herkunft Aortaler DCs	74
8	Fazit und Ausblick	79
9	Literaturverzeichnis	81
10	Abbildungsverzeichnis	92
11	Zugrundeliegende Originalarbeit <i>Dendritic Cell Subset Distributions in the Aorta in Healthy and Atherosclerotic Mice</i>	97
12	Danksagung	105
13	Eidesstattliche Erklärung	106
14	Curriculum Vitae	107

1 Abkürzungsverzeichnis

ACAT	Acyl-CoA-Cholesterinester-Transferase
APC	antigenpräsentierende Zellen
ApoB100	Apolipoprotein B100
ApoE	Apolipoprotein E
CCL17	C-C-chemokine ligand 17
CCL2	C-C-chemokine ligand 2
CCR5	C-C chemokine receptor type 5
CD	Cluster of differentiation
cDC	Conventional dendritic cell
CDP	Common dendritic cell progenitor
CLP	common lymphoid progenitor
CMP	common myeloid progenitor
CX ₃ CR1	Chemokine (C-X3-C) receptor 1
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindole
DC	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EYFP	Enhanced yellow fluorescent protein
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FcγR1	affinity immunoglobulin gamma Fc receptor 1
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Flt3	Fms-like tyrosine kinase 3
Flt3L	Fms-like tyrosine kinase 3 ligand
FSC	forward scatter
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HBSS	Hank's balanced salt solution
HSC	hämatopoetischen Stammzellen
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleukin
IL-12	Interleukin 12
IL-34	Interleukin 34
Ldlr	Low-density lipoprotein receptor
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	LDL-receptor-related protein

Ly6C	Lymphocyte antigen 6 complex
LZ	Langerhanszellen
Mac ^{air}	aorta-intima-resident macrophages
MC	monocyte derived cell
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MDP	Macrophage and DC progenitor
mg	Milligramm
MHCI	Major histocompatibility complex I
MHCII	Major histocompatibility complex II
mm	Millimeter
moDC	monocyte-derived Dendritische Zelle
MPD	macrophage-DC-progenitor
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
oxLDL	Oxidised low-density lipoprotein
PBS	Phosphate buffered saline
PBS	Phosphate Buffered Saline Solution
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDC	plasmazytoide Dendritische Zelle
PFA	Paraformaldehyde
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute (medium)
scRNAseq	single cell RNA sequencing
Sirp α	signal-regulatory protein alpha
SR-A1	Scavenger-Rezeptor A1
SSC	side scatter
TGF β	Transforming growth factor beta
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
Treg	regulatorische T-Zellen
VSMCs	vascular smooth muscle cells
μ g	Microgramm
μ l	Microliter

2 Zusammenfassung

Arteriosklerose ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung der Gefäßwand. Nach aktuellem Wissensstand sind Dendritische Zellen (DCs) maßgeblich an der Entstehung und dem Fortschreiten von Arteriosklerose beteiligt. In der Vergangenheit konnten für DCs unterschiedliche Subsets beschrieben werden, die sowohl proinflammatorische als auch immunregulatorische Funktionen übernehmen können. Die systematische Charakterisierung von DCs in der gesunden Aorta, sowie während der Entstehung von Arteriosklerose ist jedoch noch ausstehend.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die systematische Einteilung von DCs *in vitro* mit Hilfe von DCs aus Flt3L-Knochenmarkskulturen durchgeführt. Aufbauend darauf erfolgte die systematische Analyse aortaler DCs durch tierexperimentelle Untersuchungen an gesunden *C57BL/6J* Mäusen, sowie Apolipoprotein E-defizienten (*ApoE*^{-/-}) Mäusen und low-density-lipoprotein-receptor-defizienten (*Ldlr*^{-/-}) Mäusen während der Atherogenese. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen von CD11c^{YFP}reporter Mäusen konnten zudem korrelierend DCs in der Gefäßwand der murinen Aorta lokalisiert werden.

In der Aorta von gesunden *C57BL/6*-Mäusen und *Ldlr*^{-/-} Mäusen unter normaler Diät konnten CD11c⁺MHCII⁺ DCs identifiziert werden und in 4 distinkte Subsets CD103⁻CD11b⁺F4/80⁺, CD103⁻CD11b⁺F4/80⁻, CD103⁻CD11b⁻F4/80⁻ DCs sowie CD103⁺CD11b⁻F4/80⁻ DCs unterteilt werden. Nach 6- bzw. 12 Wochen proatherogener *high-fat* Diät zeigten alle Subsets bis auf die CD103⁻CD11b⁻F4/80⁻ DCs ein relevantes Wachstum. Im Rahmen der genaueren Charakterisierung der Subsets konnte die Expression von Sirpα für das CD103⁻CD11b⁺F4/80⁺Subset, das CD103⁻CD11b⁺F4/80⁻ Subset sowie teilweise für das CD103⁻CD11b⁻F4/80⁻ Subset, jedoch nicht für CD103⁺DCs gezeigt werden. Für alle Subsets zeigte sich gleichermaßen keine relevante Dynamik während der Atherogenese. Für CD64 konnte hingegen für keins der DC-Subsets eine Expression in der gesunden Aorta gezeigt werden. Nach 12 Wochen

proatherogener *high-fat* Diät, zeigte das CD103⁻CD11b⁺F4/80⁻ und das CD11b⁺F4/80⁺ Subset eine anteilige CD64 Expression. Umgekehrt konnte bei Mäusen mit FMS-like Tyrosinkinase 3-Ligand-Defizienz (Flt3L^{-/-}) der Verlust der CD103⁻CD11b⁺F4/80⁻ DCs und der CD103⁺DCs, nicht jedoch der anderen Subsets gezeigt werden. Des Weiteren zeigten das CD103⁻CD11b⁺F4/80⁻ Subset und das CD103⁻CD11b⁺F4/80⁺ Subset eine Zunahme der CX₃CR1-Expression während der Atherogenese. In der gesunden Aorta wies kein Subset relevante Anteile CX₃CR1-exprimierender DCs auf. Dies deutet auf einen Zuwachs dieser Subsets durch mögliche eingewanderte Monozyten hin. Immunhistochemisch konnten mit CX₃CR1^{GFP}reporter Mäusen entsprechende CX₃CR1⁺ Zellen luminal in Plaque Arealen der Aorta geortet werden.

Zusammenfassend gibt die vorliegende Arbeit erstmalig einen systematischen Überblick über die einzelnen DC-Subsets in der gesunden Aorta und während der Atherogenese. Dies trägt zu einem besseren Verständnis der Rolle der einzelnen DC Subsets während der Entstehung der Arteriosklerose bei und bietet eine mögliche Grundlage für zukünftige Behandlungsstrategien.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Februar 2014 als Originalarbeit in geteilter Erstautorenschaft von Martin Busch, Thilo Westhofen und Miriam Koch unter dem Titel *Dendritic Cell Subset Distributions in the Aorta in Healthy and Atherosclerotic Mice* im Plos One publiziert (1). Die Originalpublikation findet sich im Folgenden unter Absatz 11. Die Ergebnisse dieser Publikation wurden modifiziert unter 6.1-6.5 dargelegt und unter 7.1-7.5 im Kontext der aktuellen Literatur diskutiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Experimente von Thilo Westhofen geplant, durchgeführt und ausgewertet.

3 Einleitung

3.1 Dendritische Zellen

3.1.1 Einleitung zu Dendritischen Zellen

Dendritische Zellen (DCs), die in unterschiedlichem lymphatischen und nicht-lymphatischen Gewebe zu finden sind, gehören zu den antigenpräsentierenden Zellen (APCs) und bilden eine wichtige Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität (2, 3). DCs können im Rahmen der adaptiven Immunantwort effektiv Antigene aufnehmen, prozessieren und durch die Präsentation der Antigene über *major histocompatibility complex I* (MHC I) und *major histocompatibility complex II* (MHC II) wirksam T-Zellen stimulieren. Zudem können DCs die Bildung regulatorischer T-Zellen (Tregs) anregen und somit Autoimmunreaktionen beeinflussen (3). Darüber hinaus können sie als Effektorzellen der angeborenen Immunantwort große Mengen Zytokine wie z.B. Interleukin 12 (IL-12) produzieren, sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) aktivieren (4, 5).

DCs wurden 1973 erstmalig von Steinman und Cohn aus peripherem lymphatischem Gewebe der Maus isoliert und anhand ihrer charakteristischen sternförmigen Morphologie als eigenständige Zellart beschrieben. Neben den langen Zellausläufern, die nach dem altgriechischen „dendron“ (Baum) namensgebend für DCs sind (Abb.1), besitzen DCs einen großen gewundenem Nucleus, sowie zahlreiche große Mitochondrien. Diese typischen Merkmale wurden ursprünglich angewandt um DCs lichtmikroskopisch von anderen Zellen des Mononukleär Phagozytotischen Systems zu unterscheiden, vor allem gegenüber Makrophagen (6).

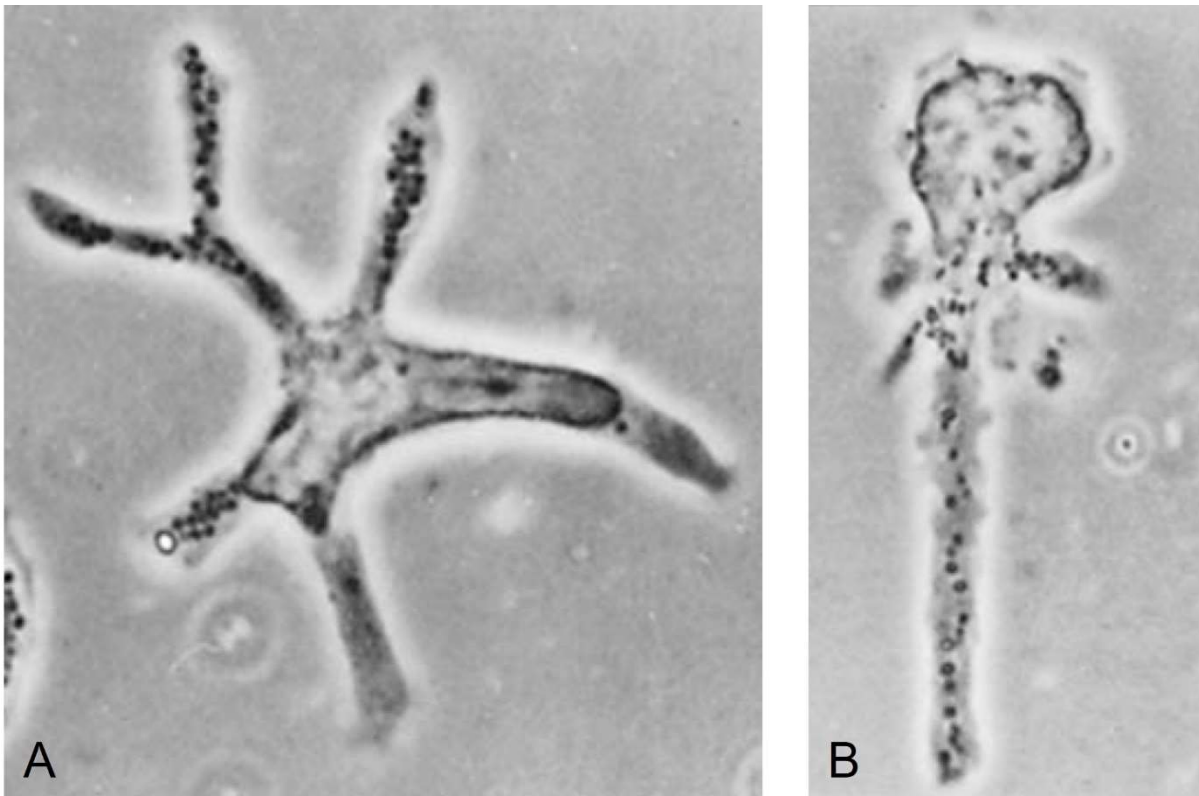


Abb. 1: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von DCs, die aus peripheren lymphoiden Organen der Maus (A) Milz, (B) Lymphknoten.

Quelle: (6)

Neben den genannten morphologischen Kriterien weisen DCs zudem bestimmte Oberflächenmarker auf, die im Rahmen zahlreicher Studien zur genaueren Charakterisierung der DCs herangezogen wurden (7). Dennoch konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt, anders als für B-Zellen und T-Zellen, kein einzelner „DC-exklusiver“ Oberflächenmarker identifiziert werden, der die eindeutige Zuordnung von DCs und klare Abgrenzung von anderen Zellen des Mononukleär Phagozytischen Systems wie Monozyten und Makrophagen ermöglicht (8). Als heterogene Gruppe unterschiedlicher Subpopulationen weisen DCs verschiedene Oberflächenmarker in verschiedenem Gewebe auf, die unter inflammatorischen Bedingungen zudem einer hohen Variabilität unterliegen (8-10). Dies wird im experimentellen Setting noch durch Unterschiede zwischen *in vitro* gezüchteten DCs und *in vivo* vorkommenden DCs erschwert (11). Diese große Variabilität und das Fehlen eines eindeutigen Oberflächen-Markers hat

kontroverse Debatten angestoßen und kurzzeitig sogar zum Anzweifeln der Dendritischen Zellen als eigenständige Zellart geführt (12).

Ausgehend von zahlreichen Studien wurden ursprünglich verschiedene Zellgruppen als DCs kategorisiert:

- klassische oder konventionelle DCs (cDCs),
- plasmazytoide DCs (pDCs),
- Langerhans Zellen und
- *monocyte-derived* DCs (moDCs) (10).

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf cDCs und orientiert sich an dem aktuellsten Wissenstand zum Zeitpunkt der Erhebung der Daten und der bis dahin akzeptierten Definition für DCs. Im Maus Modell basierte zu diesem Zeitpunkt diese Definition von cDC auf der Co-Expression des Intergrins CD11c mit MHCII (9, 13, 14).

Jüngste Studien konnten jedoch zeigen, dass die Definition von cDCs sowie die Abgrenzung gegenüber Monozyten wesentlich komplexer ist (15, 16) und die cDC-Definition basierend auf der Co-Expression von CD11c und MHCII möglicherweise unzureichend ist. Vor allem unter inflammatorischen Bedingungen zeigt sich die Differenzierung zwischen DCs, Monozyten und Makrophagen erschwert (15, 17). Durch die Implementierung von CD26 als neuen DC-Marker und der Kombination von CD64 mit F4/80 zur bessere Abgrenzung gegenüber Makrophagen konnten cDCs in $XCR1^+$ cDC1s und $Sirp\alpha^+$ cDC2s klassifiziert werden (18). Mit Hilfe neuer Technologien wie *single-cell RNA sequencing* (scRNA-seq) (16, 17, 19) und *lineage tracing* Mausmodellen (20) konnte die Charakterisierung und Klassifizierung von DCs noch verfeinert und weitere DC-spezifische Marker identifiziert werden. Auch im humanen System konnten cDCs mittlerweile genauer charakterisiert werden (16), und z.B. durch *Machine-learning* unterstützte Ansätze HLA-DQ und FcεR1a als neue Marker zur Identifizierung von cDC2s und CD88 und CD89 als Marker für Monozyten bestimmt werden (19).

Darüber hinaus konnten basierend auf funktionellen Aspekten zuletzt neue distinkte Subsets wie die inflammatorischen CD5-CD163⁺CD14⁺ cDC2s (inf-cDC2s) identifiziert werden, die nicht wie ursprünglich angenommen den moDCs zuzuordnen sind, sondern Flt3-abhängig entstehen und den cDC2s angehören(17). Dutertre et al konnten für inf-cDC2s ein zunehmendes Wachstum und Aktivitätszunahme korrelierend mit der Krankheitsaktivität beim systemischem Lupus erythematodes zeigen (19).

Auch im Rahmen viraler Infektionen konnten inf-cDC2 gefunden werden, die anhand ihrer CD26 Expression sowie der Entwicklung aus pre-DCs ebenfalls dem cDC2 Kompartiment zugeordnet wurden (17). Unter inflammatorischen Bedingungen zeigten die inf-cDC2s die Expression von CD64 als Gemeinsamkeit mit *monocyte derived cells* (MCs) und von IRF8 gemeinsam mit cDC1s, was die unter *steady state* Bedingungen etablierte Nomenklatur für DCs unter inflammatorischen Bedingungen in Frage stellt (17). Zudem konnte durch scRNA-seq von Lungentumorgewebe ein Cluster von DCs als *mature DCs enriched in immunoregulatory molecules* (mregDCs) auf Grund der Koexpression der immunregulatorischen Gene Cd274, Pdcd1lg2 und Cd200 und der Reife-Gene Cd40, Ccr7 und Il12b identifiziert werden. Diese werden in Abhängigkeit des antiinflammatorischen IL-4 gebildet und haben über eine vermehrte T-Zell - Aktivierung und mögliche immunregulatorische Funktionen Einfluss auf die Reduktion der Tumorlast (21). Diese zahlreichen Änderungen der DC-Taxonomie verdeutlichen die nach wie vor bestehende Uneinigkeit in der Definition von DCs.

3.1.2 Ontogenese der Dendritischen Zellen

Zahlreiche Arbeiten haben eine genauere Charakterisierung von DCs anhand ihrer Ontogenese angestrebt, um über die Abstammung der DCs das klarere Bild einer eigenständigen Zelllinie zu gewinnen. Diesen Arbeiten basieren hauptsächlich auf Studien am Mausmodell (9, 22-26). DCs, ausgenommen Langerhans Zellen, finden ihren Ursprung im Knochenmark und reifen über zahlreiche Vorläufer aus multipotenten CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen

heran(9, 27) Nach aktuellem Verständnis entsteht im Knochenmark aus den CD34+ multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC) der *common lymphoid progenitor* (CLP), aus dem auch B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen entstehen, sowie der *common myeloid progenitor* (CMP), aus dem auch Monozyten, Makrophagen, Megakaryozyten und Erythrozyten entstehen(28, 29). Sowohl die CLP-Population als auch die CMP-Population haben ein äquivalentes Potential, DCs zu entwickeln (30). Da die CMP-Population jedoch um mehr als das 10-fache größer ist, wird diese als Haupt-Vorläufer für DCs angesehen und eine lymphoide und myeloide Trennung im Rahmen der Entwicklung als nicht sinnvoll angesehen (8, 27). *FMS-related tyrosine kinase 3 ligand* (Flt3L) - abhängig reift ein Teil der CMP-Population zu einem gemeinsamen Vorläufer für Monozyten Makrophagen und DCs, dem *macrophage-DC-progenitor* (MDP), der als direkter Vorläufer des *common DC progenitor* (CDP) angesehen wird. CDPs bilden den ersten „DC-exklusiven-Vorläufer“ und reifen im Knochenmark zu plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDCs) und zu sogenannten „pre-DCs“ (23, 26, 31). Als Vorläufer der „conventional DCs“ (cDCs) verlassen pre-DCs das Knochenmark, wandern über die Blutbahn in unterschiedliche lymphoide und nicht-lymphoide Zielorgane, wo sie schließlich zu cDCs reifen(25, 32, 33). Im Blut zirkulierende pre-DCs stehen in einem dynamischen Gleichgewicht mit pre-DCs, die bereits in periphere lymphatische und nicht lymphatische Organe eingewandert sind und kehren nicht ins Knochenmark zurück. Die ausgeprägte DC-spezifische Plastizität der pre-DCs ermöglicht ihre Reifung in zahlreiche verschiedene DC-Subsets (31) (vgl. Abb.2). Neuste Arbeiten konnten mit Hilfe von *inducible lineage tracing* und *single-cell transcriptome and phenotype analysis* den Entwicklungsursprung von DCs genauer analysieren. Feng et al. konnten einen gemeinsamen hämatopoetischen Vorläufer für pDCs, cDC1s, und cDC2s identifizieren und einen gemeinsamen klonalen Ursprung von cDC1s und pDCs zeigen(34).

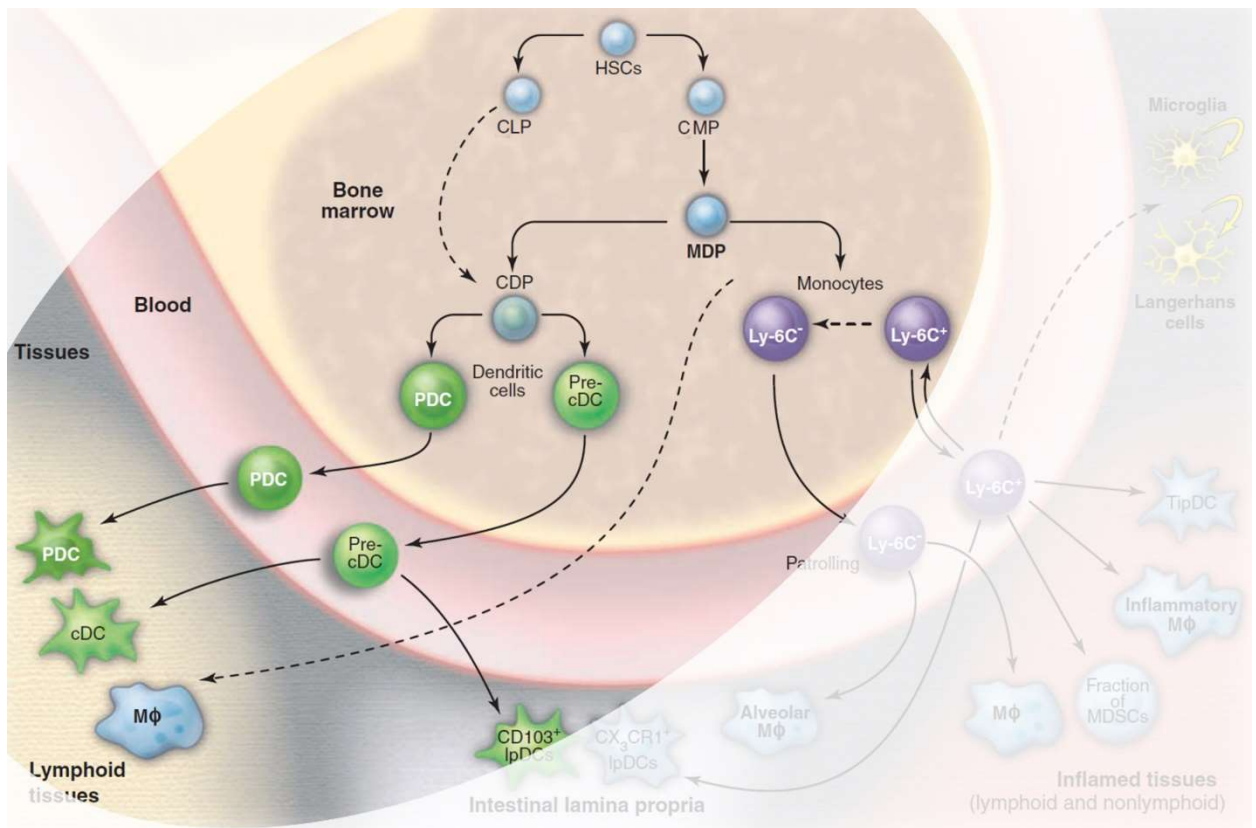


Abb.2: Der Ursprung und die Entwicklung von Dendritischen Zellen

Im Knochenmark entstehen aus den CD34⁺ multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC) der *common lymphoid progenitor* (CLP) sowie der *common myeloid progenitor* (CMP), (20, 21). Ein Teil der CMP-Population reift zu einem gemeinsamen Vorläufer für Monozyten Makrophagen und DCs, dem *macrophage-DC-progenitor* (MDP) der als direkter Vorläufer des *common DC progenitor* (CDP) angesehen wird. CDPs bilden den ersten „DC-exklusive-Vorläufer“ und reifen im Knochenmark zu plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDCs) und zu sogenannten *pre-DCs* (25, 32, 33).

Quelle: modifiziert nach (35)

In der Entwicklung von DCs nehmen die Zytokine Flt3L, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) einen zentralen Stellenwert ein. Diese Zytokine steuern und regulieren

sowohl die Entwicklung der DCs, als auch die Aufrechterhaltung des DC-Netzwerks (36). Bereits in der frühen Hämatopoese weist eine Teilpopulationen der Hämatopoetischen Stammzellen (HSC) die Expression von Flt3 auf und nahezu alle direkten DC-Vorläufer, sowie reife *steady state* DCs zeigen eine Flt3-Expression (24, 37). Fast alle anderen Leukozyten außer DCs und pre-DCs verlieren ihre Flt3-Expression im Rahmen ihrer weiteren Entwicklung. Für B-Zellen, als Beispiel, ist diese Repression von Flt3 essentiell für die weitere Reifung (38).

Flt3L kann *in vivo* die Expansion von pDC- und cDC-Zahlen auslösen. Zudem kann unter dem Einfluss von Flt3L *in vitro* eine repräsentative DC-Population generiert werden, was den Stellenwert von Flt3L in der Entwicklung von DCs unterstreicht(24, 39, 40). Damit im Einklang konnte an Flt3L-knock-out Mäusen (Flt3L^{-/-}Mäusen) gezeigt werden, dass ein Mangel an Flt3L zu einem Verlust nahezu aller DCs führt. Ein Knock-out des Rezeptors Flt3 zeigt ein ähnliches, jedoch geringer ausgeprägtes Bild (24).

Neben Flt3L ist GM-CSF ein in der Zellkultur oft genutzter Wachstumsfaktor zur Bildung von DCs *in vitro* (41, 42). Jüngst konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich bei den CD11c⁺MHCII⁺ Zellen aus GM-CSF Kulturen zum Großteil um CD115⁺ Makrophagen und nur zu geringem Anteil um CD135⁺ DCs handelt, was beim Einsatz von GM-CSF Kulturen berücksichtigt werden muss (43).

In Vivo hingegen haben Studien am Mausmodell gezeigt, dass der Verlust von GM-CSF oder seines Rezeptors zu einer nur milden Verringerung der DC-Zahlen führt, und zwar fast ausschließlich in nicht-lymphatischem Gewebe, was auf einen geringeren Einfluss in der initialen Entwicklung von DCs hindeutet. (44-46). Für GM-CSF konnte darüber hinaus eine zentrale Rolle in der Homöostase von DCs in nicht-lymphatischen Organen wie z.B. Lunge, Haut und der intestinalen Lamina propria gezeigt werden. Der Mangel von GM-CSF oder seines Rezeptors führt zu verminderten CD103⁺DCs *in vitro* sowie zu deutlich reduzierten CD103⁺DC Zahlen *in vivo* in der Haut und in der Lunge (44, 47). Da nur wenig GM-CSF unter *steady-state*-Bedingungen nachweisbar ist, der Serumspiegel

unter systemischer Inflammation jedoch deutlich ansteigt, wird eine tragende Rolle von GM-CSF in der Reifung inflammatorischer DCs aus Monozyten vermutet (44, 48). Der kombinierte Mangel von GM-CSF und Flt3L in doppelt defizienten Mäusen führt jedoch zu einer stärker ausgeprägten Abnahme an DCs im Vergleich zu Flt3L^{-/-}Mäusen. GM-CSF hat folglich zumindest einen geringen Einfluss auf die Entwicklung von DCs unter *steady-state*-Bedingungen(47).

Der Wachstumsfaktor M-CSF ist am besten bekannt durch seine zentrale Rolle in der Reifung von Monozyten und Makrophagen (35). Auch in der DC-Entwicklung ist M-CSF von Bedeutung was sich durch die Expression des Rezeptors M-CSFR auf DCs und die Hochregulierung des Promotors des M-CSFR Gens in ausgereiften DCs zeigt (49). Das Fehlen von M-CSFR führt nur zu gering verminderten DCs, jedoch zu einem Verlust fast aller Langerhanszellen (LZ) (50, 51). M-CSF-defiziente Mäuse zeigen hingegen normale LZ-Zahlen, da ein weiterer Ligand, Interleukin 34 (IL-34), mit hoher Affinität an M-CSFR bindet (52).

Darüber hinaus hat M-CSF einen wichtigen Einfluss auf weitere extralymphatische DC-Populationen in der Lunge, im Darm und der intestinalen Lamina propria (25, 32, 53). Sowohl die medikamentöse als auch genetische Blockade von M-CSFR führt zu einer erheblichen Einschränkung in der Akkumulation inflammatorischer DCs in Influenza-infizierten Lungen, was eine M-CSF-gesteuerte Reifung von inflammatorischen DCs aus Monozyten vermuten lässt (44). Neben der Reifung extralymphatischer DCs aus Monozyten im *steady-state* und der Rekrutierung inflammatorischer DCs aus Monozyten in der Infekt Situation (27, 44) ist die genaue Rolle von M-CSF/M-CSFR in der Ontogenese der DCs noch nicht abschließend geklärt.

3.1.3 DC-Subsets

Die Unterteilung Dendritischer Zellen in Subsets ist uneindeutig und kontrovers diskutiert. Basierend auf unterschiedlichen Merkmalen wurden in der Vergangenheit verschiedene Aufteilungen der heterogenen Zellpopulation

vorgeschlagen. DCs können zum Beispiel anhand ihres Migrationsverhaltens in *resident* DCs, die sich in lymphatischem Gewebe oder im Knochenmark entwickeln, *migratory* DCs, die aus peripherem Gewebe in Lymphknoten einwandern, und *circulating* DCs, die frei im Blut zirkulieren, unterteilt werden. Eine Klassifikation wird auch anhand ihrer Herkunft in cDCs, pDCs, moDCs und Langerhanszellen, anhand ihrer Funktion in *steady-state* DCs oder inflammatorische DCs oder basierend auf ihrer Lokalisation in DCs lymphoider oder nichtlymphoider Organe vorgenommen. Viele dieser Einteilungen sind jedoch überlappend und schwer abzugrenzen (51, 54). Unter Berücksichtigung von Lokalisation, Funktion und Oberflächenmarkern lassen sich die cDCs in lymphatischem und nicht-lymphatischem Gewebe weiter unterteilen. Die wichtigsten Oberflächenmarker zur weiteren Differenzierung von DCs in Subsets sind CD11c, sowie MHCII, für lymphatisches Gewebe die Glykoproteine CD4 und CD8 α und für nichtlymphatisches Gewebe die Integrine CD11b und CD103. DCs in lymphatischem Gewebe lassen sich in *tissue-migratory DCs*, die gereift aus nichtlymphatischem Gewebe in Lymphknoten einwandern und *lymphoid-tissue-resident DCs*, die exklusiv in lymphatischem Gewebe gereift sind, unterteilen (54). Die *lymphoid-tissue-resident DCs* lassen sich weiter in ein CD4⁺CD8 α ⁻CD11b^{high}-Subset, ein CD4⁻CD8 α ⁻CD11b^{high}-Subset und ein CD4⁻CD8 α ⁺CD11b^{high}-Subset unterteilen. Die ebenfalls in Lymphknoten zu findenden *tissue-migratory DCs* lassen sich a.e. als CD11c^{int}MHCII^{high} identifizieren. DCs in nicht-lymphatischem Gewebe lassen sich anhand CD103 und CD11b in weitere Subsets unterteilen, wobei CD103 zeitweise als funktionelles Pendant zu CD8 α eingestuft wird. (10, 27, 54-56). Dem inhomogenen CD11b⁺CD103⁻ Subset steht das CD103⁺CD11b⁻ Subset gegenüber, welches sowohl funktionell als auch in Hinblick auf gemeinsame Vorläufer mit dem CD8⁺Subset lymphatischer Organe verwandt und auf Kreuzpräsentation von Antigenen spezialisiert ist (25). Ein vereinfachter Ansatz postuliert die Unterteilung der DCs in nur drei Subsets. Klassische cDCs werden in 2 Subsets, in die *classical DCs Typ1*, DCs(cDC1s) für CD8 α ⁺ und CD103⁺ DCs, und *classical DCs Typ2*, (cDC2s) für CD11b⁺ und Sirp α ⁺ DCs eingruppiert. Das dritte Subset bilden die pDCs (22). Diese Nomenklatur

konnte durch CD26 als neuen DC-Marker und die Kombination von CD64 mit F4/80 zur bessere Abgrenzung gegenüber Makrophagen gefestigt werden (18). Mit Hilfe neuerer Technologie, vor allem dem scRNA-seq konnte die Unterteilung von DCs in Subsets weiter verfeinert werden. Die Ergebnisse des scRNA-seq von PBMC ermöglichte jüngst die Einteilung von LIN (CD3, CD19, CD56)⁻CD14⁻HLA-DR⁺ cDCs in 6 DC Subsets in Abgrenzung zu 4 Monozyten Subsets (16). Demnach entspricht das DC1 Subset CD141/BDCA-3⁺ cDC1, das DC2- und DC3 Subset entsprechen CD1C/BDCA-1⁺ cDC2s; das DC4 Subset entspricht CD1C-CD141-CD11C⁺ DC. Das DC5 Subset wurde neu beschrieben und das DC6 Subset entspricht den pDCs(16). Diese Subsets wurden im Rahmen zahlreicher weiterer Arbeiten verfeinert und genauer charakterisiert und mit den vorschrieben Subpopulationen an cDCs1 und cDC2s korreliert(17, 19).

Mit zunehmender Kenntnis der einzelnen DC-Subsets rückt der Fokus vermehrt auf speziellere Subsets einzelner Gewebe. So wurden Subsets und funktionelle Aspekte der DCs u.a. in der intestinalen Lamina propria, der Lunge oder auch mesenterialer Lymphknoten detaillierter untersucht (36, 55, 57, 58). Basierend auf der Definition von DCs anhand der Koexpression von CD11c und MHCII konnte auch in der Gefäßwand eine DC-Population identifiziert werden, für die eine Beteiligung an der die Entwicklung von Arteriosklerose beschrieben wurde (59, 60). Zum Zeitpunkt der Erhebung der Daten hatten sich jedoch nur wenige Arbeiten genauer mit der Verteilung und Entwicklung einzelner DC-Subsets in der Aorta und ihrem Einfluss in der Entstehung von Arteriosklerose beschäftigt (61, 62).

3.2 Arteriosklerose

3.2.1 Arteriosklerose und ihre klinische Bedeutung

Arteriosklerose ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung der innersten Schicht der Arterienwand, der sogenannten Intima (63, 64)und stellt mit knapp 18 Millionen Todesfällen im Jahr 2019 die weltweit häufigste Todesursache dar

(65, 66). 85% dieser Todesfälle sind auf akute Myokardinfarkte oder akute ischämische Schlaganfälle zurückzuführen, welche als unmittelbare Folge einer akut progredienten Arteriosklerose auftreten können (66). Arteriosklerotische Läsionen bilden sich vorrangig an Stellen mit gestörtem laminarem Blutfluss, z.B. Gefäßabzweigungen (67). Mit Fortschreiten der Erkrankung kommt es durch wachsende Gefäß-Plaques zur zunehmenden Einengung des Gefäßlumens, dadurch zur Beeinträchtigung des Blutflusses und zu konsekutiver Gewebischämie. Das zunehmende Wachstum der Plaques führt zu einem erhöhten Risiko für eine Plaque Ruptur oder Erosion mit intravaskulärer Thrombusbildung, die für die Mehrzahl der akuten kardiovaskulären Ereignisse, wie akute Koronarsyndrome und akute ischämische Schlaganfälle verantwortlich ist. Die Entstehung von Arteriosklerose, der Prozess der Atherogenese, wurde ursprünglich als passive Akkumulation von Lipiden in der Arterienwand verstanden. Inzwischen weiß man jedoch, dass die Pathophysiologie komplexer ist und zahlreiche hochspezifische zelluläre und molekulare Mechanismen umfasst(63).

3.2.2 Pathogenese der Arteriosklerose

Zahlreiche Risikofaktoren, die die Entstehung und das Voranschreiten von Arteriosklerose beeinflussen, konnten in den vergangenen Jahren identifiziert werden. Als zentraler Risikofaktor für die Entstehung und das Fortschreiten von Arteriosklerose gilt nach wie vor die Hyperlipidämie und die damit verbundene kumulative Exposition einer Arterie mit *low density lipoprotein* (LDL)-Cholesterin (68). Neben der Hyperlipidämie konnte ein relevanter Einfluss des Alters, Adipositas, Bewegungs- und Schlafmangel, falsche Ernährung, Rauchen, Diabetes, Arterielle Hypertonie, Stress, genetische Veränderungen und Infektionen auf die Atherogenese gezeigt werden(69, 70).

Nach aktuellem wissenschaftlichem Stand, geht man davon aus, dass endotheliale Aktivierung und Dysfunktion die initiale Ausbildung atherosklerotischer Läsionen bedingt (71). In läsionsanfälligen Bereichen der Gefäße mit gestörtem laminarem Blutfluss bilden sich fokale Areale mit endothelialer Dysfunktion, wo es zu gesteigerter endothelialer Permeabilität,

sowie zu aktivem transzellulären Transport von LDL in die Gefäßwand, vermittelt durch *scavenger receptor class B type 1* (SR-B1) kommt (72). In der Folge kommt es zu einer Akkumulation zirkulierender Lipoprotein LDL-Partikel in der subendothelialen Schicht (73). Bestehend aus verestertem Cholesterin und Triglyceriden, einer Hülle aus Phospholipiden, freiem Cholesterin und Apolipoprotein B100 (ApoB100) binden die LDL-Partikel ApoB100-vermittelt an Proteoglykane der extrazellulären Matrix. Die daraus folgende Retention von LDL-Partikeln in der Intima wird als maßgeblicher Schritt in der frühen Entstehung der Arteriosklerose angesehen (73-75). In der Intima durchlaufen die LDL-Partikel diverse oxidative Modifikationen u.a. durch Enzyme wie Myeloperoxidase oder Lipoxygenasen, wodurch es zu einer Aktivierung der Endothelzellen, vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen sowie zur Sekretion von Chemokinen durch die Endothelzellen kommt (74). Ein alternativer Pathomechanismus in der initialen Bildung arteriosklerotischer Plaques besteht in der Bildung von Aggregaten aus LDL-Partikeln und Proteoglykanen im subendothelialen Raum. Diese Aggregate können über Rezeptoren der *LDL-receptor-related protein* (LRP)-Superfamilie in glatte Muskelzellen eindringen, zu einer vermehrten Anreicherung von LDL-Cholesterin führen und somit zum Fortschreiten der arteriosklerotischen Läsionen beitragen (76). Im Verlauf kommt es zur vermehrten Ablagerung von Thrombozyten sowie zur zunehmenden Migration von Immunzellen in die Intima, wodurch frühe arteriosklerotische Läsionen entstehen, sogenannte *fatty-streaks*. Diese *fatty-streaks* bestehen aus Monozyten abgeleiteten Makrophagen-ähnlichen lipidbeladenen Schaumzellen und T-Zellen. Durch die zunehmende Infiltration durch T-Zellen und Mastzellen, die proinflammatorische Mediatoren produzieren, die Migration glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima sowie die sukzessive Ansammlung von Thrombozyten und Leukozyten an das dysfunktionale Endothel bildet sich langsam eine fortgeschrittene Plaque (77).

Die fortgeschrittenen fibroatheromatösen Plaques, sogenannte Atherome, sind von einer fibrösen Kappe aus Kollagen bedeckt und formen durch die zunehmende Ansammlung von apoptotischen Zellen, Trümmern und

Cholesterinkristallen einen nekrotischen Kern. Makrophagen und glatte Muskelzellen die einen programmierten Zelltod durchlaufen, bilden den Nidus des lipidreichen nekrotischen Kerns des fortschreitenden Atheroms. Zudem trägt eine fehlerhafte Efferozytose, die gestörte Clearance toter Zellen, zur Bildung des nekrotischen Kerns bei (78-80). Die zunehmende Produktion von Matrix-abbauenden Proteasen durch aktivierte Makrophagen führt zum vermehrten Abbau von interstitiellem Kollagen, welches der fibrösen Kappe Festigkeit verleiht. Die daraus resultierende Ausdünnung und erhöhte strukturelle Instabilität der fibrösen Kappe, das zunehmende Wachstum der Plaque, sowie die beginnende Kalzifizierung begünstigen die Erosion oder Ruptur der Plaque (79, 81). In der Folge der Ruptur oder Erosion einer instabilen Plaque wird der prothrombotische Inhalt der Plaque dem Blutfluss ausgesetzt, was zur Thrombusbildung und zu dem Verschluss arterieller Gefäße mit der klinischen Konsequenz in Form eines akuten Myokardinfarkts oder eines akute ischämischen Schlaganfalls führen kann (82).

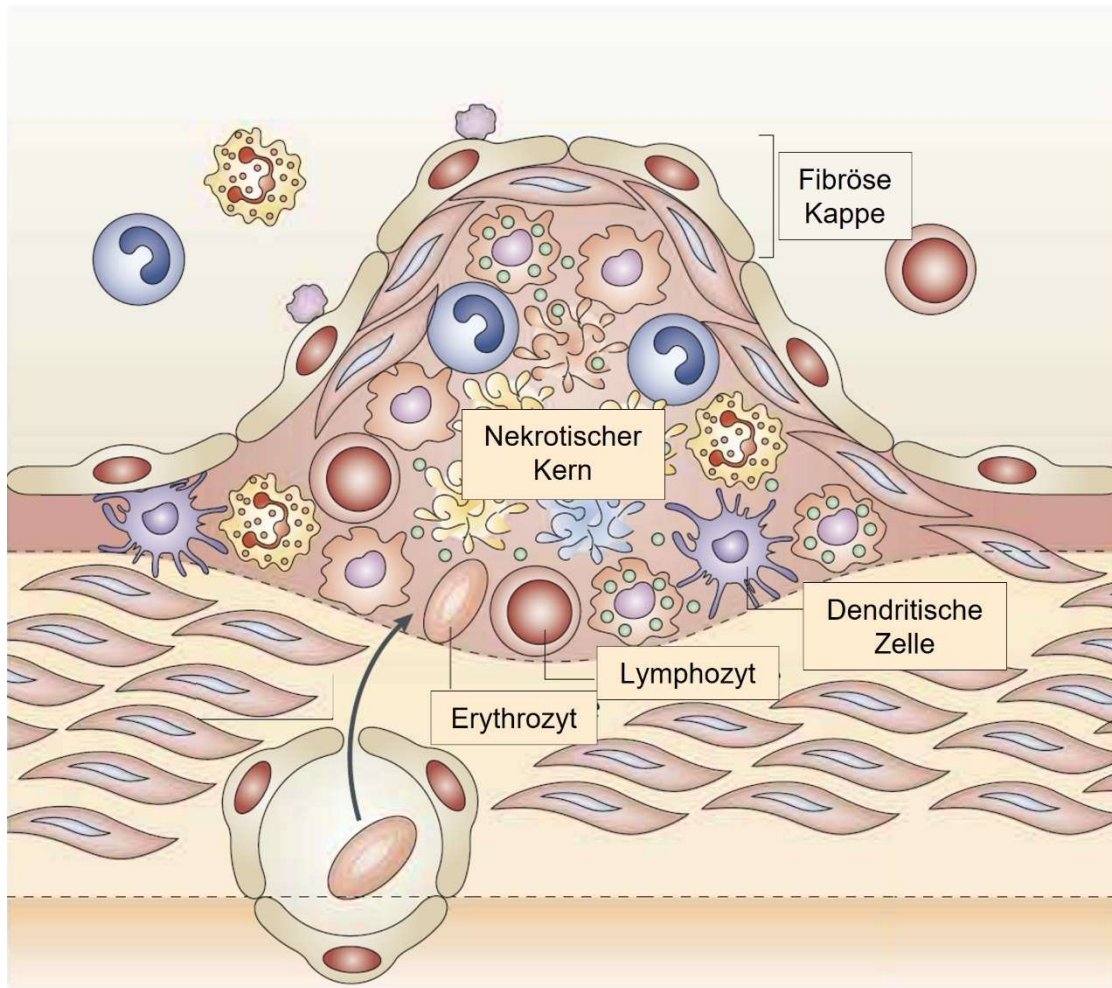


Abb.3: Entwicklung von Arteriosklerose.

Die fortgeschrittene fibroatheromatöse Plaque bildet durch die Apoptose von Makrophagen und anderen Plaquezellen einen nekrotischen Kern, der von einer fibrösen Kappe aus Kollagen bedeckt ist, die aus Matrix und einer Schicht aus glatten Muskelzellen besteht (78-80). Innerhalb der Plaque und von der Adventitia aus kann es zur Neovaskularisation kommen, und die Undichtigkeit der fragilen Gefäße kann zu einer Plaque-Blutung führen.

Quelle: modifiziert nach(83)

3.2.3 Mausmodelle für Arteriosklerose

Die experimentelle Arteriosklerose-Forschung am Tiermodell hat maßgeblich zum verbesserten Verständnis für die Pathogenese der Arteriosklerose beigetragen. Trotz einiger Limitationen, wie die Unterschiede in der Verteilung arteriosklerotischer Läsionen innerhalb des Gefäßsystems im Vergleich zum

Menschen, sind genetisch modifizierte Mäuse, auch auf Grund der einfachen Zucht und der schnellen Entwicklung einer manifesten Arteriosklerose, das häufigste Tiermodell in der Arteriosklerose-Forschung (84). Während die meisten Mäuse relativ resistent gegenüber Arteriosklerose sind, entwickeln C57BL/6J-Mäuse unter lipidreicher Diät zuverlässig arteriosklerotische Läsionen und bilden die Grundlage der 2 wichtigsten Mausmodelle zur Erforschung von Arteriosklerose (85). ApoE^{-/-}-Mäuse, das vermutlich gängigste Modell, basiert auf einem Mangel des Apolipoprotein E, das als Bestandteil von Lipoprotein Partikeln maßgeblich in den postprandialen Cholesterin-Metabolismus involviert ist (86). ApoE^{-/-} Mäuse entwickeln schon unter normaler Diät erhöhte Plasma-Cholesterin Level und komplexe arteriosklerotische Läsionen mit initialer Schaumzell-Formation, intermediären Plaques mit fibröser Kappe, sowie fortgeschrittenen Läsionen mit nekrotischem Kern und beginnender Instabilität. Durch die Fütterung von Cholesterin-reicher *high-fat* Diät (*western type diet* (WTD)) (idR 0.2% Cholesterin, 21% Milchfett) kann dies entscheidend beschleunigt werden (87). Ldlr^{-/-} Mäusen hingegen fehlt der *low-density lipoprotein receptor* (Ldlr), der die Lipoprotein Clearance und Aufnahme aus dem Plasma reguliert. Anders als ApoE^{-/-} Mäuse entwickeln Ldlr^{-/-} Mäuse unter normaler Diät nur eine geringe Hypercholesterinämie. Arteriosklerotische Läsionen bilden sich in Ldlr^{-/-} Mäusen nur unter Fütterung von WTD oder in geringem Maße in sehr alten Tieren. Die arteriosklerotischen Läsionen von Ldlr^{-/-} Mäusen weisen darüber hinaus einen höheren Anteil an Schaumzellen auf im Vergleich zu ApoE^{-/-} Mäusen (84). Trotz der weitverbreiteten Anwendung von ApoE^{-/-}-Mäusen, auch auf Grund der spontanen und schnellen Entwicklung komplexer Plaques, weist das Model einige Limitationen auf. Wesentliche Einschränkungen betreffen grundlegende Unterschiede im Lipoprotein-Metabolismus im Vergleich zum Menschen sowie die verhältnismäßig niedrige Rate an Plaque Rupturen (88). Zudem hat ApoE vielseitige Funktionen mit Einfluss auf Makrophagen, Inflammation und Fettgewebstoffwechsel, die unabhängig vom Plasmalipidspiegel Einfluss auf die Entstehung von Arteriosklerose haben (84). Im Gegensatz dazu hat der LDL-Rezeptor keine entscheidenden Funktionen über den Lipid-Stoffwechsel hinaus,

sodass die Plaque-Entwicklung im Ldlr^{-/-} Model nur auf die erhöhten Plasma-Lipid-Spiegel zurückzuführen sind. Auch der Lipoprotein-Metabolismus im Ldlr^{-/-} Modell entspricht eher dem humanen Metabolismus, was einen besseren Bezug zu klinischen Studien ermöglicht. Zudem findet sich Ldlr, anders als ApoE, nicht auf Zellen aus dem Knochenmark, weshalb sich Ldlr^{-/-}Mäuse im Gegensatz zu ApoE^{-/-}Mäusen für Knochenmarkstransplantations-Experimente eignen (84). Der experimentelle Einsatz dieser Mausmodelle trägt entscheidend zum Verständnis des Einflusses von Immunzellen auf die Entwicklung von Arteriosklerose bei.

3.2.4 Das Immunsystem und Arteriosklerose

Mit zunehmender Kenntnis der Pathophysiologie der Arteriosklerose ist heutzutage allgemein anerkannt, dass es sich bei Arteriosklerose um eine chronisch entzündliche Erkrankung handelt, die in der Entstehung und dem Voranschreiten maßgeblich durch das Immunsystem gesteuert wird (63, 80). Das Verständnis der einzelnen Immunzellen, ihr Zusammenwirken mit verschiedenen, nicht dem Immunsystem angehörende Zellen, wie z.B. glatte Muskelzellen, Endothelzellen oder Thrombozyten und ihr Einfluss in den verschiedenen Stadien der Krankheitsentwicklung der Arteriosklerose ist wichtig für die Entwicklung und Planung neuer therapeutischer Optionen und daher laufend Gegenstand der aktuellen Forschung (82, 89).

Monozyten als Teil des angeborenen Immunsystems sind maßgeblich an der Krankheitsentwicklung der Arteriosklerose beteiligt. Während man ursprünglich angenommen hat, dass die Rekrutierung und Migration von Monozyten aus dem Blut in die arterielle Gefäßwand einen wichtigen Schritt in der initialen Phase der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen darstellt (67) haben neuere Studien gezeigt, dass bereits perinatal die ersten Makrophagen in der Intima in Bereichen, in denen sich später typischerweise Plaques bilden, ansammeln (90). In gesunden Arterien sind Monozyten zahlenmäßig gering, durch Hypercholesterinämie wird die Proliferation von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen jedoch angeregt, welche durch extramedulläre Hämatopoese in

der Milz zu Monozyten reifen. Somit kommt es zur systemischen Monozytose, mit einem selektiven Anstieg *lymphocyte antigen 6 complex* (Ly6C) exprimierender klassischer Monozyten (91, 92). Die gemeinsame Aktivierung der Chemokin-Signalwege von *CC-chemokine ligand 2* (CCL2), *C-C chemokine receptor type 5* (CCR5) und *chemokine (C-X3-C) receptor 1* (CX₃CR1) im Bereich endothelialer Dysfunktion führt dann zu einer vermehrten Rekrutierung und Migration von Monozyten in die fortschreitende arteriosklerotische Läsion, wo sie zu Makrophagen oder seltener zu DCs differenzieren können (93). Die kombinierte Blockade der drei oben genannten Chemokin-Signalwege hingegen führt zu einer drastischen Reduktion der Entwicklung von arteriosklerotischen Läsionen, was den Stellenwert der Monozyten-Migration im Rahmen der Atherogenese unterstreicht (94). Nicht-klassische Ly6C^{lo} Monozyten werden unter arteriosklerotischen Bedingungen ebenfalls vermehrt rekrutiert, jedoch verbleiben diese im Gegensatz zu Ly6C^{hi} Monozyten zum Großteil im Gefäßlumen und übernehmen eine „patrouillierende“ Funktion, die unter arteriosklerotischen Bedingungen hochreguliert wird und wichtig für die Aufrechterhaltung der Endothelstruktur ist. Ein Verlust der nicht-klassischen Ly6C^{lo} Monozyten im Mausmodell zeigte einen erheblichen Anstieg endothelialer Schäden in der Gefäßwand (95, 96).

Makrophagen bilden die größte Gruppe der Immunzellen in arteriosklerotischen Plaques (97) und tragen durch die Aufnahme von LDL und der daraus resultierenden Bildung von Lipid-haltigen Schaumzellen maßgeblich zur Initiierung und zum Fortschreiten arteriosklerotischer Läsionen bei. Über Scavenger-Rezeptoren wie CD36 und Scavenger-Rezeptor A1 (SR-A1), die auf ihrer Oberfläche der Makrophagen stark exprimiert werden, kommt es zur Aufnahme von LDL und oxLDL, die in ihre Lipoproteinkomponenten zerlegt werden. Die Cholesterinester werden in freies Cholesterin und Fettsäuren hydrolysiert. Das freie Cholesterin wird dann durch Acyl-CoA-Cholesterinester-Transferase (ACAT) erneut verestert, lagert sich intrazellulär zu Fetttropfen zusammen und trägt somit zur charakteristischen „Schaumzell“-Morphologie bei (98). Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass die Makrophagen in Plaques

Arealen sich hauptsächlich aus rekrutierten zirkulierenden LyC6^{hi} Monozyten entwickeln. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass lokale, scavenger receptor A (SR-A) vermittelte *onsite*-Proliferation von früh eingewanderten Makrophagen, sowie die Transdifferenzierung aus glatten Muskelzellen einen wesentlichen Beitrag zur Akkumulation von Makrophagen in arteriosklerotische Plaques leisten (90, 99, 100).

In der murinen Aorta finden sich in der Adventitia residente Makrophagen, die sich bereits im Embryo aus CX₃CR1⁺ Vorläuferzellen entwickeln, unmittelbar nach Geburt durch Monozyten ergänzt werden und sich im Gewebe durch lokale Proliferation aufrecht erhalten (101). Zudem konnten residente Makrophagen in der Intima, sogenannte *aorta-intima-resident macrophages* (Mac^{AIR}) identifiziert werden, die sich kurz nach der Geburt aus eingewanderten Monozyten entwickeln (90). Aktuell geht man davon aus, dass sich unter *steady-state* Bedingungen die in der Intima residenten Mac^{AIR} durch lokale Proliferation weitestgehend selbst erhalten (90). Diese wurden in früheren Studien fälschlicherweise als in der Intima residente vaskuläre DCs definiert, basierend auf dem damaligen Verständnis, dass die Koexpression von CD11c und MHCII charakteristisch für DCs ist (9, 14, 60). Beim Vorliegen einer Hypercholesterinämie entwickeln sich aus den Mac^{AIR} die ersten Schaumzellen in der initialen arteriosklerotischen Läsion (90). Unter den inflammatorischen Bedingungen der frühen Atherosklerose setzt zudem die vermehrte Reifung von Makrophagen aus neu eingewanderten Monozyten ein, die den Phänotyp von MAC^{AIR} adaptieren und ebenfalls nach Aufnahme von Lipiden zu Schaumzellen differenzieren (90). In fortgeschrittenen Plaques vermehren sich Makrophagen dann hauptsächlich durch lokale Proliferation (100). Der Rückgang arteriosklerotischer Plaques durch die Senkung von LDL Cholesterin im Serum konnte zudem maßgeblich auf den Rückgang der Proliferation residenter Makrophagen zurückgeführt werden, was die Bedeutung der lokalen Proliferation residenter Makrophagen in der Aufrechterhaltung arteriosklerotischer Plaques unterstreicht (102). Mit Hilfe neuer Techniken wie scRNA-sq, *lineage tracing* Modellen und Massenzytometrie (CyTOF) konnte das Verständnis von

Makrophagen in der Arteriosklerose in den vergangenen Jahren entscheidend verbessert werden. Hierbei konnten 4 distinkte Makrophagen Subsets bestätigt werden, residente Makrophagen, inflammatorische Makrophagen, Interferon-induzierbare Zellen und Trem2^{hi} *Foamy*-Makrophagen (97, 103). Die Trem2^{hi} *Foamy*-Makrophagen zeigten interessanterweise eine starke Expression von CD11c, was in der Vergangenheit oft als typisches Merkmal von DCs beschrieben wurde (9, 13). Dies unterstreicht die Schwierigkeit der eindeutigen Charakterisierung von Zellen anhand phänotypischer Kriterien.

Neben Makrophagen können sich auch glatte Muskelzellen der Gefäße, sogenannte *vascular smooth muscle cells* (VSMCs), zu Schaumzellen arteriosklerotischer Plaques entwickeln. Unter der Aufnahme von Cholesterol können VSMCs eine ausgeprägte phänotypische Plastizität aufweisen, Makrophagen-typische Merkmale annehmen und die Progression von Plaque-Aralen fördern. Mittels *single cell RNA sequencing* (scRNAseq) konnten für etwa die Hälfte der Schaumzellen arteriosklerotischer Plaque VSMCs als Ursprung identifiziert werden (97, 104).

3.2.5 Dendritische Zellen in der Arteriosklerose

Als wichtige Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenen Immunsystem finden sich auch DCs in der arteriosklerotischen Aorta und sind an der Immunreaktion im Rahmen der Atherogenese beteiligt (62, 74). Das Verständnis von DCs im Rahmen der Arteriosklerose basierte zum Zeitpunkt der Erhebung der Daten dieser Arbeit auf der Definition intimaler CD11c⁺ Zellen als residente aortale DCs (9, 60) Ursprünglich ist man davon ausgegangen, dass sich in der Intima der gesunden Gefäßwand sowohl im Mausmodell als auch beim jungen Menschen bereits DCs identifizieren lassen, vorrangig in Abschnitten, die anfällig für die Ausbildung von Arteriosklerose sind (105, 106). Für diese als residente DCs bezeichnete Zellen konnte durch die Aufnahmen von Lipiden die Entwicklung zu Schaumzellen gezeigt werden, sowie die Übernahme antigenpräsentierender Funktionen, die zur Entstehung und zum Fortschreiten der Arteriosklerose beitragen (107). Neuere Studien konnten jedoch zeigen, dass es sich bei diesen intimalen Zellen um residente MAC^{AIR} und nicht wie zuvor

angenommen um residente DCs handelt (90). Mit zunehmender Arteriosklerose konnte sowohl im Mausmodell als auch in humanen Plaque Arealen eine deutliche Zunahme der vermeintlichen DC-Zahlen beobachtet werden (105, 108). Vereinbar damit zeigten sich bei Patienten mit akuter Angina pectoris Symptomatik oder mit einem akuten Myokardinfarkt eine verringerte Anzahl zirkulierender DC-Vorläuferzellen im peripheren Blut, was auf eine zunehmende Rekrutierung von DCs in fortschreitende Plaques hindeutet und den Einfluss der DCs an der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen unterstreicht (109). Basierend auf der ursprünglichen Definition residenter DCs konnte für diese die Kontrolle und Regulation der Cholesterin-Homöostase als wichtige Funktion in der Arteriosklerose ermittelt werden. Bereits in der initialen Phase der Hypercholesterinämie von *Ldlr*^{-/-} Mäusen konnten frühe Lipidablagerungen in der Gefäßwand vorrangig innerhalb vaskulärer CD11c⁺ Zellen lokalisiert werden, welche nach neusten Erkenntnissen MAC^{AIR} entsprechen (90). Die daraus entstehenden Schaumzellen bilden eine anfängliche Plaque-Läsion (107). Darüber hinaus konnte bei weiter fortgeschrittener Arteriosklerose durch den selektiven Wegfall von vaskulären vermeintlichen DCs in *CD11c^{DTR}ApoE^{-/-}* Mäusen ein Anstieg des Plasma-Cholesterinspiegels beobachtet werden. Umgekehrt wurde in Mäusen, die das antiapoptotische hBcl-2 unter der Kontrolle des CD11c-Promotors überexprimieren durch eine Verlängerung der DC-Lebensdauer eine größere vaskulärer DC-Population beobachtet, welche mit einem erniedrigtem Plasma-Cholesterinspiegels assoziiert war (110). Die Regulation der Aufnahme von Cholesterin aus dem Blutkreislauf durch DCs wurde als mögliche Erklärung für das enge Verhältnis zwischen vaskulären DCs und Plasma-Cholesterin diskutiert (110). Neben dem Einfluss vaskulärer DCs auf die Cholesterin- und Lipoprotein Homöostase wurde umgekehrt der Einfluss von Lipoproteinen in der Gefäßwand und Plaque-Arealen auf Differenzierung und Funktion von DCs beschrieben. LDL und das modifizierte oxLDL können die Reifung von DCs anstoßen und die Expression von kostimulatorischen Molekülen fördern (62). Durch oxLDL wird zudem die Freisetzung von IL6 induziert, die Reifung von T-Zellen angeregt, sowie die Expression von

Scavenger Rezeptoren wie z.B. CD36 hochreguliert. Durch Letzteres kommt es zur vermehrten Aufnahme von Lipiden durch DCs und in der Folge zur Bildung von Schaumzellen (62, 111).

Ein weiterer wichtiger potentiell kausaler Einfluss vaskulärer DCs auf die Entstehung von Arteriosklerose ist die Interaktion von DCs mit T-Zellen. Vaskuläre DCs können die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie *tumor necrosis factor- α* (TNF α) und interferon- γ (IFN- γ) durch die lokale Proliferation von T-Zellen anregen (112). Zudem konnte gezeigt werden, dass CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen, bei denen es sich nach dem ursprünglichen Verständnis um vaskuläre DCs handelte, durch *in vivo* aus dem Blutkreislauf aufgenommene Antigene, *in vitro* eine Antigen-spezifische T-Zell Proliferation induzieren können (106, 113). Die Aktivierung der T-Zellen hat einen wichtigen Stellenwert in der Progression der Arteriosklerose. Für Ldlr^{-/-} Mäuse mit fehlender invarianter Kette des MHCII-Moleküls konnte eine deutliche Reduktion der Arteriosklerose gezeigt werden. Dies ist durch eine verringerte T-Zell-Aktivierung in Plaques bedingt und verdeutlicht den Stellenwert der T-Zell-Proliferation durch endogene Antigenpräsentation in der Atherogenese (114). Ein wichtiger Gegenspieler zu proinflammatorischen Th-1-Zellen sind die Tregs, die durch Suppression des Immunsystems die Ausbildung von Arteriosklerose effektiv hemmen (115). Während für Flt3-abhängige CD103⁺ cDCs eine Zunahme von Tregs und verringertes Auftreten von Arteriosklerose beobachtet wurde, zeigten CCL17-exprimierende vaskuläre cDCs einen negativen Einfluss auf Treg-Zahlen (60, 113). Damit vereinbar konnte bei Patienten mit KHK eine Zunahme von CCL17⁺ DCs, verminderte Treg-Zahlen und ein erhöhter CCL17-Serumspiegel nachgewiesen werden (116).

Neben den oben beschriebenen Aufgaben vaskulärer DCs und ihrer Rolle im Rahmen der Entstehung der Arteriosklerose, verlangt ihr heterogenes Erscheinungsbild sowie ihre phänotypische Nähe zu anderen Immunzellen, wie Monozyten und Makrophagen, nähere Klärung. Die unter dem Einfluss von LDL und oxLDL zunehmende Expression des pan-DC-Markers CD11c auf

Makrophagen, sowie die Reifung von CD11c⁺ DCs aus Ly6c^{low} Monozyten unter inflammatorischen Bedingungen unterstreicht die Schwierigkeit der eindeutigen Identifizierung von DCs mit zunehmendem Grad der Arteriosklerose (93, 117). Wenige Arbeiten hatten zum Zeitpunkt der Erhebung der Daten dieser Arbeit die systematische Klassifizierung der dynamischen heterogenen Gruppe vaskulärer DCs adressiert. Choi et al. haben basierend auf immunhistochemischen und durchflusszytometrischen Daten, CD11c⁺MHCII^{hi} aortale DCs von CD11c⁺MHCII⁺ Makrophagen abgegrenzt und daraus folgend, anhand funktioneller und phänotypischer Merkmale erste grundlegende Subsets aortaler DCs definiert (60). Diese vermeintlichen aortalen DCs, welche im Gegensatz zu Makrophagen hohe immunstimulatorische, jedoch schwache phagozytäre Eigenschaften aufwiesen, wurden anhand des E-cadherin-ligands CD103 in 2 distinkte Subsets unterteilt werden. Für CD103⁺ DCs konnte eine fehlende Expression von CD11b, F4/80 und CX₃CR1 sowie eine Flt3-Flt3L-abhängige Entwicklung gezeigt werden. CD103⁻ DCs hingegen wiesen die Expression von CD11b, CX₃CR1 und F4/80 auf und entwickelten sich in Abhängigkeit von M-CSF aus Monozyten. Damit vereinbar zeigten Flt3-knockout Ldlr^{-/-} Mäuse deutlich reduzierte CD103⁺ DC-Zahlen, gleichermaßen reduzierte Treg-Zahlen und vermehrt Arteriosklerose (60). Das CD103⁻CD11b⁺F4/80⁺ Subset bleibt durch den Flt3-Knockout unbeeinträchtigt. Die von Choi et al. beschriebene Population vaskulärer DC ist nach heutigem Verständnis wahrscheinlich eine Mischpopulation aus Makrophagen und DCs. Auch in aktuelleren Arbeiten basierend auf scRNA-seq-Daten konnten CD103⁺DCs in der aortalen Gefäßwand identifiziert werden. Diese wurden als klassische cDC1s definiert und in der Adventita lokalisiert (90).

4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erweiterung der Einteilung und Klassifikation aortaler DCs, sowie die genauere Charakterisierung der einzelnen DC-Subsets durch tierexperimentelle Untersuchungen an gesunden C57BL/6J Mäusen, ApoE^{-/-} Mäusen und Ldlr^{-/-} Mäusen

Hierzu soll zunächst eine verfeinerte Einteilung der DC Subsets an *in vitro* gezüchteten DCs durchgeführt werden. Mittels Durchflusszytometrie sollen in Flt3L-abhängigen Zell-Kulturen gezüchtete DCs analysiert werden. Die erweiterte Einteilung soll dann *in vivo* durch Untersuchungen an einem Mausmodell angewandt und während der Entwicklung der Arteriosklerose verfolgt werden.

Nachfolgend soll eine genauere phänotypische Charakterisierung der einzelnen Subsets erfolgen. Hierzu wird die Expression neuer Oberflächenmarker wie CD64, Sirp α und CX₃CR1 auf den einzelnen Subsets zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung der Arteriosklerose untersucht.

Zur genauen Lokalisation der DCs innerhalb der Gefäßwand, sollen korrelierend zu den Durchflusszytometrie-Messungen histologische und immunhistologische Färbungen von Gewebsschnitten des murinen Herzens und der Aortenwurzel durchgeführt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zielen auf eine genauere Charakterisierung der DCs während der Entwicklung der Arteriosklerose und können damit ggf. zukünftige funktionelle Untersuchungen vereinfachen.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
0.2 µm Filter	Sartorius (Göttingen, Germany)
1 / 10 / 20 ml Spritze	BD (Heidelberg, Germany)
1.5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
10 /20 /200 /1000 µl Filterspitzen	Starlab (Hamburg, Germany)
10 /200 /1000 µl Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
15 ml/ 50 ml Tubes	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
384-well Platten	Life Technologies (Darmstadt, Germany)
5/ 10/ 25 ml serologische Pipetten	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
6-/ 24-well Platte	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
70 µm Zellsieb	BD (Heidelberg, Germany)
96-well Platte	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
Deckgläser	VWR (Ismaning, Germany)
EDTA-beschichtete Tubes	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
FACS Tubes	BD (Heidelberg, Germany)
Flaschenfilteraufsatz	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
Hämozytometer	Labor optic (Friedrichsdorf, Germany)
<i>high-fat</i> Diät (21% milk fat, 0.15% cholesterols, 19.5% casein)	Altromin (Lage, Germany)
Injektionsnadel (26 gauge)	Dispomed (Gelnhausen, Germany)
PAP Pen für Immunfärbung	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany)
Poly-L-lysin Objektträger	Menzel GmbH (Braunschweig, Germany)
Serum gel Tubes	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
Star Frost Objektträger aus Glas	Waldemar Knittel Glasbearbeitung (Braunschweig, Germany)
Stericup Filter 0.2 µm	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
Superfrost Plus Objektträger	Thermo Scientific/Menzel(Braunschweig, Germany)
T175 Fläschchen	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)

T25 Fläschchen	Tissue culture dishes (100x20 mm)
White 96-well Platten	Thermo Scientific (St. Leon-Rot, Germany)

5.1.2 Geräte

Geräte	Hersteller
Balance CP225D	Sartorius (Göttingen, Germany)
Balance TE3102S	Sartorius (Göttingen, Germany)
Cryostat CM3050 S	Leica (Wetzlar, Germany)
Eppendorf 5430R Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg, Germany)
FACS Canto II	BD (Heidelberg, Germany)
Gefriergeräte und Kühlschränke	Liebherr (Bulle, Switzerland)
Heraeus Fresco 17 Zentrifuge	Thermo (St. Leon-Rot, Germany)
Heraeus HERAFreeze, -80°C Gefrierschrank	Thermo (St. Leon-Rot, Germany)
Heraeus Trockenluftofen	Thermo (St. Leon-Rot, Germany)
Leica upright Mikroskop DM4000 B	Leica (Wetzlar, Germany)
Mikrowelle	Privileg (Stuttgart, Germany)
Multipette Xstream	Eppendorf (Hamburg, Germany)
Pipetten (1/ 10/ 20/ 100/ 1000 µl)	VWR (Ismaning, Germany) / Eppendorf (Hamburg, Germany)
Pipetus, elektronische Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Germany)
RAININ Multichannel Pipette (8-/12- Kanal)	Mettler-Toledo (Giessen, Germany)
Sektionswerkzeuge	Fine Science Tools (Heidelberg, Germany)
Stereomicroscope SZX10	Olympus (Hamburg, Germany)
Sterile Bänke für die Zellkultur SK-1200	BDK Luft- und Reinraumtechnik (Sonnenbühl, Germany)
Thermomixer comfort/standard	Eppendorf (Hamburg, Germany)
Tissue-Wasserbad 1052	GFL (Burgwedel, Germany)
Vortex Mixer VV3	VWR (Ismaning, Germany)

Wasserbad	P-D Industriegesellschaft (Dresden, Germany)
Zellkultur-Inkubatoren	Binder (Tuttlingen, Germany)
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3XR	Thermo Scientific (St. Leon-Rot, Germany)

5.1.3 Chemikalien

5.1.3.1 Zellkultur und Durchflusszytometrie

Chemikalien	Hersteller
Absolute ethanol, non-denatured	AppliChem (Darmstadt, Germany)
Bovines serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)
Cytofix	BD (Heidelberg, Germany)
Cytofix/cytoperm	BD (Heidelberg, Germany)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)
Fetal calf serum (FCS)	PAA (Pasching, Austria)
Fixation/permeabilization kit	eBioscience (Frankfurt am Main, Germany)
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Life Technologies (Darmstadt, Germany)
Liberase Blendzyme TL	Roche (Mannheim, Germany)
Mäuseserum	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)
Perm/wash Puffer	BD (Heidelberg, Germany)
Phosphate buffered saline (PBS)	Life Technologies (Darmstadt, Germany)
Rattenserum	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)
RPMI-1640	Life Technologies (Darmstadt, Germany)
Stain Puffer	BD (Heidelberg, Germany)

5.1.3.2 Histologie und Immunhistochemie

Chemikalien	Hersteller
Bovine serum albumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Disodium phosphate (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)

Ethanol	AppliChem (Darmstadt, Germany)
Gelatin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)
Monopotassium phosphate (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Mausserum	VectorLaboratories (Burlingame, Canada)
Oil-Red-O Sigma	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)
Paraformaldehyde (PFA)	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Polysine slides	Thermo Scientific (St. Leon-Rot, Germany)

Potassium chloride (KCl)	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Kanninchenserum	VectorLaboratories (Burlingame, Canada)
Sodium chloride (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Sucrose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)
Tissue Tek OCT Compound	Sakura Finetek (Staufen, Germany)
Vectashield	VectorLaboratories (Burlingame, Canada)
Vitro-Clud	R. Langenbrinck (Emmendingen, Germany)

5.1.4 Antikörper

5.1.4.1 Durchflusszytometrie

Epitop	Fluorophore	Klon	Hersteller
B220	FITC	RA3-6B2	eBioscience (Frankfurt am Main, Germany)
B220	Pacific Blue	RA3-6B2	BD (Heidelberg, Germany)
B220	V500	RA3-6B2	BD (Heidelberg, Germany)
CD103	APC	2E7	eBioscience (Frankfurt am Main, Germany)
CD103	PE	2E7	eBioscience (Frankfurt am Main, Germany)
CD11b	FITC	M1/70	eBioscience (Frankfurt am Main, Germany)
CD11b	PerCP-Cy5.5	M1/70	eBioscience (Frankfurt am Main, Germany)
CD11b	V500	M1/70	BD (Heidelberg, Germany)

CD11c	AlexaFluor	N418	eBioscience (Frankfurt am Main,Germany)
CD11c	APC	N418	eBioscience (Frankfurt am Main,Germany)
CD11c	FITC	N418	eBioscience (Frankfurt am Main,Germany)
CD11c	PE-Cy7	N418	eBioscience (Frankfurt am Main,Germany)
CD172a	FITC	P84	BD (Heidelberg, Germany)
CD19	APC	eBio1D3	eBioscience (Frankfurt am Main,Germany)
CD19	FITC	1D3	BD (Heidelberg, Germany)
CD19	PerCP-Cy5.5	1D3	BD (Heidelberg, Germany)
CD3ε	APC	145-2C11	eBioscience (Frankfurt am Main,Germany)
CD3ε	APC-Cy7	145-2C11	BD (Heidelberg, Germany)
CD3ε	FITC	145-2C11	eBioscience (Frankfurt am Main,Germany)
CD3ε	PerCP-Cy5.5	145-2C11	BD (Heidelberg, Germany)
CD3ε	V450	500A2	BD (Heidelberg, Germany)
CD3ε	V500	500A2	BD (Heidelberg, Germany)
CD40	APC	1C10	eBioscience (Frankfurt am Main,Germany)
CD45	APC-Cy7	30-F11	BD (Heidelberg, Germany)
CD64	APC	X54-5/7.1	BioLegend (Fell,Germany)
CD86	PE	GL1	eBioscience (Frankfurt am Main,Germany)
CD86	PE	PO3.1	eBioscience (Frankfurt am Main,Germany)
F4/80	APC	BM8	eBioscience (Frankfurt am Main,Germany)
F4/80	PE	BM8	eBioscience (Frankfurt am Main,Germany)
Flt3	PE	A2F10	eBioscience (Frankfurt am Main,Germany)
MHCII	APC	M5/114.15.2	eBioscience (Frankfurt am Main,Germany)
MHCII	eFlour 450	M5/114.15.2	eBioscience (Frankfurt am Main,Germany)
MHCII	FITC	2G9	BD (Heidelberg, Germany)
PDCA	PE	eBio927	eBioscience (Frankfurt am Main,Germany)
TCRβ	PE	H57-597	eBioscience (Frankfurt am Main,Germany)
TCRβ	V450	H57-597	BD (Heidelberg, Germany)

5.1.4.2 Immunhistochemie

Epitop	Fluorophore	Klon	Hersteller
CD11c	-	N418	BioLegend (Fell,Germany)
CD68	-	FA-11	AbD Serotec (Düsseldorf,Germany)
F4/80	-	Cl:A3-1	AbD Serotec (Düsseldorf,Germany)
Streptavidin	Alexa-Fluor-555	polyklonal	Life Technologies (Darmstadt, Germany)
anti-rat IgG	Alexa-Fluor-488	polyklonal	Life Technologies (Darmstadt, Germany)
biotinylated anti-rat	Alexa-Fluor-488	polyklonal	Life Technologies (Darmstadt, Germany)

5.1.5 Lösungen, Puffer, Medien

Medium/Pufferlösung	Zusammensetzung
DC Medium	RPMI-1640 Medium mit 2 mM L-glutamine 10 % (v/v) FCS 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 50 µM β-mercaptoethanol
FACS staining Puffer	1x PBS 2 % BSA 2 % Mausserum 2% Kanninchenserum
Hank`s Complete	1x HBSS 0.6 % BSA 300 µM EDTA, pH 8.0
Kaiser`s glycerin jelly	4 g gelatin 21 ml destilliertes Wasser 25 ml glycerin
Mowiol Lösung	2.4 g Mowiol 4-88 6 g glycerol 6 ml DDW

Phosphate buffered saline solution (PBS)	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 18.61 mM Na ₂ HPO ₄ 1.8 mM KH ₂ PO ₄ destilliertes Wasser pH angepasst auf 7.4
--	--

5.2 Methoden

5.2.1 Mausmodell

5.2.1.1 Mäuse und Haltung

Die C57BL/6J Mäuse, sowie Apolipoprotein E-defizienten (ApoE^{-/-}) Mäuse und low-density-lipoprotein-receptor-defizienten (Ldlr^{-/-}) Mäuse wurden über das Jackson Laboratory (Maine, USA) bezogen. CD11c^{YFP}reporter Mäuse (118) wurden durch M. Nussenzweig (Rockefeller University, New York, New York, USA) bereitgestellt und Fms-related tyrosine kinase 3 ligand-knockout (*Flt3l*^{-/-}) Mäuse wurden über Taconic Bioscience GmbH (Rensselaer, New York, USA) bezogen. Alle Tiere wurden in tierschutzgerechter Haltung im Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM), Zinklesweg 10 in 97078 Würzburg (B6, Ldlr) oder in der Tierhaltungseinrichtungen of the Rudolf-Virchow-Zentrum (RVZ), Josef-Schneider-Straße 2 in 97080 Würzburg (OTII) gehalten und gezüchtet. Die Tiere wurden im Rahmen der Züchtung unter gesonderten apathogenen Verhältnissen gehalten.

5.2.1.2 Modell zu Entstehung von Arteriosklerose

Um ein Mausmodell mit hoher Arteriosklerose-Anfälligkeit zu erhalten, erfolgte die Zucht auf Basis der Inzuchtlinie C57BL/6, welche stärker zur Ausbildung arteriosklerotischer Plaques neigt als andere Inzuchtlinien (119). Diese Arteriosklerose-Anfälligkeit zeigt sich in ApoE^{-/-}-Mäusen und in Ldlr^{-/-} Mäusen mit genetischem Hintergrund von C57BL/6J Mäusen noch stärker ausgeprägt (87, 120). Um die Lokalisation der CD11c⁺ Zellen in arteriosklerotischen Plaques im

Mausmodell zu ermöglichen, erfolgte die Kreuzung von CD11c^{YFP}reporter Mäusen mit ApoE^{-/-} Mäusen, welche beide den genetischen Hintergrund von C57BL/6J Mäusen teilen. Die gezüchteten Tiere wurden im Alter von 6 Wochen abgesetzt. Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte die Genotypisierung der Zuchttiere.

Um die Entstehung von Arteriosklerose im Mausmodell zu provozieren erhielten Ldlr^{-/-} Mäuse im Alter von 10-12 Wochen eine sechswöchige oder zwölfwöchige *high-fat* Diät mit 15% Milchfett und 1.25 % Cholesterin bezogen von Altromin (Lage, Germany). Alters-gematchte Ldlr^{-/-} Mäuse sowie C57BL/6J Tiere wurden als Kontrollen über sechs bis 12 Wochen auf Standard-Diät gesetzt.

ApoE^{-/-}CD11c-YFP Mäuse erhielten ebenfalls im Alter von ca 10-12 Wochen eine sechswöchige Obesitas induzierende *high-fat* Diät (15% Milchfett und 1.25 % Cholesterin).

Alle Tierversuche wurden unter strenger Einhaltung der deutschen Tierrechtsbestimmungen durchgeführt. Eine schriftliche Zustimmung der zuständigen lokalen behördliche Instanz, der Regierung Unterfranken lag vor (Aktenzeichen der Tierversuchsgenehmigung: 44/10).

5.2.2 DC-Kulturen aus Knochenmarksstammzellen

Zur Gewinnung von Knochenmarksstammzellen erfolgte die Präparation von Femur und Tibia beidseits unter aseptischen Bedingungen am toten Tier. Die Knochen wurden von überschüssigem Gewebe befreit in 70% Ethanol, dann in PBS-Puffer gewaschen. Nach dem aufschneiden der proximalen und distalen Knochenenden wurde das Knochenmark mit PBS-Puffer ausgespült und durch ein Zellsieb mit 70µm Porengröße passiert und erneut in PBS gewaschen. Die FLT3L-Kulturen wurden in Anlehnung an das von Brasel et al. beschriebene Protokoll angelegt und für insgesamt 9-10 Tagen inkubiert (121). Die aus dem Knochenmark gewonnenen Zellen wurden in einer Konzentration von 2×10^6 /ml in DC-Medium mit 80ng/ml Flt3L angesiedelt. Das Zellmedium ergänzt um jeweils 80ng/ml Flt3L wurde alle 2 Tage gewechselt und die Zellzahl jeweils auf

2×10^6 /ml angepasst. Die Analyse der Zellen wurde am 9.-10. Tag nach Anlegen der Kultur mittels Multicolor-Durchflusszytometrie vorgenommen.

5.2.3 Präparation von Herzen und Aorten

Zur Präparation der Aorten wurde der Thorax des toten Tieres eröffnet und das Herz mit einer feinen Kanüle punktiert, um das Blut zu entnehmen. Es erfolgte die transkardiale Spülung der Aorta mit PBS-Puffer. Für Gewebeproben, die zur histologischen Aufarbeitung genutzt wurden, erfolgte in einem weiteren Schritt die Fixierung des Gewebes durch transkardiale Reperfusion von Herz und Aorta mit 4% Paraformaldehyde (PFA) in PBS-Puffer.

Die Aorten wurden von der Aorten-Wurzel bis zum Abgang der Iliakal-Gefäße präpariert und skelettiert. Herzen und Aorten zur histologischen Aufarbeitung wurden getrennt entnommen. Zur durchflusszytometrischen Aufarbeitung der Aorten erfolgte die herznahe Abtrennung im Bereich der Aortenwurzel sowie die Absetzung im Bereich der Iliakalbifurkation.

5.2.4 Durchflusszytometrie

5.2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren zur Bestimmung der Größe, Granularität sowie zur Quantifizierung von Oberflächenmarker und intrazellulärer Proteine verschiedener Zellen. Sie ermöglicht die qualitative sowie quantitative Analyse und molekulare Charakterisierung heterogener Zellsuspensionen, wie z.B. des menschlichen Bluts. Die in der Immunologie oft angewandte Durchflusszytometrie ermöglicht die Identifizierung und Immunphänotypisierung einzelner Zelllinien.

Bei der Durchflusszytometrie wird eine Zellsuspension mit Hilfe einer Trägerflüssigkeit, der Hüllflüssigkeit, durch eine Messküvette an einem Messpunkt vorbei getragen, an dem die Zellen einzeln rechtwinklig eine monochromatische Lichtquelle (erzeugt durch einen Laser) passieren. Die

Lichtstreuung und Fluoreszenz, die bei der Passage des Laserstrahls entsteht, werden in der Achse des Laserstrahls als Vorwärtsstreulicht oder *forward scatter* (FSC) sowie rechtwinklig zum Laserstrahl als Seitwärtsstreulicht oder *side scatter* (SSC) mit so genannten Photomultiplier-Detektoren erfasst. Hierbei liefert der FSC Informationen zur Größe der Zelle, der SSC gibt Aufschluss über die Granularität.

Beim *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) kann durch den Einsatz mehrerer unterschiedlicher Laser mit verschiedenen Wellenlängen und die Detektion unterschiedlicher Emissionsspektren verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb eines Messvorgangs die gleichzeitige Erfassung unterschiedlicher Merkmale einer Zelle ermöglicht werden.

5.2.4.2 Enzymatischer Gewebsverdau und Herstellung der Zellsuspension

Um eine durchflusszytometrische Messung des Gewebes der entnommenen Aorten durchführen zu können wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt. Hierzu wurde ein enzymatischer Gewebsverdau mittels Liberase TL, einem Proteasen-Mix zur Dezellularisierung von Gewebe, durchgeführt. Für die Liberase-Lösung wurden 5mg Liberase in 400µl demineralisiertem Wasser aufgelöst.

Die entnommen mit PBS gespülten Mäuse-Aorten wurden in ca. 2mm lange Stücke geschnitten und in 142,5µl RPMI1640 unter Zugabe von 7,5µl Liberase TL Lösung gegeben. Das Gewebe wurde dann bei 37°C in einem Thermo-Shaker bei 1400rpm für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das verdaute Gewebe durch ein Zellsieb mit 70µm Porengröße passiert und mit 250µl *Hanks Balanced Saline Solution* (HBSS) gewaschen und resuspendiert.

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl jeder Probe wurde manuell mit einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern der Fluoreszenz-Färbung an die Fc-Rezeptoren der Einzelzellsuspension zu verhindern, wurden zunächst die freien Fc-Rezeptoren mit einer Blockungs-Suspension bestehend aus

CD16/CD32 Antikörpern in PBS mit 2% Mausserum, 2% Rattenserum und 0,2% Bovines Serumalbumin (BSA) blockiert.

5.2.4.3 Färbung der Zellsuspensionen und Durchflusszytometrische Messung

Die Fluoreszenz-Färbung für die Durchflusszytometrie erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD11c, CD11b, NK1.1, CD103, Sirp α , MHCII, TCR- β , F4/80, PDCA, CD19, CD45, CD64. Die Proben aus geblockten Einzelzellsuspensionen wurden mit Fluoreszenz Antikörpern verdünnt 1:300 in 25 μ l Hank`s Complete für 30Minuten lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Suspensionen zweimal in je 200 μ l HBBS gewaschen und unmittelbar durchflusszytometrisch gemessen.

Nach der Färbung wurde jede Probe zweimal in je 200 μ l HBSS gewaschen, dann resuspendiert und unmittelbar mit einem FACS Canto II (BD Biosciences) gemessen. Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mittels FlowJo Software (Tree Star)

5.2.5 Histologie

5.2.5.1 Fixierung des Gewebes und Herstellung der Gewebsschnitte

Gewebsschnitte von Herzen inklusive Aortenwurzel und Aorten zur histologischen Aufarbeitung wurden von Ldlr^{-/-} Mäusen, ApoE^{-/-}CD11c^{YFP}reporter Mäusen sowie CX₃CR1^{GFP}reporter Mäusen hergestellt. Zur Vorbereitung für die Herstellung von Gewebsschnitten mittels Kryotom wurden Herzen sowie die Aorta, wie zuvor beschrieben, in 4 % PFA in PBS fixiert. Die Aorta wurde unterteilt in Aortenbogen, Truncus brachiocephalicus und thorakale sowie abdominale Aorta aufgearbeitet. Zur Kryokonservierung wurde das Gewebe aus der Fixierungs-Lösung entnommen und für 24h gegen in einer Lösung aus 30 % Saccharose in PBS inkubiert. Das Gewebe wurde in einer Verbindung aus OCT/PBS im Mischverhältnis 1:1 eingebettet und bis zur Anfertigung der Gewebsschnitte bei -80°C tiefgefroren. Mittels Kryotom (Thermo Scientific Microm™ HM 525 Kryostat) wurden Serienschritte der Aortenwurzel, der Herzen

und des Aortenbogens in einer Dicke von 5 µm angefertigt und auf Objektträger gezogen.

5.2.5.2 Oil-Red-O lipid-Färbung von Aortenwurzel-Schnitten

Oil-Red-O ist ein fettlöslicher Azofarbstoff, der zur histologischen Darstellung von Lipiden und Triglyceriden auf frischen Gewebsschnitten angewendet werden kann. In der Darstellung arteriosklerotischer Plaques hat sich die Oil-Red-O Färbung etabliert, da sich mit ihr zuverlässig Schaumzellen und lipidreiche Areale der Plaque-Läsionen anfärben lassen (122, 123).

Zur Vorbereitung auf die Oil-Red-O lipid-Färbung wurden die Gewebsschnitte für fünf Minuten in PBS gewaschen, bevor die Schnitte zehnmal kurz in 60% Isopropanol getaucht wurden. Es folgte eine 15-minütige Inkubationszeit mit der *Oil-Red-O working solution*, bevor die Schnitte erneut zehnmal kurz in 60 % Isopropanol getaucht wurden. Die Fixierung der Gewebsschnitte erfolgte mit Mowiol, bevor mit einem *Leica DMLB* Mikroskop digitale Bilder der Schnitte aufgenommen wurden.

5.2.6 Immunfluoreszenz

5.2.6.1 Prinzip der Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz-Färbung ist ein Verfahren zur gezielten Identifizierung und Darstellung gewebes- oder zellspezifischer Antigene durch die spezifische Bindung von Antikörpern an diese Antigene. In einem ersten Schritt wird das Antigen durch die spezifische Bindung des Primärantikörpers markiert. Zur Darstellung des Antigens wird ein zweiter, so genannter Sekundärantikörper benötigt, der an einen Fluoreszenzfarbstoff, ein Fluorochrom, gekoppelt ist. In einem zweiten Schritt bindet der Sekundärantikörper an der Fc-Domäne des Primär-Antikörpers und ermöglicht somit die fluoreszenzmikroskopische Detektion des Antigens (124).

5.2.6.2 Immunfluoreszenzfärbung

Als Vorbereitung auf die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Kryo-Schnitte auf einem Wippschüttler für 10min in PBS-Puffer gewaschen, um Reste der Fixierungslösung zu entfernen. Nach dem Trocknen bei Raumluft wurden die Gewebsschnitte mit einem hydrophoben Fettstift umkreist. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen der Antikörper erfolgte eine 30minütige Inkubation mit ca 30-50 µl des Blockungs-Puffers (1% BSA in PBS-Puffer). Nach Entfernen des Blockungspuffers durch seitliches Abklopfen auf Zellstoffpapier wurden die Gewebsschnitte für 12 Stunden mit 20 µg/ml Biotin gelabeltem primärem Antikörper gegen CD11c, F4/80 oder CD68 in jeweils 30-50 µl Färbepuffer (1% BSA in PBS-Puffer) bei 4°C inkubiert. Zum Entfernen überschüssiger Primärantikörper folgten zwei Waschschrte in PBS-Puffer auf einem Wippschüttler für 15min und 5 min. Durch seitliches Abklopfen auf Zellstoffpapier wurde der PBS-Puffer entfernt, bevor die Gewebsschnitte für 1-2 Stunden mit Alexa-Fluor-555-Streptavidin-Sekundärantikörper, Alexa-Fluor-488 anti-Ratte IgG Sekundärantikörper oder biotinyliertem anti-Ratte Antikörper + Alexa-Fluor-488-Streptavidin Sekundärantikörper inkubiert wurden. Es folgten erneute zwei Waschschrte wie zuvor beschrieben. Überschüssiger PBS-Puffer wurde abgeklopft und die Gewebsschnitte bei Raumtemperatur getrocknet. Die Gewebsschnitte wurden mit 10-15 µl *Vectashield* fixiert und die Zellkerne mit dem enthaltenen 49,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) gegengefärbt. Abschließend wurden die Schnitte mit Deckgläsern gedeckt und mit klarem Nagellack versiegelt bevor fluoreszenzmikroskopische Bilder mit einem Leica DMLB Mikroskop aufgenommen wurden.

5.2.7 Statistik

Die Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten erfolgte mit der Software Treestar FlowJo 10.0.4 (Ashland, USA). Die Analyse der Immunfluoreszenz-Bilder wurde mit der Software Diskus (Königswinter, Germany) durchgeführt. Das Signifikanzniveau für statistische Signifikanz wurde vorab für einen p-Wert < 0,05

festgelegt und in entsprechenden Abbildungen, falls zutreffend mit einem Stern (*) markiert. Die Normalverteilung der Daten wurde anhand des Kolmogorov Smirnov Tests geprüft. Als parametrische Testung wurden T-Tests angewandt, als nicht-parametrischer Test der Wilcoxon-Rangsummentest. Eine multivariate Analyse erfolgte mit einseitiger ANOVA mit Dunetts Post-hoc-Tests. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5.02 (La Jolla, USA). Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

6 Ergebnisse

6.1 Lokalisation CD11c positiver Zellen in der Aorta

Im Bereich der Aortenwurzel zeigten sich bei gesunden $CD11c^{YFP}$ reporter Mäusen, wie bereits durch Galkina et. al und Choi et. al vorbeschrieben (60, 125) luminal in der Intima $CD11c^+$ Zellen, $CD11c^+$ Zellen in der Adventitia sowie im Bereich der Aortenklappe und des Sinus aortae, welche typische Lokalisationen für die Bildung arteriosklerotischer Plaques darstellen (105) (vgl. Abb.4).

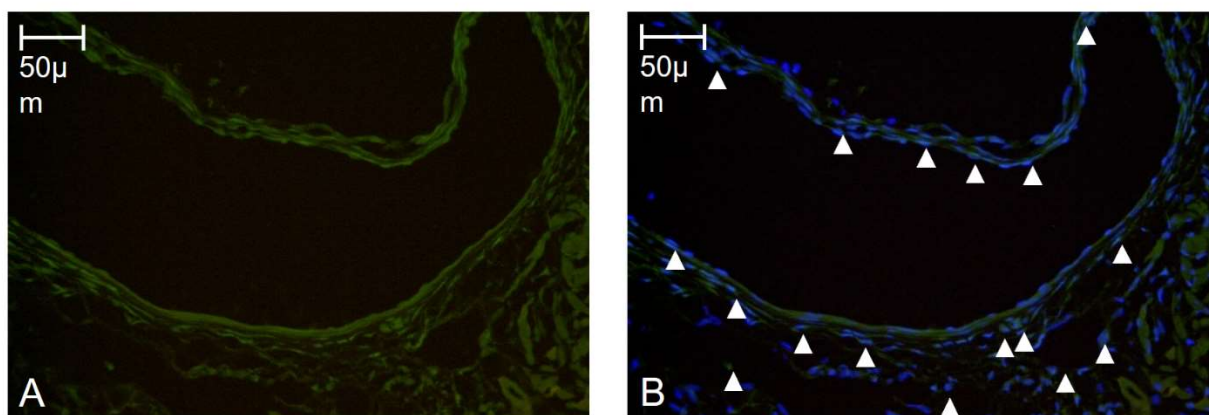


Abb.4: Immunfluoreszenzaufnahmen der Aortenwurzel bei gesunden $ApoE^{-/-}CD11c^{YFP}$ reporter Mäusen

Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt. Das Bild B zeigt die Übereinanderlagerung der YFP-Aufnahme mit der DAPI-Aufnahme. Die weißen Pfeile markieren $CD11c^+$ grüne Zellen. Experimentator: Thilo Westhofen und Martin Busch

Auch bei $ApoE^{-/-}CD11c^{YFP}$ reporter Mäusen mit ausgeprägter Arteriosklerose nach 6-wöcher *high-fat*-Diät zeigten sich im Bereich der Aortenwurzel vermehrt $CD11c^+$ Zellen luminal in der Gefäß-Intima. Zudem waren vermehrt $CD11c^+$ Zellen im Bereich luminaler arteriosklerotischer Plaque-Areale, im Bereich von Aortenklappe und auch luminal und in der Adventitia des Sinus aortae erkennbar. In den restlichen Abschnitten der Aorta, dem Aortenbogen, dem Abgang des Truncus brachiocephalicus, im Bereich der thorakalen und der abdominalen Aorta

fanden sich CD11c⁺ Zellen luminal in der Intima und vorrangig im Bereich arteriosklerotischer Plaque-Areale. Die Adventitia wies bei arteriosklerotischen ApoE^{-/-}CD11c^{YFP}reporter Mäusen in diesen Abschnitten nahezu keine CD11c⁺ Zellen auf (vgl. Abb 5.).

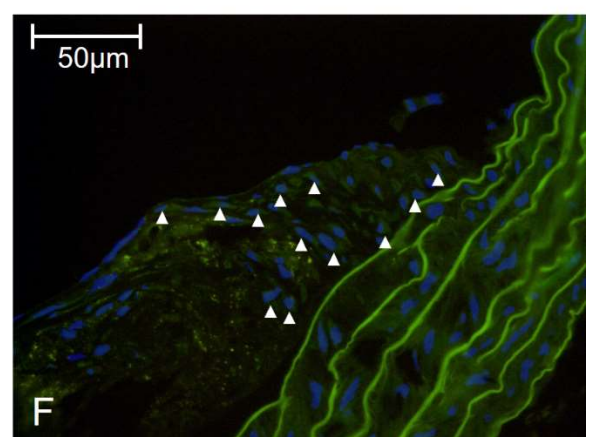
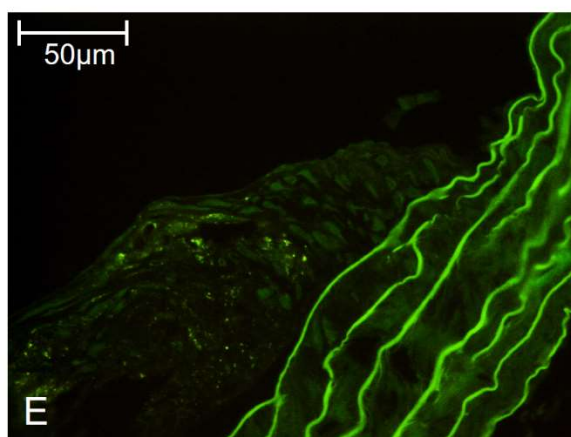
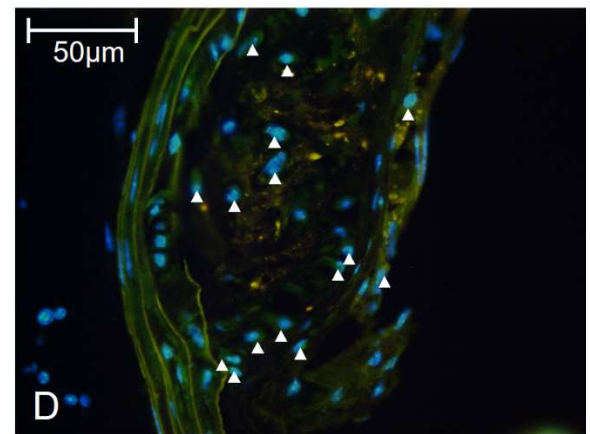
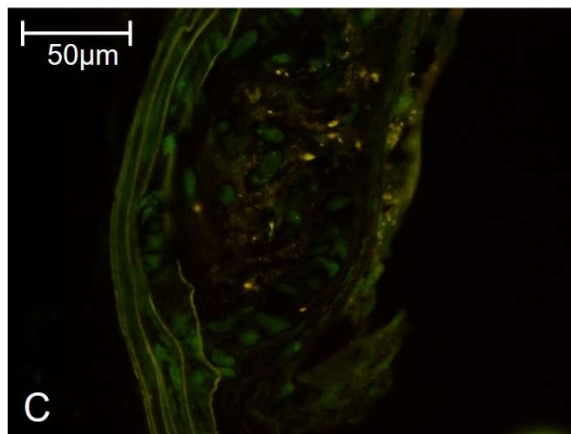
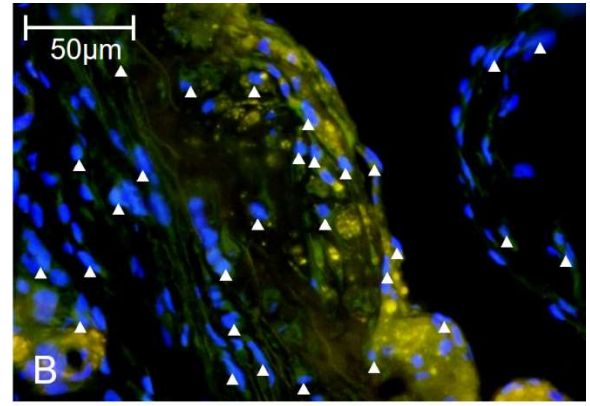
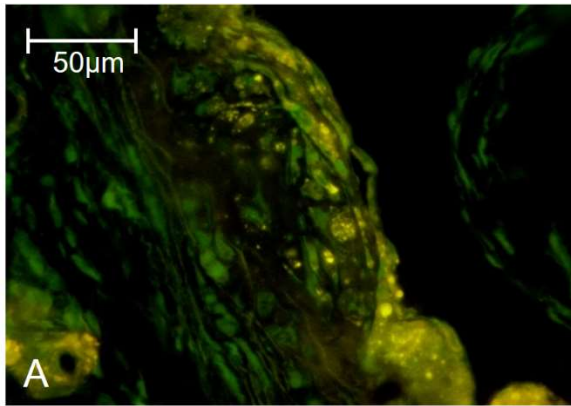


Abb.5: Immunfluoreszenzaufnahmen der Aortenwurzel (A,B), der Arteria brachiocephalica (C,D) und des Aortenbogens (E,F) bei arteriosklerotischen ApoE^{-/-}CD11c^{YFP}reporter Mäusen

Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt. Die Bilder Bild B,D,F zeigen jeweils die Übereinanderlagerung der YFP-Aufnahme mit der DAPI-Aufnahme. Die weißen Pfeile markieren CD11c⁺ grüne Zellen. Die ApoE^{-/-}CD11c^{YFP}reporter Mäuse waren 6 Wochen unter *high-fat* Diät. Experimentator: Thilo Westhofen und Martin Busch

6.2 Identifikation und Quantifizierung unterschiedlicher DC-Subsets

6.2.1 DC Subsets in vitro

Zur immunphänotypischen Analyse und Charakterisierung von DCs wurden in vitro – DC Kulturen aus Knochenmarksstammzellen durchflusszytometrisch untersucht. Die in Flt3L-Kulturen (Kapitel 4.2.2.) gezüchteten DCs wurden durch eine angepasste, etablierte DC-spezifische Gating-Strategie identifiziert. Aus dem Kollektiv CD45⁺ Zellen, die als Leukozyten identifiziert wurden, wurden CD11c⁺MHCII⁺ Zellen als DCs bestimmt. Anhand der Expression des E-cadherin-Liganden CD103 konnte eine große CD103⁻ und eine kleinere CD103⁺ Population identifiziert werden. CD103⁻ DCs konnten gemäß der Expression für den Adhäsions-G-Protein-gekoppelte Rezeptor F4/80 und das Integrin CD11b in ein großes CD11b⁺F4/80⁻ Subset, ein CD11b⁺F4/80⁺ Subset, sowie ein kleines CD11b⁻F4/80⁻ Subset unterteilt werden. Die CD103⁺ DCs zeigten keine Expression von F4/80 oder CD11b (Abb.7).

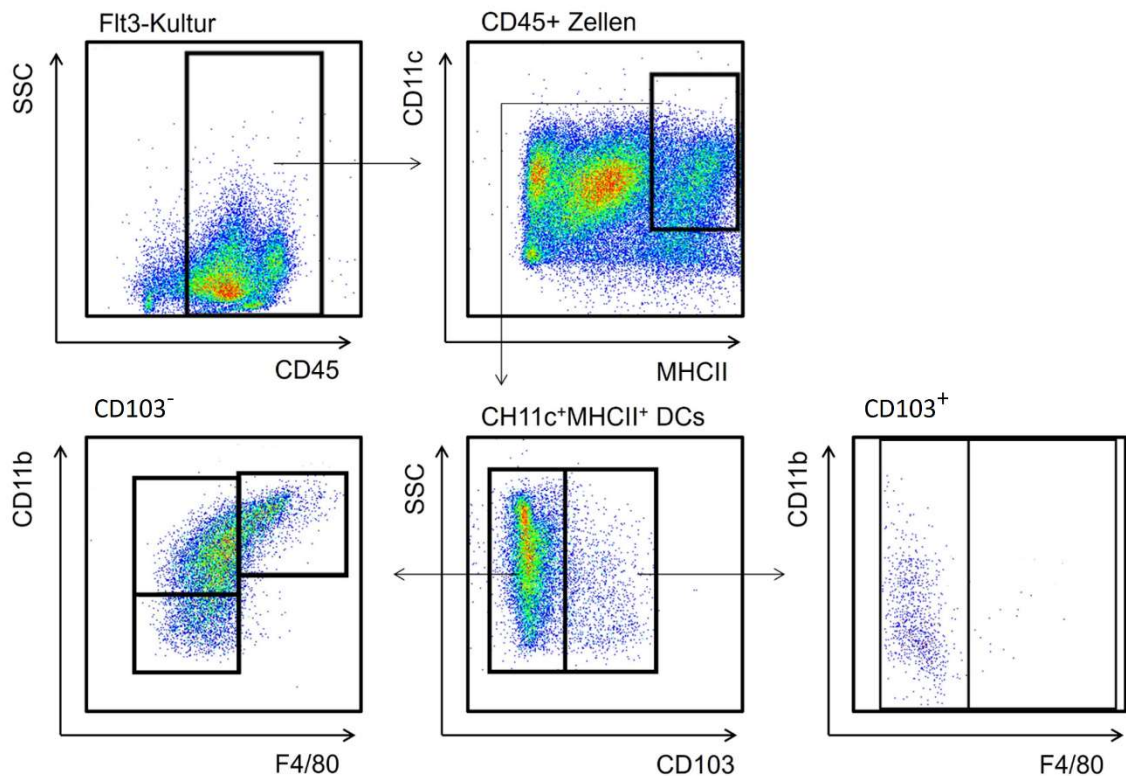


Abb.6: Gating-Strategie zur Identifizierung der DC-Subsets aus Flt3L-Kulturen

Repräsentative *pseudocolour* FACS Plots. CD11c⁺MHCII⁺ Zellen wurden als DCs identifiziert und gemäß CD103⁻, CD11b⁻ und F4/80⁻ Expression weiter unterteilt.

Experimentator: Thilo Westhofen

6.2.2 DC-Subsets in der Aorta

Um eine systematische immunphänotypische Charakterisierung von DCs der gesunden und arteriosklerotischen Aorta durchführen zu können sowie die Subsets dieser DCs in einer quantitativen Auswertung vergleichen zu können, erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Aorta gesunder und von Arteriosklerose befallener Mäuse. Hierzu wurde jeweils die enzymatisch verdaute Aorta von gesunden *C57BL/6* Mäusen (B6 Mäusen) (n=6) und von *Ldlr^{-/-}* Mäusen unter normaler Diät (n=6), nach 6 Wochen *high-fat* Diät (n=7) und nach 12

Wochen *high-fat* Diät (n=9) mittels Multicolor-Durchflusszytometrie untersucht. Zur Identifizierung von DCs wurde ebenfalls eine etablierte, DC-spezifische Gating-Strategie optimiert und in gleicher Form für gesunde C57BL/6 Mäuse, *Ldlr*^{-/-}-Mäuse unter normaler Diät, *Ldlr*^{-/-}-Mäuse nach 6-wöchiger fettreicher Diät und für *Ldlr*^{-/-}-Mäuse nach 12-wöchiger fettreicher Diät angewandt (60). Nachdem CD45⁺ Zellen als Leukozyten identifiziert wurden, erfolgte aus diesem Kollektiv der Ausschluss von CD19⁺ B-Zellen sowie TCR-β⁺ T-Zellen. Aus den verbleibenden Zellen wurden entsprechend des Gatings der DC-Kulturen CD11c⁺MHCII⁺ Zellen als die aortalen DCs identifiziert. CD11c⁻ MHCII⁺ Zellen aus dem verbleibenden Kollektiv, die eine hohe Expression des Zelladhäsionsmoleküls CD11b und des Rezeptors F4/80 aufwiesen, wurden wie auch in älteren Publikationen als Makrophagen identifiziert (60). Anhand der CD103-Expression konnte in der DC-Population eine große CD103⁻ Subpopulation identifiziert werden, sowie eine kleinere CD103⁺ Subpopulation, die entsprechend der CD103⁺ DC aus Flt3L-Kulturen keine Expression von CD11b oder F4/80 zeigte (60). Die große CD103⁻ Subpopulation konnte anhand der CD11b- und der F4/80 Expression in weitere Subsets unterteilt werden. Es zeigte sich ein größeres CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺ Subset und ein CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁻ Subset, aber zudem ein zusätzliches CD11c⁺CD11b⁻F4/80⁻ Subset. In diesem CD11c⁺CD11b⁻F4/80⁻ Subset konnte ein weiteres kleines Subset identifiziert werden, das eine schwache CD11c Expression, keine CD11b Expression aber eine hohe PDCA Expression aufwies, entsprechend einem Subset plasmazytoider DCs (pDCs) (61, 126). Mit einer absoluten Zellzahl von 125±42 pDCs pro analysierte Aorta bildete das pDC Subset ca 1,6% der CD11c⁺MHCII⁺ aortalen DCs ab. Alle DC Subsets zeigten keine relevante Expression des NK/NKT Zellmarkers NK1.1 (vgl Abb.7).

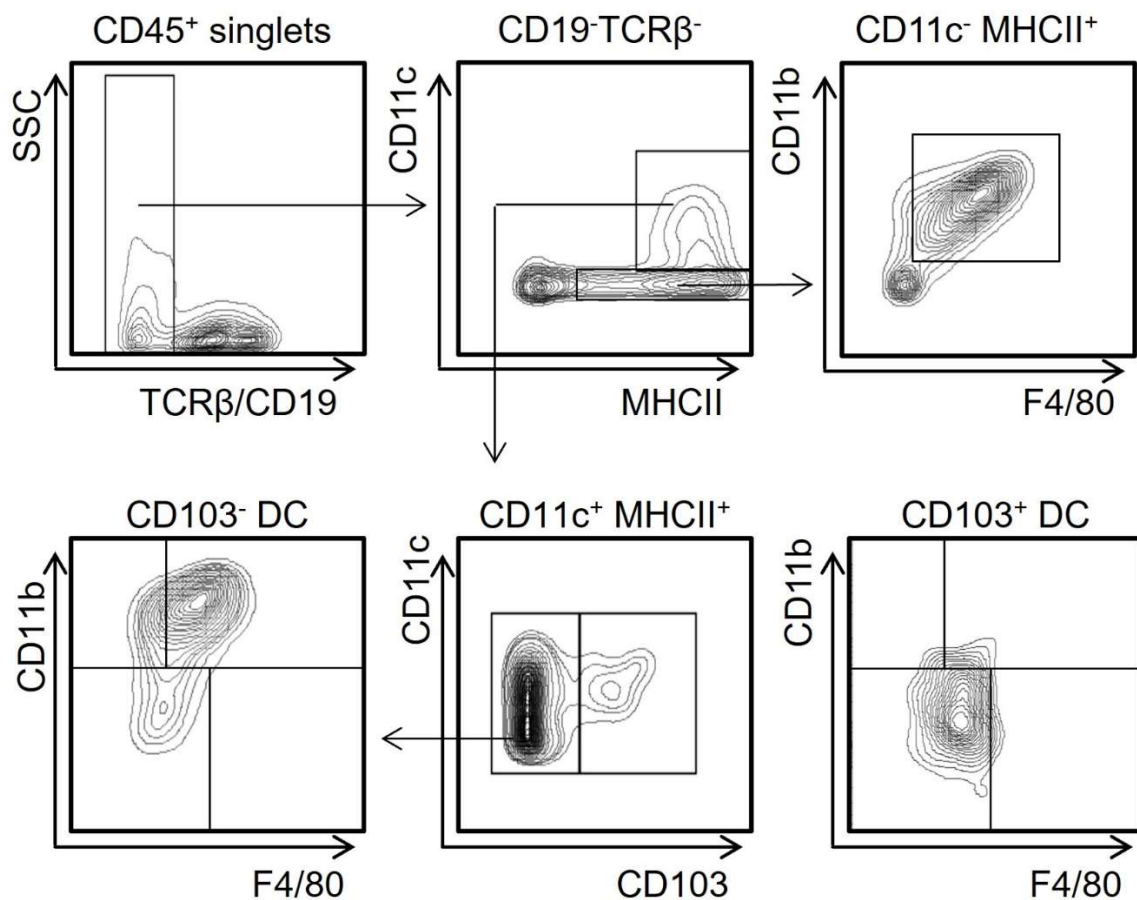


Abb.7: Gating-Strategie zur Identifizierung der DC-Subsets in der Aorta

Repräsentative contour FACS Plots zur Identifizierung einzelner aortaler DC-Subsets bei gesunden *C57BL/6*-Mäusen, und bei, *Ldlr^{-/-}*-Mäusen unter normaler- oder *high-fat* Diät. Nach Ausschluss von $TCR\beta^+/CD19^+$ T and B Zellen wurden $CD11c^+MHCII^+$ Zellen als DCs identifiziert und gemäß $CD103^-$, $CD11b^-$ und $F4/80^-$ Expression weiter unterteilt. Experimentator: Thilo Westhofen und Martin Busch

6.3 Kinetik der DC-Subsets während der Atherogenese

Um die Wachstumskinetik der DCs und der einzelnen Subsets über die Entstehung von Arteriosklerose zu untersuchen, erfolgte die systematische vergleichende Analyse der aortalen Zellen von gesunden B6 Mäusen gegen *Ldlr^{-/-}*-Mäuse unter normaler Diät, *Ldlr^{-/-}*-Mäuse nach 6-wöchiger *high-fat* Diät und für

Ldlr^{-/-}-Mäuse nach 12-wöchiger *high-fat* Diät. Wie schon bei den gesunden B6 Mäusen ließen sich auch in der Aorta von Ldlr^{-/-}-Mäusen ohne Arteriosklerose induzierende Diät deutliche DC- und Makrophagen Populationen identifizieren, welche gegenüber B6-Mäusen jedoch eine höhere absolute Zellzahl auswiesen. Bei Ldlr^{-/-}-Mäusen unter normaler Diät wurde mit 7833±2631 DCs pro Aorta eine 4-fach höhere absolute Zellzahl als bei B6-Mäusen mit 1827±135 DCs pro Aorta gefunden. Mit zunehmender Dauer fettreicher atherogener Diät zeigte sich bei den Ldlr^{-/-}-Mäusen ein signifikanter Anstieg der Gesamtzellzahl an DCs. Nach 6 Wochen und 12 Wochen fettreicher Diät erhöhte sich die absolute DC-Zahl bei Ldlr^{-/-}-Mäusen respektive um das 5-fache (9412±1111 DCs/Aorta) bzw. das 8-fache (15169±2124 DCs/Aorta). Die Gesamtzahl an Makrophagen zeigte sich erst nach 12 Wochen atherogener Diät mit 9947±1542 Zellen pro Aorta signifikant gegenüber B6-Mäusen (3517±605 Zellen/Aorta) vermehrt. In Hinblick auf die anteilige Zunahme einzelner Subsets, zeigten sowohl CD11c⁺CD103⁺ DCs als auch CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺ DCs die deutlichste Zunahme in der Zellzahl über die Induktion von Arteriosklerose. CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁻ DCs dagegen zeigten eine geringere Zunahme. CD11c⁺CD11b⁻F4/80⁻ DCs zeigten keine relevante Zunahme der Gesamtzellzahl (vgl Abb. 8)

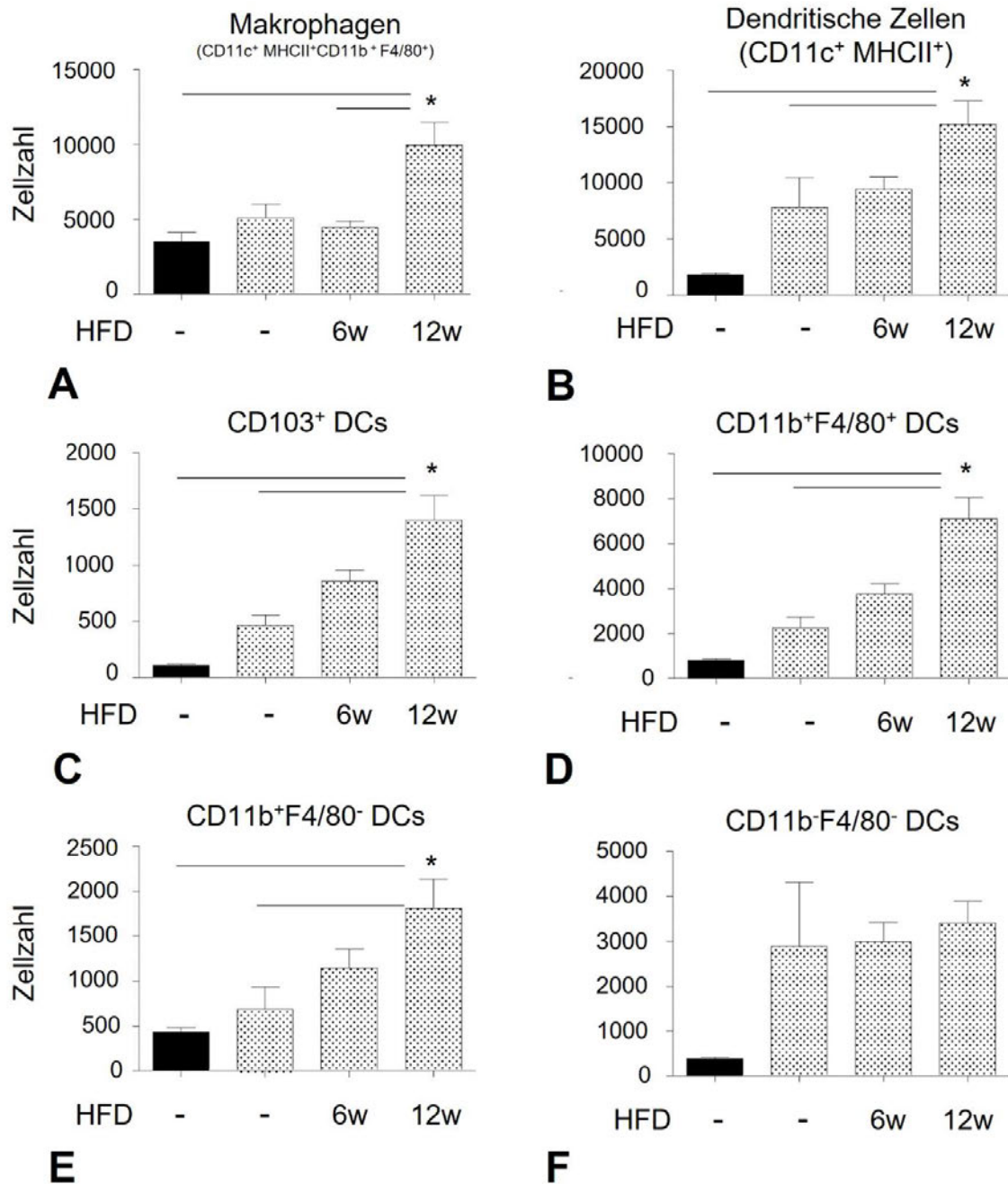


Abb.8: Quantifizierung von DCs(B), Makrophagen(A) und der einzelnen DC-Subsets(C-F) in der Aorta

Darstellung der mittleren Zellzahl mit Standardabweichung. Durchflusszytometrische Messung der Aorta von C57BL/6J Mäusen und Ldlr^{-/-} Mäusen unter normaler Diät und Ldlr^{-/-} Mäusen nach 6 bzw. 12 Wochen *high-fat* Diät. Gepoolte Auswertung von 2-3 Aorten pro Experiment; n = 6–9 Mäuse pro

Gruppe; statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) mit * gekennzeichnet.
 Experimentator: Thilo Westhofen und Martin Busch

In der Auswertung prozentualer Anteile der Subsets am gesamten DC Kollektiv zeigte das CD11c⁺CD103⁺ Subset eine relative Zunahme bei *Ldlr*^{-/-}Mäusen unter atherogener Diät im Vergleich zu gesunden B6-Mäusen. Die CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁻ DCs hingegen waren prozentual reduziert gegenüber B6 Mäusen. Die übrigen untersuchten Subsets (CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺ DCs und CD11c⁺CD11b⁻F4/80⁻ DCs) wiesen keine relevante Veränderung der relativen Anteile am DC-Gesamtkollektiv über die Entwicklung von Arteriosklerose auf (vgl. Abb. 9)

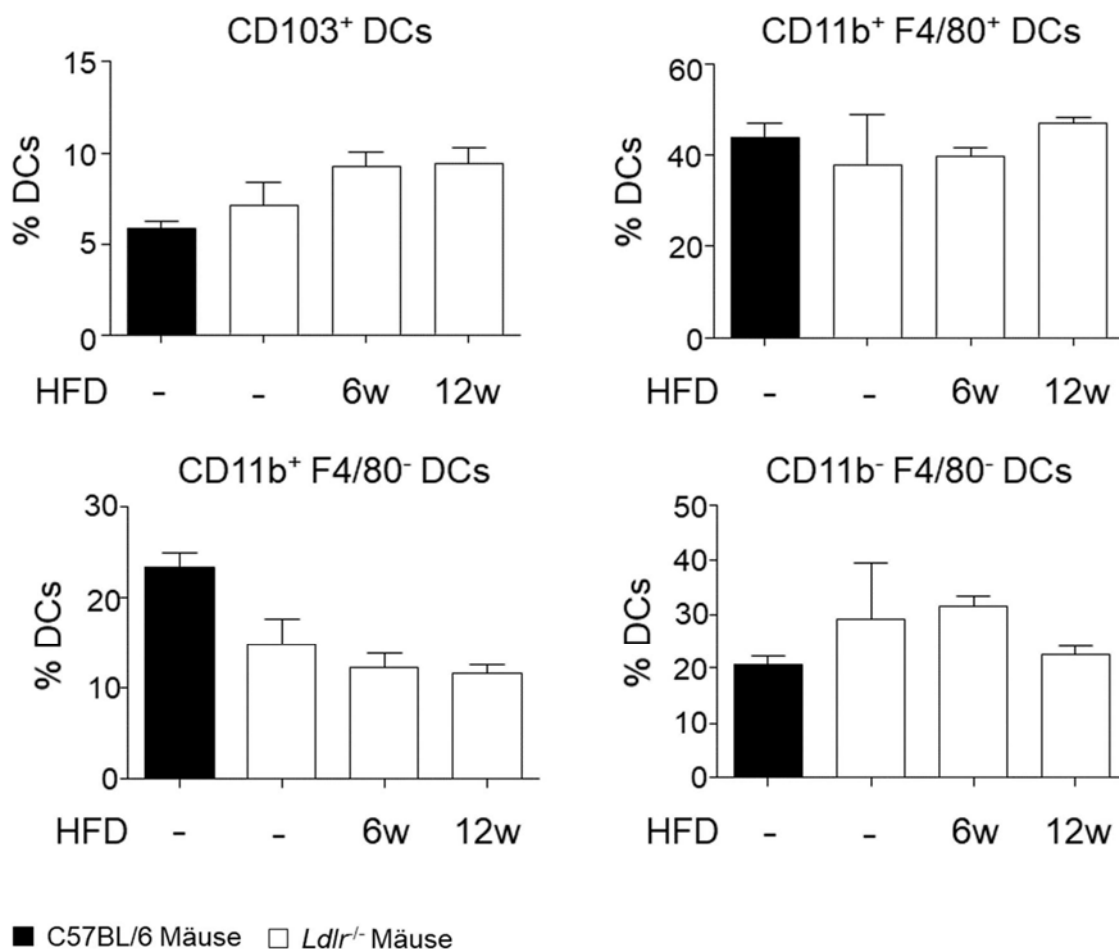


Abb.9: Prozentuale Anteil der einzelnen DC-Subsets in der Aorta

Darstellung der mittleren prozentualen Anteile der einzelnen DC-Subsets gemessen an der Gesamtpopulation der DCs inkl. Standardabweichung. Durchflusszytometrische Messung der Aorta von C57BL/6J Mäusen und Ldlr^{-/-} Mäusen unter normaler Diät und Ldlr^{-/-} Mäusen nach 6 bzw. 12 Wochen *high-fat* Diät. Gepoolte Auswertung von 2-3 Aorten pro Experiment; n = 6–9 Mäuse pro Gruppe; statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) mit * gekennzeichnet. Experimentator: Thilo Westhofen und Martin Busch

6.3.1 Histologische Identifikation der DC-Subsets

Zur histologischen Korrelation der durchflusszytometrisch identifizierten DC-Subsets wurde die Aortenwurzel von Ldlr^{-/-}-Mäusen mit ausgeprägter Arteriosklerose nach 12 Wochen *high-fat* Diät immunhistologisch untersucht. In der Immunfluoreszenz Co-Färbung mit CD11c- und F4/80 spezifischen Antikörpern konnten in der Aortenwurzel CD11c⁺ Zellen, F4/80⁺ Zellen und doppelt-positive CD11c⁺F4/80⁺Zellen identifiziert werden. In Übereinstimmung mit der Identifikation CD11c⁺F4/80⁺ und CD11c⁺F4/80⁻ DCs und CD11c⁻F4/80⁺ Makrophagen bestätigt dies die in der Durchflusszytometrie identifizierten Subsets (Abb.10).

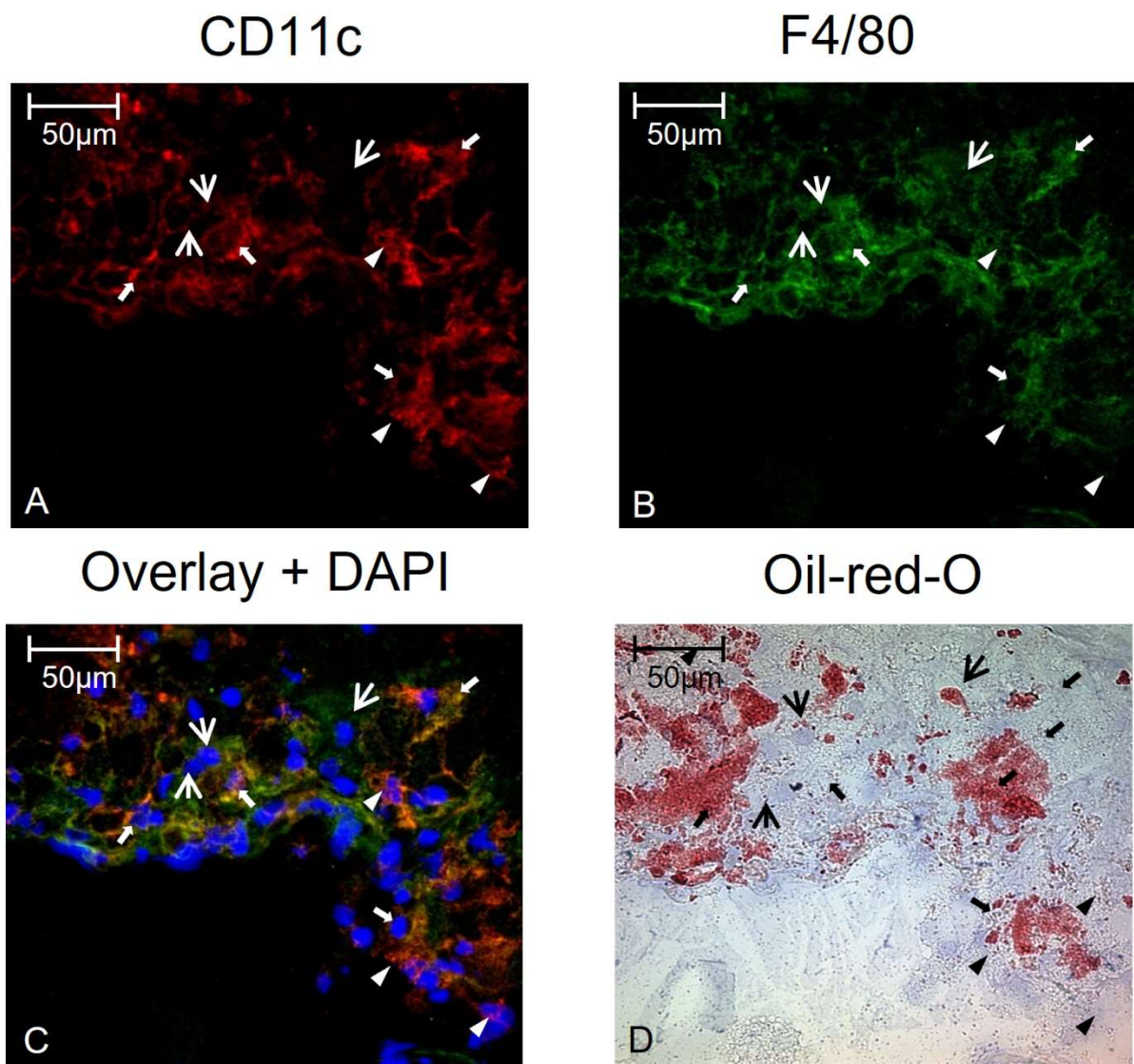


Abb.10: Immunfluoreszenzaufnahmen(A-C) und Oil-red-O-Färbung(D) der Aortenwurzel bei arteriosklerotischen $Ldlr^{-/-}$ Mäusen

Ko-Immunfluoreszenzfärbungen mit CD11c(A), F4/80(B) und Overlay aus CD11c⁺F4/80⁺ Zellkerne mit DAPI gefärbt(C). Die weißen Pfeilköpfe markieren CD11c⁺ Zellen, die dünnen Pfeile markieren F4/80⁺ Zellen, die dicken Pfeile markieren doppelt positive CD11c⁺ F4/80⁺ Zellen.

Die Färbung wurde an repräsentativen Kryo-Schnitten der Aortenwurzel von $Ldlr^{-/-}$ Mäusen nach 12 Wochen *high-fat* Diät durchgeführt. Die Oil-red-O-Färbung wurde zur Darstellung von Lipiden angewendet. Experimentator: Thilo Westhofen und Miriam Koch

Die Immunfluoreszenz Co-Färbung mit CD11c und dem Zelladhäsionsmolekül CD68, das vermehrt auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird (127), konnten ebenfalls CD11c⁺ Zellen, CD68⁺ Zellen und doppelt-positive CD11c⁺CD68⁺ Zellen in der Aortenwurzel identifiziert werden.

Mit Hilfe der Oil-Red-O Färbung ließen sich in korrelierenden histologischen Schnitten lipidreiche Areale und potenzielle Schaumzellen darstellen. Diese zeigten sich sowohl im Bereich einiger CD11c⁺ Zellen, F4/80⁺ Zellen, CD68⁺ Zellen und doppelt-positiver Zellen. Eine genauere Zuordnung in einzelne Zellpopulationen war anhand der Red-Oil-O Färbung jedoch nicht möglich (Abb.11).

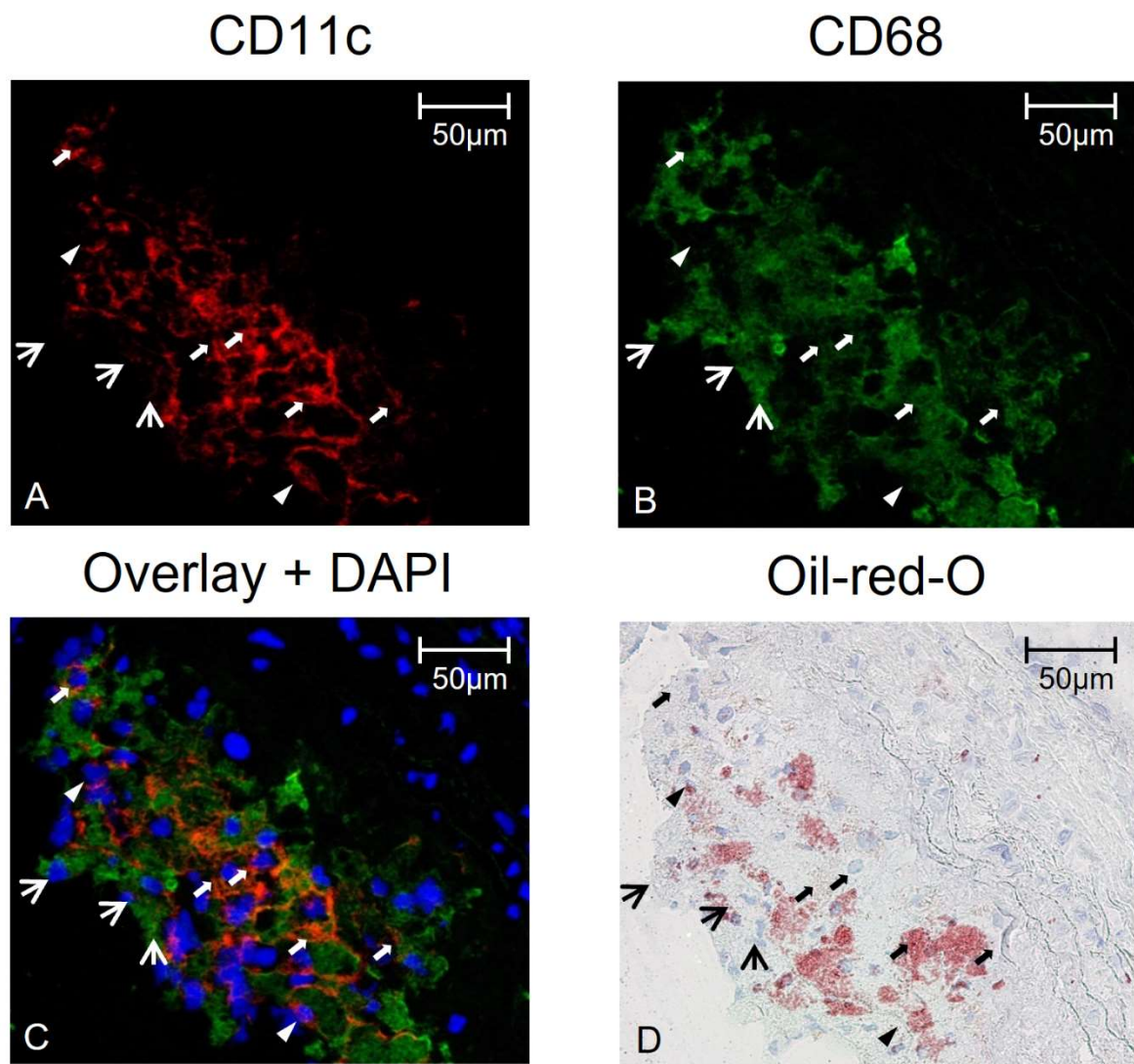


Abb.11: Immunfluoreszenzaufnahmen(A-C) und Oil-red-O-Färbung(D) der Aortenwurzel bei arteriosklerotischen *Ldlr*^{-/-} Mäusen

Ko-Immunfluoreszenzfärbungen mit CD11c(A), CD68(B) und Overlay aus CD11c+CD68+Zellkerne mit DAPI gefärbt(C). Die weißen Pfeilköpfe markieren CD11c⁺ Zellen, die dünnen Pfeile markieren CD68⁺ Zellen, die dicken Pfeile markieren doppelt positive CD11c⁺ CD68⁺ Zellen.

Die Färbung wurde an repräsentativen Kryo-Schnitten der Aortenwurzel von *Ldlr*^{-/-} Mäusen nach 12 Wochen *high-fat* Diät durchgeführt. Die Oil-red-O-Färbung wurde zur Darstellung von Lipiden angewendet. Experimentator: Thilo Westhofen und Miriam Koch

6.4 Immunphänotypische Charakterisierung der Subsets

6.4.1 Immunphänotypische Charakterisierung der Subsets in der Aorta

Neben zahlreichen verschiedenen Markern zur weiteren Charakterisierung von DCs und Differenzierung von DC-Subsets wurde das regulatorischen Membran-Glykoprotein signal-regulatory protein alpha (Sirp α) sowohl auf CD11b⁺ DCs als auch auf Monozyten und Makrophagen beschrieben (128, 129). Mit dem Ziel, die beschriebenen DC-Subsets genauer zu phänotypisieren und zu charakterisieren, wurde das Expressionsmuster des regulatorisch auf Phagozytose und Zellmigration wirkenden Sirp α auf den aortalen DCs untersucht und mit Makrophagen verglichen. Sowohl das CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁻ DC Subset als auch das CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺ DC Subset zeigten eine deutliche Sirp α Expression. Auch CD11c⁺MHCII⁺F4/80⁺ Makrophagen zeigten sich Sirp α ⁺. CD11c⁺CD11b⁻F4/80⁻DCs zeigten eine schwächere intermediäre Sirp α -Ausprägung, während für das Subset an CD11c⁺CD103⁺DCs keine Sirp α -Expression nachweisbar war. Die Entwicklung arteriosklerotischer Plaques zeigte keinen Einfluss auf die Expression von Sirp α auf aortalen DCs und Makrophagen. Zwischen gesunden B6-Mäusen, Ldlr^{-/-} Mäusen auf normaler Diät und Ldlr^{-/-} Mäuse auf atherogener Diät zeigte sich kein Unterschied im Expressionsmuster von Sirp α (Abb. 12).

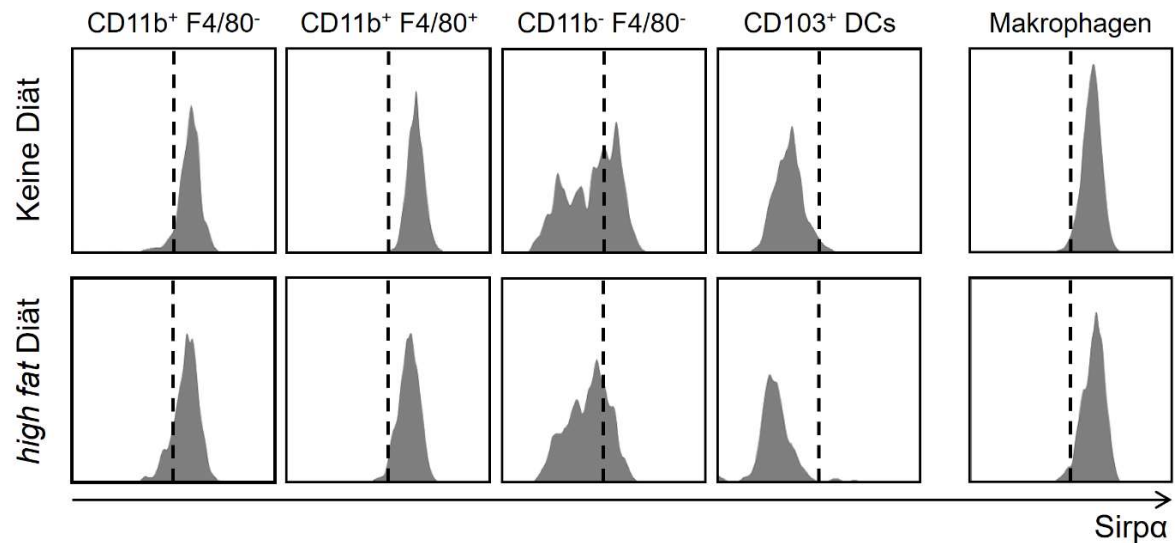


Abb.12: Expression von Sirp α der einzelnen DC-Subsets und der Makrophagen in der Aorta

Darstellung der Sirp α -Expression bei *Ldlr*^{-/-} Mäusen unter normaler Diät und nach 12 Wochen *high-fat* Diät. Gepoolte Auswertung von 2-3 Aorten pro Experiment, Histogramme der einzelnen Subsets jeweils repräsentativ für n=6-9 Mäuse pro Gruppe. Experimentator: Thilo Westhofen und Martin Busch

6.5 Herkunft aortaler DC-Subsets

6.5.1 Flt3/Flt3L abhängige DC-Subsets

Ontogenetisch konnte von Choi et al. für CD11c⁺F4/80⁺CD11b⁺ Makrophagen bereits ein M-CSF abhängiges Wachstum übereinstimmend mit der monozytären Abstammung gezeigt werden. Für DCs hingegen zeigte sich ein M-CSF abhängiges Wachstum von CD11b⁺F4/80⁺DCs sowie für CD103⁺DCs ein FMS-like tyrosine kinase 3 (Flt3)-abhängiges Wachstum (60).

Mit dem Ziel der genaueren Bestimmung der Ontogenese der gesamten DCs, sowie der neu definierten aortalen Subsets wurde die Expression von Flt3 für *Ldlr*^{-/-} Mäuse nach 6 Wochen atherogener Diät untersucht. Das CD103⁺ Subset zeigte eine deutliche Flt3 Expression. Sowohl das CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺ Subset, die CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁻DCs und die CD11c⁺CD11b⁻F4/80⁻DCs zeigten keine

Flt3 Expression. Erwartungsgemäß waren auch die Makrophagen Flt3 negativ (Abb. 13).

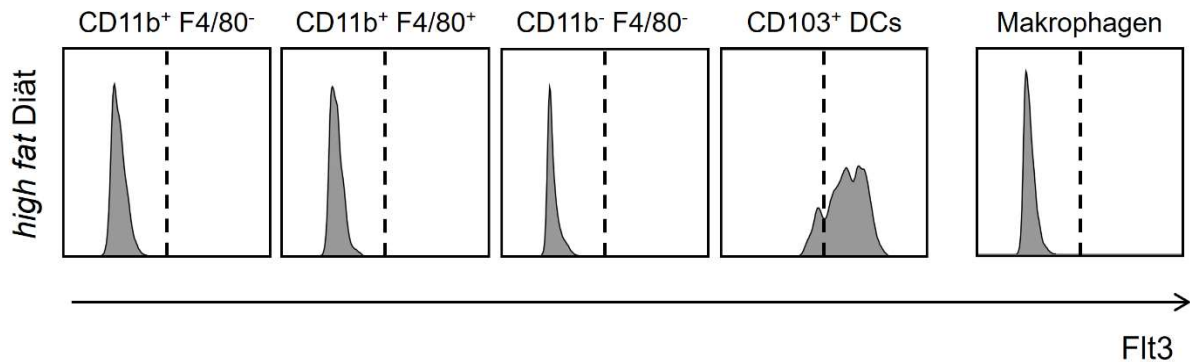


Abb. 13: Expression von Flt3 der einzelnen DC-Subsets und der Makrophagen in der Aorta

Darstellung der Flt3-Expression bei *Ldlr*^{-/-} Mäusen nach 6 Wochen *high-fat* Diät. Gepoolte Auswertung von 2-3 Aorten pro Experiment, Histogramme der einzelnen Subsets jeweils repräsentativ für n=9 Mäuse pro Gruppe. Experimentator: Thilo Westhofen und Martin Busch

Um den Einfluss von Flt3/Flt3L in der Entwicklung der aortalen DC und seiner Subsets zu untersuchen erfolgte die Analyse der DCs sowie den einzelnen Subsets in FMS-like tyrosine kinase 3-ligand (Flt3L) defizienten Mäusen (*Flt3L*^{-/-} Mäuse). Ähnlich wie für *Flt3*^{-/-} Mäuse vorbeschrieben (60), zeigte sich eine verminderte Gesamtzahlen CD11c⁺MHCII⁺ DCs in *Flt3L*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu gesunden B6 Mäusen (999±287vs. 1827±137 Zellen pro Aorta bei n = 3 unabhängigen Experimenten). Die absolute Zahl CD11c⁻CD11b⁺F4/80⁺ Makrophagen zeigte sich mit 2929.2±763.1 Zellen pro Aorta gegenüber B6 Mäusen nahezu unverändert (3517.0±605.3 Zellen pro Aorta), (n.s). Die Betrachtung der DC-Subsets in *Flt3L*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu B6 Mäusen zeigte keine relevanten Unterschiede in der Zellzahl der CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺DCs (512.2±143.2 vs. 797.2±63.1 Zellen pro Aorta) wie auch für das CD11c⁺CD11b⁻F4/80⁻ DC-Subset (382.3±95.9vs. 377.3±36.8 Zellen

pro Aorta) (jeweils n.s.). Die CD11c⁺CD103⁺DCs konnten in der Aorta von Flt3L^{-/-} Mäusen, ähnlich wie in Flt3^{-/-} Mäusen nicht nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich gegenüber B6 Mäusen bei Flt3L^{-/-} Mäusen ein nahezu kompletter Verlust der CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁻DCs.

Diese Ergebnisse zeigen, dass unter physiologischen Bedingungen nicht nur das CD11c⁺CD103⁺ DC-Subset, sondern auch die CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁻DCs Flt3/Flt3L-abhängig wachsen. Das CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺DC-Subset und das CD11c⁺CD11b⁻F4/80⁻ DC-Subset hingegen zeigen in der Aorta gesunder Mäuse wie auch CD11c⁻CD11b⁺F4/80⁺ Makrophagen ein Flt3/Flt3L-unabhängiges Wachstum (Abb.14).

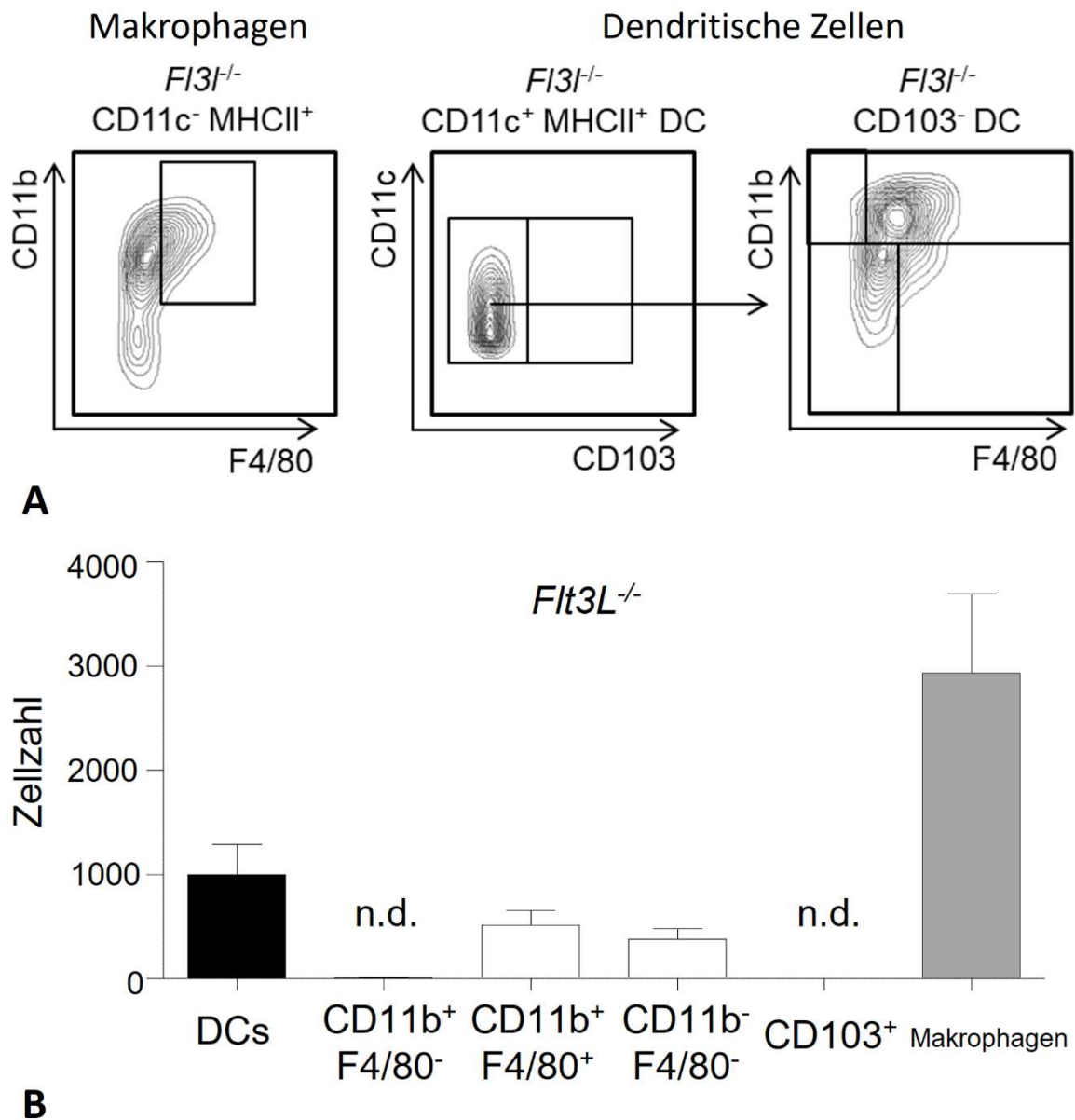


Abb.14: Quantifizierung der einzelnen DC-Subsets in der Aorta von $Flt3L^{-/-}$ Mäusen

(A) Repräsentative contour FACS Plots zur Identifizierung einzelner aortaler DC-Subsets

(B) Darstellung der mittleren Zellzahl mit Standardabweichung aortaler Makrophagen und der einzelnen DC Subsets. Gepoolte Auswertung von n=6 Mäusen. Experimentator: Thilo Westhofen und Martin Busch

6.5.2 Monozyten-abgeleitete DCs

6.5.2.1 High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor 1 (FcγR1) CD64

Der *High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor 1 (FcγR1) CD64* wurde als zuverlässiger Marker zur Unterscheidung von Makrophagen und CD11c⁺MHCII⁺ DCs beschrieben(58). Auch für Monozyten-abgeleitete DCs wurde im Gegensatz zu konventionellen DCs eine Expression von CD64 beschrieben(130). Zur Identifizierung Monozyten-abgeleiteter DCs wurden in der vorliegenden Arbeit die neu definierten DC-Subsets in gesunden B6-Mäusen und arteriosklerotischen Ldlr^{-/-} Mäusen auf ihre CD64 Expression untersucht. Die CD11c⁻CD11b⁺F4/80⁺ Makrophagen, welche als positiv- Kontrolle dienten zeigten erwartungsgemäß eine deutliche CD64 Expression. Bei gesunden B6Mäusen konnte für kein Subset der CD11c⁺MHCII⁺ DCs eine CD64 Expression gezeigt werden, was vermuten lässt, dass es sich bei den aortalen DC Subsets unter nicht-inflammatorischen Bedingungen eher um konventionelle cDCs und nicht monozyten-abgeleitete DCs handelt. Unter arteriosklerotischen Bedingungen, bei Ldlr^{-/-}Mäusen nach 12 Wochen atherogene fettreicher Diät, wurde bei insgesamt 21% der aortalen DCs eine CD64 Expression gefunden. Etwa die Hälfte des CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺ DC-Subsets sowie ein Teil des CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁻DC-Subsets zeigten sich CD64 positiv. Das CD11c⁺CD11b⁻F4/80⁻ DC-Subset und alle CD11c⁺CD103⁺DCs zeigten wie bei den B6-Mäusen keine CD64-Expression. Alle CD11c⁻CD11b⁺F4/80⁺ Makrophagen zeigten auch unter den inflammatorischen Bedingungen der Arteriosklerose eine persistierende CD64-Expression. Diese Ergebnisse legen nahe, dass unter inflammatorischen Bedingungen zumindest ein Teil der aortalen DCs Monozyten-abgeleitete DCs sind. Der Großteil dieser Monozyten-abgeleitete DCs finden sich unter inflammatorischen Bedingungen demnach im Subset der CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺ DCs, die unter arteriosklerotischen Bedingungen auch zahlenmäßig und prozentual am stärksten zugenommen haben (Abb. 15).

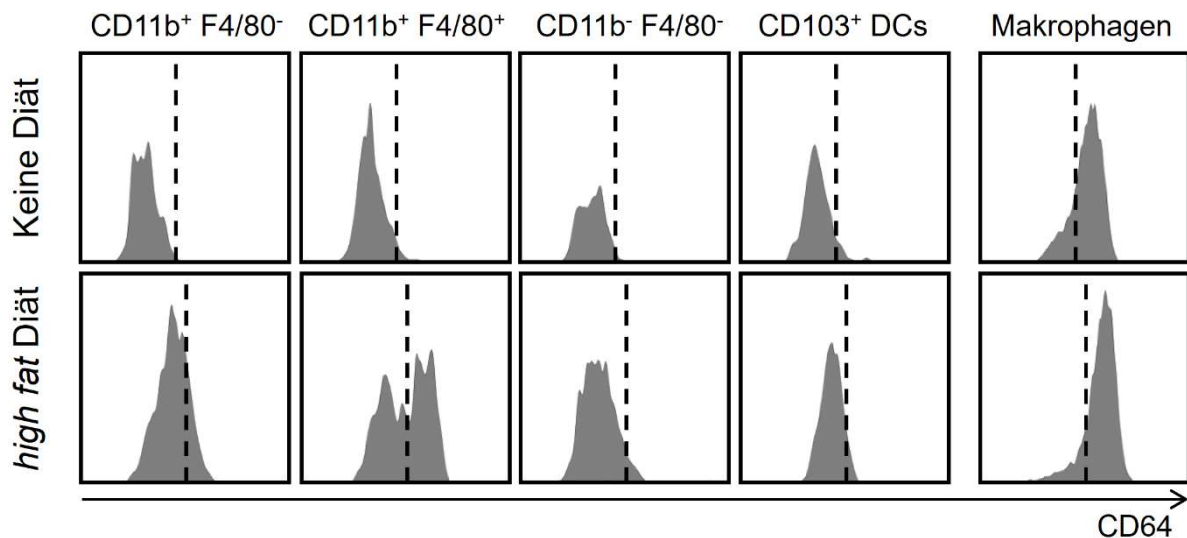


Abb.15: Expression von CD64 der einzelnen DC-Subsets und der Makrophagen in der Aorta

Darstellung der CD64-Expression bei *Ldlr*^{-/-} Mäusen unter normaler Diät und nach 12 Wochen *high-fat* Diät. Gepoolte Auswertung von 2-3 Aorten pro Experiment, Histogramme der einzelnen Subsets jeweils repräsentativ für n=6-9 Mäuse pro Gruppe. Experimentator: Thilo Westhofen und Martin Busch

6.5.2.2 Chemokin-Rezeptor CX₃CR1

Der Chemokin-Rezeptor CX₃CR1 und sein Ligand CX₃CL1 (fraktaline) nehmen einen zentralen Stellenwert in der Migration und Adhäsion von Monozyten ein. Neben seiner charakteristischen Expression auf Monozyten wurde die Expression von CX₃CR1 u.a. auch auf DCs nachgewiesen. Die Expression von CX₃CR1 zeigte sich hierbei vorrangig auf gereiften und Monozyten-abgeleiteten DCs. Im Rahmen der Atherogenese ist ein CX₃CR1-vermitteltets Fortschreiten arteriosklerotischer Plaques beschrieben (108, 131-134).

Mit dem Ziel der genaueren Bestimmung Monozyten-abgeleiteten DCs, erfolgte die Analyse der CX₃CR1- Expression auf den neu definierten DC-Subsets. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit die aortalen DC Subsets in *ApoE*^{-/-} CX₃CR1^{GFP}reporter Mäusen mit und ohne fettreiche Diät untersucht. Für *ApoE*^{-/-}

CX₃CR1^{GFP} Bei Mäuse unter normaler Diät wurde für 26.9% der DCs und 62.9% der Makrophagen eine CX₃CR1 Expression nachgewiesen. Sowohl das CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺DC-Subset als auch das CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁻DC-Subset zeigten eine partiell CX₃CR1 Expression (ca 20% der DCs) Für das CD11c⁺CD11b⁻F4/80⁻ Subset und die CD103⁺ DCs ließ sich keine relevante CX₃CR1 Expression nachweisen.

Unter arteriosklerotischen Bedingungen bei ApoE^{-/-}CX₃CR1^{GFP}reporter Mäusen unter 12 Wochen fettreicher Diät zeigten 71.2% der DCs und 90.8% der Makrophagen eine CX₃CR1 Expression. Für das CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺DC-Subset wie auch für das CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁻DC-Subset zeigten mehr als 80% der DCs innerhalb des jeweiligen Subsets eine CX₃CR1 Expression. Das CD11c⁺CD11b⁻F4/80⁻ Subset und die CD103⁺ DCs zeigten sich zum Großteil CX₃CR1-negativ. Knapp 19% der CD11c⁺CD11b⁻F4/80⁻ DCs und ca 10% der CD103⁺ DCs wiesen eine CX₃CR1 Expression auf. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass unter inflammatorischen Bedingungen aortale DCs zum Teil monozytärer Herkunft sind und sich diese vermehrt im CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺DC-Subset finden (Abb.16).

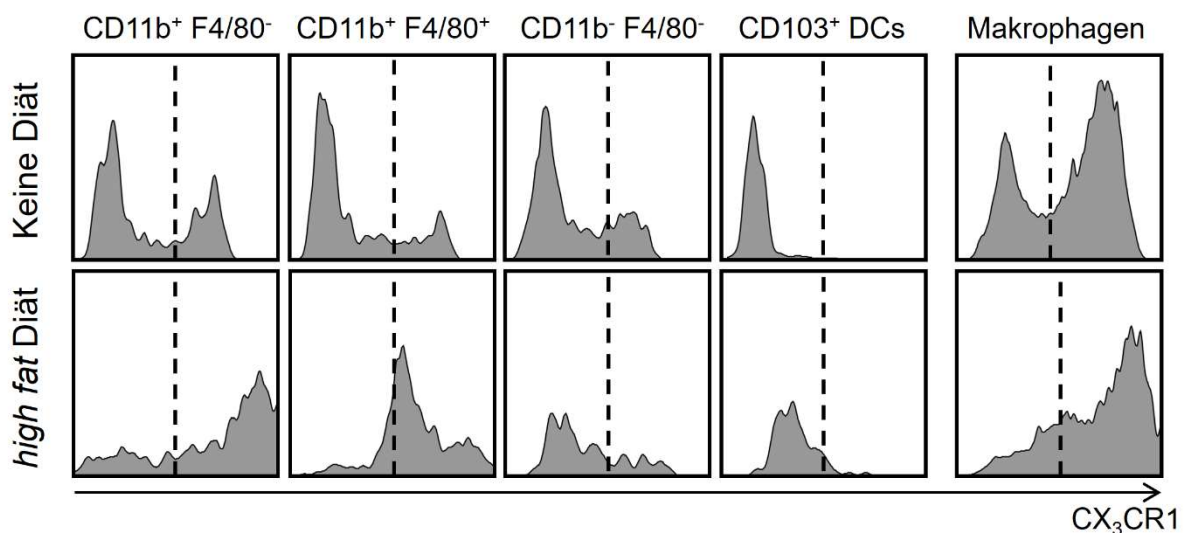


Abb.16: Expression von CX₃CR1 der einzelnen DC-Subsets und der Makrophagen in der Aorta

Darstellung der CX₃CR1-Expression bei ApoE^{-/-}CX₃CR1^{GFP}reporter Mäusen
Mäusen unter normaler Diät und nach 12 Wochen *high-fat* Diät. Histogramme der
einzelnen Subsets aus gepoolter Auswertung von 3-6 Aorten. Experimentator:
Thilo Westhofen

6.5.2.3 Lokalisation CX₃CR1 pos Zellen in der Aorta

Zur Ermittlung der Lokalisation CX₃CR1⁺ Zellen in der der arteriosklerotisch
veränderten Aorta erfolgte die immunhistologische Analyse der Aorta von ApoE^{-/-}
CX₃CR1^{GFP}reporter Mäusen mit ausgeprägter Arteriosklerose nach 6-wöcher
high-fat Diät.

Hierzu wurden Gewebsschnitte der Aortenwurzel und des Aortenbogens wurden
mittels Immunfluoreszenz Mikroskopie untersucht.

Die CX₃CR1 positive Zellen zeigten sich sowohl luminal gelegen, in der Gefäß-
Intima, wie auch in der Adventitia. Im Bereich der Aortenwurzel zeigten sich
CX₃CR1⁺ Zellen im Bereich der Aortenklappe und des Sinus aortae. Zudem
konnten vermehrt CX₃CR1 positive Zellen im luminalen Bereich
arteriosklerotischer Plaque-Areale nachgewiesen werden (Abb.17).

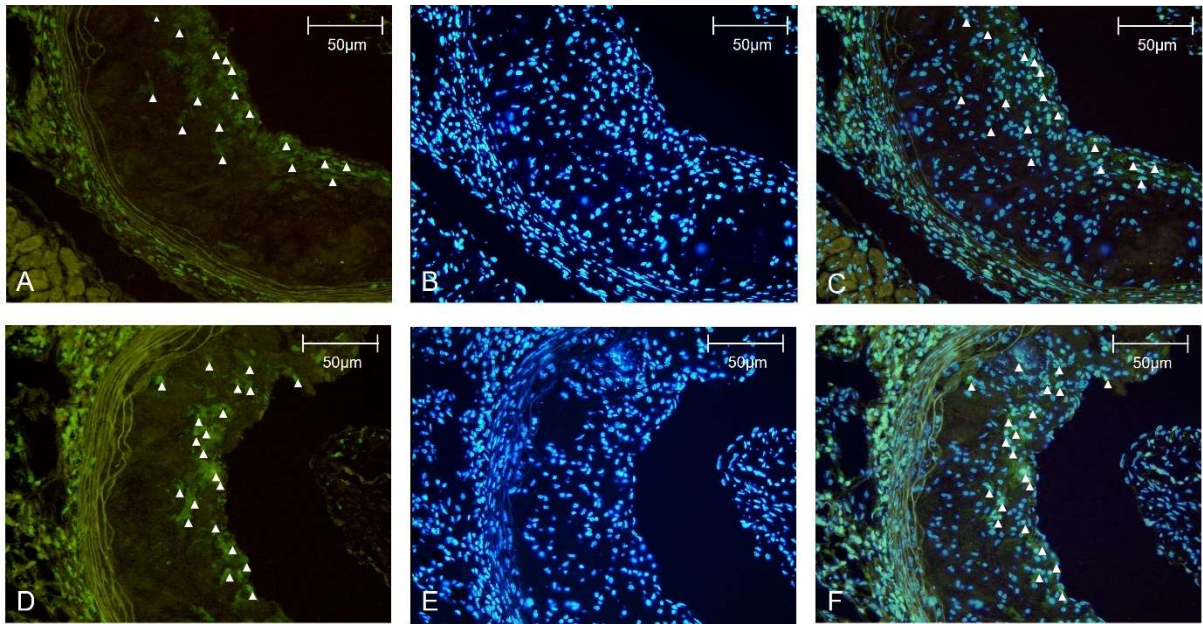


Abb.17: Immunfluoreszenzaufnahmen der Aortenwurzel bei arteriosklerotischen ApoE^{-/-}CX₃CR1^{GFP}reporter Mäusen

Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (B,E). Die Bilder C und F zeigen jeweils die Überlagerung der GFP-Aufnahme mit der DAPI-Aufnahme. Die weißen Pfeile markieren CX₃CR1⁺grüne Zellen. Die ApoE^{-/-}CX₃CR1^{GFP}reporter Mäuse waren 12 Wochen unter *high-fat* Diät. Experimentator: Thilo Westhofen

7 Diskussion

7.1 DC Subsets in vitro

Dendritische Zellen stellen eine heterogene Population mononukleären Zellen dar, die nach phänotypischen, ontogenetischen und funktionellen Aspekten in verschiedene Subgruppen unterteilt werden können (9, 22, 135). Murine DCs wurden ursprünglich in cDCs, (pDCs) und unter inflammatorischen Bedingungen entstehende Monozyten-abgeleitete moDCs unterteilt. (62). Die cDCs wiederum wurden in vorrangig im lymphatischen Gewebe befindlichen residente DCs, die anhand ihrer CD8a und CD4 Expression weiter unterteilt wurden, sowie extra-lymphatischen migratorischen DCs unterteilt. Neuere Studien konnten jedoch mittels scRNA-seq und *lineage tracing* Mausmodellen die Charakterisierung und Klassifizierung von DCs erneuern und verfeinern(16-18) Basierend auf Ergebnissen von Genexpressionsanalyse konnten 6 distinkte DC Subsets (DC1-DC6) identifiziert werden, sowie 4 distinkten Monozyten Subsets (Mono1-Mono4) (16). Darüber hinaus konnte ein Subset inflammatorischer CD5-CD163⁺CD14⁺ cDC2s, sogenannte inf-DCs identifiziert werden, das von Monozyten unabhängig und Flt3-abhängig ist (19).

Die genaue phänotypische Charakterisierung extra-lymphatischer cDCs, im Speziellen vaskulärer DCs war zum Zeitpunkt der Datenerhebung und ist nach wie vor ein kontroverses Thema. Die ausgeprägte Heterogenität der DC-Population sowie das Fehlen exklusiv-DC-spezifischer Oberflächenmarker, erschweren die distinkte Abgrenzung von DCs, v.a. gegenüber Makrophagen. Auch für das Integrin CD11c, welches in der Literatur oft als DC-spezifischer Surrogat-Marker beschrieben wurde, konnte eine Expression auf Monozyten und Makrophagen gezeigt werden (97, 136-138). Die Co-Expression von CD11c und MHCII wurde zum damaligen Zeitpunkt der Arbeit jedoch als phänotypische Definition von DCs akzeptiert. Choi et al. konnten angelehnt an diese Definition die Abgrenzung vaskulärer CD11c⁻ MHCII⁺ Makrophagen von CD11c⁺MHCII⁺ DCs beschreiben (60).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit die immunphänotypische Charakterisierung von DCs zunächst an *in vitro*

gezüchteter DCs verifiziert und verfeinert, sowie auf murine aortaler DCs *in vivo* übertragen und über die Entstehung von Arteriosklerose systematisiert und verfeinert.

Hierzu wurden mit Hilfe von Multicolor-Durchflusszytometrie einzelne Zellarten anhand ihrer Oberflächenmarker identifizieren und charakterisiert.

Murine DCs können *in vitro* aus Knochenmarks-Stammzellen mit Hilfe der Zytokine GM-CSF oder Flt3L generiert werden. Lange Zeit war man davon ausgegangen, dass in DC-Kulturen, die mittels GM-CSF generiert werden, DCs entstehen, welche phänotypisch inflammatorischen „monocyte-derived“ moDCs entsprechen. Mittlerweile sind die hier generierten Zellen noch besser charakterisiert und man konnte zeigen, dass die CD11c⁺MHCII⁺ Zellen zum Großteil um CD115⁺ Makrophagen und nur zu geringem Anteil um CD135⁺ DCs sind (43, 51, 139). Im Gegensatz dazu stimmen die im Rahmen dieser Arbeit mittels Flt3L generierten DC-Kulturen mit murinen DCs unter physiologischen Bedingungen überein und ähneln vaskulären cDC unter nicht inflammatorischen „steady-state“ – Bedingungen (121, 140).

In diesen Flt3L abhängigen Kulturen, die aus murinen Knochenmarkszellen gezüchtet wurden, konnten in der vorliegenden Arbeit aus den CD45⁺ Leukozyten CD11c⁺MHCII⁺ Zellen identifiziert werden. In Übereinstimmung mit vorbeschriebenen DC-spezifischen Gating-Strategien wurden diese als CD11c⁺MHCII⁺ DCs definiert (60, 112).

Das Integrin CD103 ist vielfach zur Differenzierung einzelner DC Subsets in nicht-lymphatischem Gewebe beschrieben (25). CD103⁺ DCs konnte eine mögliche Rolle in der Differenzierung T-regulatorischer Zellen zugeschrieben werden (60, 141).

Unter den CD11c⁺MHCII⁺ DCs zeigte sich im Rahmen der vorliegenden Untersuchung ein nur kleiner CD103⁺ Anteil der keine Expression von F4/80 zeigte. Diese Ergebnisse zeigen sich in Einklang mit den geringen CD103⁺ DC

Zahlen, die von Mayer et al. in Flt3L-Kulturen beschrieben wurden. Der größere Anteil der DCs zeigt keine Expression von CD103. Ginhoux et al konnten bereits in verschiedenen nicht lymphatischen Geweben (Haut, Lunge, Leber, Niere) ein CD103⁻CD11b⁺ DC-Subset mit nachweisbarer F4/80-Expression, sowie ein CD103⁺CD11b⁻ DC-Subset ohne F4/80-Expression nachweisen (25).

Die CD 103- DCs wurden entsprechend ihrer CD11b- und F4/80-Expression in Anlehnung an eine von Choi et al beschriebenen Gating-Strategie für aortale DCs in weitere Subsets unterteilt. Neben dem mit ca 56% zahlenmäßig größten CD11b⁺F4/80⁻ Subset konnte ein CD11b⁺F4/80⁺ Subset, sowie ein doppelt negatives CD11b⁻F4/80⁻ Subset abgegrenzt werden (60). Brawand et al beschreiben in Flt3L DC-Kulturen neben zwei cDC-Subsets - dem CD11c⁺CD11b⁺ Subset und dem CD11c⁺CD11b⁻ Subset - auch ein CD11c⁺CD11b⁻B220⁺ pDC-Subset. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse könnte das hier beschriebene doppelt negative CD11b⁻F4/80⁻ Subset Überlappungen mit dem CD11c⁺CD11b⁻B220⁺ pDC-Subset zeigen und somit auch pDCs beherbergen (142).

7.2 DC Subsets in vivo

Aufbauend auf den *in vitro* Versuchen wurden Zellen aus muriner Aorta von C57BL/6 Mäusen untersucht, welche durch enzymatischen Gewebsverdau gewonnen wurden. Nach erfolgtem Ausschluss von B-Zellen und T-Zellen anhand der CD19 und TCR-β Expression konnte aus den CD45⁺ Leukozyten eine CD11c⁺MHCII⁺ DC-Population identifiziert werden. Demgegenüber wurden CD11c⁺MHCII⁺ Zellen als Makrophagen-Population identifiziert und eindeutig von der DC-Population abgegrenzt (100, 143).

Wie zuvor bei den *in vitro* gewonnenen DCs aus Flt3L-Kulturen gezeigt, konnte auch *in vivo* eine kleine klar abgrenzbare CD103⁺ Population gefunden werden, welche keine Expression von CD11b oder F4/80 aufwies. Dies deckt sich mit einem von Choi et al beschriebenen CD11b⁻F4/80⁻ DC Subset, welches eine deutliche CD103 Expression auswies (60).

Die CD103⁻ aortalen DCs, die entsprechend der Flt3L Kulturen den Großteil der DC-Population bildeten, konnten detaillierter, anhand der CD11b- und der F4/80 Expression, in 3 weitere Subsets unterteilt werden. Ähnlich der in vitro DC-Population aus den Flt3L-Kulturen, konnten ein größeres CD11b⁺F4/80⁺ sowie ein CD11b⁺F4/80⁻ Subset gefunden werden. Dies zeigt sich im Einklang mit Ergebnissen von Choi et al. (60). Zudem konnte ein neues innerhalb der CD103⁻ DC-Population klar abgrenzbares CD11b⁻F4/80⁻ Subset identifiziert werden. Entgegen der Ergebnisse von Choi et al, die für alle CD11b⁻ F4/80⁻ DCs eine eindeutige CD103 Expression zeigten, konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig CD103⁻CD11b⁻F4/80⁻ DC als distinkte Population abgegrenzt werden. Koltsova et al. konnten bereits eine CD11c⁺CD11b⁻ Population aortaler DCs beschreiben, welche nur partiell F4/80 exprimiert. Möglicherweise könnte dieses Subset eine Überschneidung mit dem neu gefundenen CD103⁻CD11b⁻F4/80⁻ Subset sowie dem CD103⁺CD11b⁻F4/80⁻Subset aufweisen (112).

Somit wurden die aortalen DCs anhand ihres Phänotyps in 4 distinkte Subsets unterteilt, ein CD103⁺CD11b⁻F4/80⁻ Subset, ein CD103⁻CD11b⁺F4/80⁺ Subset, ein CD103⁻CD11b⁺F4/80⁻ und ein erstmalig beschriebenes CD103⁻CD11b⁻F4/80⁻ Subset.

7.3 Kinetik der DC-Subsets während der Atherogenese

Der Einfluss des Immunsystems sowie im Einzelnen antigenpräsentierender Zellen wie Makrophagen und DCs auf die Entwicklung von Arteriosklerose wurde durch zahlreiche Studien belegt (83, 144, 145). Bobryshev et al konnten zeigen, dass die damals als vaskuläre DCs bezeichneten Zellen vermehrt in Plaque-Arealen zu finden sind (146). Der genaue Einfluss und die Entwicklung Dendritischer Zellen während der Entstehung der Arteriosklerose ist jedoch noch nicht genau geklärt. Um die Entwicklung der DCs und der einzelnen zuvor beschriebenen DC Subsets in der Atherogenese zu untersuchen, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die systematische durchflusszytometrische Analyse der aortalen DC Subsets von gesunden B6 Mäuse gegenüber Ldlr-Knockoutmäusen

unter normaler Diät und *Ldlr*^{-/-} Mäusen nach respektive 6- und 12-wöchiger fettreicher Diät. Hierzu wurde die zum Zeitpunkt der Datenerhebung anerkannte Definition für vaskuläre DCs zu Grunde gelegt.

Sowohl DCs als auch Makrophagen zeigten eine signifikant erhöhte absolute Zellzahl unter arteriosklerotischen Bedingungen, DCs zeigten jedoch eine deutlich stärkere Zunahme als Makrophagen. Die absoluten Zellzahlen aortaler CD11c⁺MHCII⁺ DCs waren in *Ldlr*^{-/-} Mäusen um eine 4fache höher als in WT-Mäusen. Nach 12-wöchiger *high-fat* Diät waren die absoluten DC-Zahlen mit 15169±2124 pro Aorta um ein 8-faches erhöht gegenüber B6 Mäusen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Choi et al. die eine 8 bis 10-fache Erhöhung der aortalen DC-Zahlen nach 16-wöchiger *high-fat* Diät gegenüber gesunden B6-Mäusen zeigen konnten (60). Auch Koltsova et al konnten eine Erhöhung der absoluten aortalen DC-Zahlen von *ApoE*^{-/-} Mäusen unter *high-fat* Diät um den Faktor 10 zeigen (112). Galkina et al. hingegen beobachteten eine geringere Steigerung der aortalen DCs bei arteriosklerotischen *ApoE*^{-/-} Mäusen um den Faktor 3, jedoch eine 20-fache Erhöhung der absoluten Makrophagen Zahlen pro Aorta (147). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nur eine dezente Erhöhung der absoluten Makrophagen pro Aorta in *Ldlr*^{-/-} Mäusen unter normaler Diät und nur eine 3-fache Erhöhung nach 12-wöchiger Diät. Koltsova et al. zeigte eine ca. 8-fache Erhöhung der absoluten Makrophagen-Zahlen und eine ca. 10-fache Erhöhung der absoluten DC Zahlen pro Aorta von *ApoE*^{-/-} Mäusen unter *high-fat* Diät gegenüber B6-Mäusen (112). Da Makrophagen unter inflammatorischen Bedingungen die Expression von DC-typischen Marker wie CD11c und MHCII aufweisen, kann die eindeutige phänotypische Unterscheidung von DCs und Makrophagen unter arteriosklerotischen Bedingungen jedoch erschwert sein (117, 148).

Für *Ldlr*-Mäuse nach 12 Wochen WD konnte sowohl für das CD103⁺ DC Subset, als auch das CD103⁻CD11b⁺F4/80⁺ Subset und das CD103⁻CD11b⁻F4/80⁻ Subset eine Erhöhung der absoluten aortalen DC-Zahlen respektive um das 6-, 8-, und 4-fache gezeigt werden, was sich mit den Ergebnissen von Choi et al

deckt (99). Das im Rahmen dieser Arbeit erstmalig beschriebene CD103⁻CD11b⁻F4/80⁻ DC-Subset zeigte keine signifikante Zunahme der Zellzahl durch eine Arteriosklerose-induzierende fettreiche WD und präsentiert sich somit unabhängig der Entstehung von Arteriosklerose.

7.4 Immunphänotypische Charakterisierung der Subsets.

Um ein genaueres Verständnis der einzelnen beschriebenen Subsets, v.a. des erstmalig beschriebenen CD103⁻CD11b⁻F4/80⁻ DC-Subsets zu erlangen, erfolgte die verfeinerte Phänotypisierung der einzelnen Subsets.

Das regulatorische Transmembran-Protein Signal regulatory protein α (Sirp α) wird vorrangig auf Neuronen und APCs wie Makrophagen und DCs exprimiert (129). In Wechselwirkung mit dem „don't eat me“-Signal CD47 übernimmt Sirp α eine wichtige Funktion in der Regulierung von Migration und Phagozytose von DCs (149).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals die Expression von Sirp α auf aortalen DCs und Makrophagen nachgewiesen werden. Sowohl das CD103⁻CD11b⁺F4/80⁺ und das CD103⁻CD11b⁺F4/80⁻ DC Subset als auch CD11c⁻MHCII⁺ Makrophagen zeigten eine deutliche Sirp α -Expression, wohingegen das neu beschriebene CD103⁻CD11b⁻F4/80⁻ DC-Subset nur teilweise Sirp α exprimiert. In Einklang mit Ginhoux et al zeigten aortale CD103⁺ DCs keine Sirp α -Expression (25). Über die Entwicklung der Arteriosklerose zeigten allen beschriebenen DC-Subsets sowie die Makrophagen gleichermaßen keine Veränderung der Sirp α -Expression. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Adams et al, die für Sirp α ebenfalls eine von Inflammation unabhängige Expression zeigen konnten (150). Beide CD103⁻CD11b⁺ Subsets, welche eine eindeutige Sirp α Expression aufwiesen, zeigten den zahlenmäßig größten Zuwachs (median >9000DCs/Aorta) unter der Entwicklung von Arteriosklerose. Sowohl Baba et al., als auch Fortin et al. konnten bereits im Rahmen entzündlicher Darmerkrankungen die Zunahme intestinaler CD103⁻Sirp α ⁺ DCs in der Entstehung von Colitis nachweisen. Zudem konnte ein proinflammatorischer

Einfluss intestinaler CD103⁻Sirpα⁺ DCs auf die Genese und das Fortschreiten entzündlicher Darmerkrankungen gezeigt werden. CD103⁺ DC hingegen zeigten eine protektive Wirkung (151-153). Raymond et al konnten auch für die Lunge eine proinflammatorische Wirkung von Sirpα⁺ DCs zeigen (154). Die protektive Wirkung der CD103⁺ DCs konnte bereits von Choi et al. auch für arteriosklerotische Gefäßerkrankungen bestätigt werden (60). Eine proinflammatorische Wirkung der Sirpα⁺CD103⁻ DCs könnte auch bei aortalen DCs zutreffend sein und sollte daher Gegenstand weiterführender Studien sein.

7.5 Herkunft Aortaler DCs

Übereinstimmend mit bisherigen Studien (105, 155) konnten im Rahmen dieser Arbeit bei ApoE^{-/-}CD11c^{YFP}reporter Mäusen mit durch *high-fat* Diät induzierte Arteriosklerose, vermehrt CD11c⁺ DCs im Bereich der Intima und im Bereich arteriosklerotischer Plaque Areale der Aorta nachgewiesen werden (Abb.5). Die genaue Herkunft intimaler und in Plaques ansässiger DCs ist jedoch noch nicht endgültig geklärt. Neben der konventionellen Entwicklung klassischer cDC aus pre-DCs ist für extralymphatische murine DCs die Entwicklung aus Monozyten beschrieben, sogenannter „monocyte derived DCs“ oder mo-DCs (105). Ginhoux et al konnten für zahlreiche Gewebe, u.a. in der Lunge, Leber, Haut und Niere, zwei distinkte extralymphatische DC-Populationen auf Basis der CD103 Expression differenzieren. Für die CD103⁺ DC-Population konnte eine Flt3L vermittelte Genese aus DC Vorläufern, den pre-DCs, gezeigt werden. Die inhomogenere CD103⁻CD11b⁺ Population präsentierte sich in der Genese sowohl Flt3L als auch M-CSF abhängig (25). In der murinen Aorta konnten Choi et al eine streng Flt3/Flt3L abhängige Genese der CD103⁺ DCs aus pre-DCs nachweisen und diese CD103⁺ DCs als klassische cDCs identifizieren. Die CD103⁻ DCs hingegen zeigten ähnlich wie Makrophagen, eine stark M-CSF-abhängige Genese, weitestgehend unabhängig von Flt3/Flt3L. Zudem konnte für diese Population eine deutliche Expression des Chemokinrezeptors CX₃CR1 sowie von CD14 gezeigt werden, vereinbar mit einer monozytären Herkunft dieses DC-Subsets (60, 156).

Aufbauend darauf erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine systematische Phänotypisierung, der zuvor beschriebenen Subsets, mit Fokus auf dem hier erstbeschriebenen CD103⁻CD11b⁻F4/80⁻ DC-Subset, und dem Ziel Aufschluss über den Entwicklungsursprung der einzelnen aortalen DC Subsets, im „steady state“ und unter inflammatorischen arteriosklerotischen Bedingungen zu geben.

Unter *steady-state* Bedingungen konnte in der vorliegenden Arbeit eine Flt3L-abhängige Entwicklung für das CD103⁺CD11b⁻F4/80⁻ DC Subset, aber auch für das CD103⁻CD11b⁺F4/80⁻ Subset gezeigt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Choi et al (99) deutet dies darauf hin, dass sich neben den CD103⁺ DC auch das CD103⁻ CD11b⁺F4/80⁻ Subset den klassischen cDCs zuordnen lässt. Vereinbar damit konnten Bogunovic et al. und Ginhoux et al. für Flt3-defiziente und für Flt3L-defiziente Mäuse eine Verminderung sowohl der CD103⁺ als auch der CD103⁻CD11b⁺ DCs in unterschiedlichem extralymphatischem Gewebe zeigen (25, 32). Im Gegensatz dazu konnte hier für das CD103⁻CD11b⁺F4/80⁺ Subset und das im Rahmen dieser Arbeit erstbeschriebene CD103⁻CD11b⁻F4/80⁻ Subset, keine relevante Veränderung in der Zellzahl bei Flt3L^{-/-} Mäusen gezeigt werden, was eine Flt3L-unabhängige Entwicklung vermuten lässt.

Sowohl für das CD103⁺CD11b⁻F4/80⁻ DC Subset als auch für alle drei CD103⁻ Subsets konnte in gesunden Mäusen unter *steady-state* Bedingungen gleichermaßen keine CD64-Expression nachgewiesen werden. Die Expression von CD64, des „high-affinity IgG Rezeptors FcγRI“ wird unter *steady-state* Bedingungen als solider und zuverlässiger Marker zur Unterscheidung von „monocyte-derived“ DCs gegenüber konventionelle DCs (cDCs) in der Haut und muskulärem Gewebe beschrieben (130), sowie zur Unterscheidung von DCs generell gegenüber Makrophagen in Muskel-, Haut-, Darm- und Milzgewebe (58, 157). Für aortale CD11c⁺MHCII⁺ Makrophagen konnte auch in der vorliegenden Analyse eine deutliche Expression von CD64 gezeigt werden, was als positive Kontrolle für die CD64-Färbung gewertet werden kann. Die fehlende Expression von CD64 durch das CD103⁺CD11b⁻F4/80⁻ DC Subset und das CD103⁻

CD11b⁺F4/80⁻ Subset unterstützt die Hypothese, dass diese Subsets den *conventional* cDCs zugeordnet werden können. Die fehlende CD64 Expression der anderen DC-Subsets unter *steady-state* Bedingungen lässt jedoch keine eindeutige Differenzierung allein auf Basis der CD64-Expression zu.

Unter arteriosklerotischen Bedingungen hingegen konnte eine zunehmende CD64 Expression aortaler DCs nachgewiesen werden. Sowohl das CD103⁻CD11b⁺F4/80⁺ Subset und zu einem geringen Anteil auch das CD103⁻CD11b⁺F4/80⁻ DC Subset wiesen zunehmend CD64⁺ DCs auf. Langlet et al und Tamoutounour et al, konnten bereits mittels CD64 Expression „monocyte-derived“ DCs in Haut und Skelettmuskel identifizieren und von cDCs abgrenzen (130, 157).

Entsprechend der Ergebnisse von Langlet et al. und Tamoutounour et al. weist dies auf eine monozytäre Genese dieser Subsets während der Entstehung arteriosklerotischer Plaque Areale hin. Min et al. hingegen konnten eine CD64 Expression auch für konventionelle cDCs zeigen. Unter inflammatorischen Bedingungen konnte in murinen Lymphknoten ein distinktes inflammatorisches CD64⁺ cDC-Subset nachgewiesen werden, dass sich Flt3-abhängig entwickelt und sich von einem inflammatorischen CD64⁺ moDC-Subset abgrenzen lässt (158). Vereinbar damit konnten Bosteels et al. im Rahmen viraler Infekte der Atemwege eine deutliche CD64 Expression des *inf-cDC2*-Subsets zeigen, das Flt3-abhängig aus pre-DCs entsteht (17). Dies schwächt CD64 als singulären Marker zur Identifizierung von DCs monozytärer Abstammung ab.

Das CD103⁺CD11b⁻F4/80⁻ DC Subset zeigte unter *steady-state* Bedingungen ebenfalls keine Expression des Chemokin-Rezeptors CX₃CR1, der neben seiner Schlüsselfunktion in der Monozyten Migration und Adhäsion, ein wichtiger Regulator von DCs in der Entstehung von arteriosklerotischen Plaques ist (108, 133). Für das CD103⁻F4/80⁻CD11b⁺ Subset, das CD103⁻F4/80⁺CD11b⁺ Subset sowie für das CD103⁻F4/80⁻CD11b⁻ Subset konnte jeweils eine partielle Expression von CX₃CR1 nachgewiesen werden. Choi et al hingegen konnten nur für F4/80⁺CD11b⁺ DCs ähnlich wie für Makrophagen eine CX₃CR1 Expression

zeigen, weshalb dieses Subset ontogenetisch den moDCs zugeordnet wurde. Das hier untersuchte CD11c-MHCII⁺ Makrophagen-Subset wies übereinstimmend damit eine deutliche CX₃CR1 Expression auf. Für klassische cDCs, die als CD103⁺CD11b⁻F4/80⁻ DCs beschrieben wurden, konnten Choi et al. keine CX₃CR1 Expression zeigen (60). Nakando et al konnten im Gegensatz dazu unter *steady-state* Bedingungen in pulmonalem Gewebe eine CX₃CR1 vermittelte Migration von preDCs als Vorläufer von konventionellen cDCs aus dem Knochenmark nachweisen (159). Auch für die murine Aorta konnten Liu et al eine CX₃CR1 vermittelte Rekrutierung von CD11c⁺ Zellen in die aortale Intima beobachten. Diese CD11c⁺CX₃CR1⁺ Zellen wurden als intimale DCs charakterisiert (108). Vereinbar damit ist eine mögliche Überschneidung mit den hier beschriebenen CX₃CR1⁺ Zellen des CD103⁻CD11b⁺F4/80⁻ Subsets möglich.

Unter inflammatorischen arteriosklerotischen Bedingungen zeigten sowohl das CD103⁻CD11b⁺F4/80⁺ Subset als auch CD103⁻CD11b⁺F4/80⁻ Subset eine deutliche Zunahme CX₃CR1 exprimierender Zellen. Dies geht auch mit der zahlenmäßig größten Zunahme dieser Subsets während der Entwicklung von Arteriosklerose einher. Die Zunahme CX₃CR1 exprimierender DCs ist vereinbar mit Ergebnissen von Rowinska et al, die eine Zunahme der CX₃CR1 Expression in der arteriosklerotischen Aorta gegenüber der gesunden Aorta zeigen konnten (132). Liu et al konnten als mögliche Erklärung hierfür die CX₃CR1 vermittelte Rekrutierung von DCs in arteriosklerotische Plaque Areale der Aorta zeigen. Die Rekrutierung von DCs unter inflammatorischen Bedingungen zeigte sich bei CX₃CR1 Defizienz deutlich beeinträchtigt (108). Nakando et al. konnten hingegen zeigen, dass unter inflammatorischen Bedingungen die Migration von DCs in die Lunge nicht Cx₃Cr1 vermittelt ist (159) Sutti et al konnten darüber hinaus die Differenzierung inflammatorischer CX₃CR1⁺ moDCs aus Monozyten unter inflammatorischen Bedingungen der „non-alcoholic steatohepatitis“ in der Leber zeigen (134). Die Zunahme CX₃CR1⁺ DCs der oben genannten Subsets in der murinen Aorta könnte möglicherweise durch Rekrutierung von CX₃CR1⁺ DCs in die arteriosklerotische Aorta aber auch durch Differenzierung von Monozyten zu moDCs erklärt werden. Jüngste Arbeiten basierend auf scRNA-seq Daten

konnten CX₃CR1 als zuverlässiges Unterscheidungsmerkmal von cDCs und MCs identifizieren (17). Williams et al. konnten ebenfalls mittels scRNA-seq ein Cluster an CD11c⁺CX₃CR1⁺ Zellen in der Aorta im *steady state* identifizieren, das eine Makrophagen typische Gensignatur aufwies und deshalb als MAC^{AIR} Population identifiziert wurde (90). In der immunhistochemischen Untersuchung der murinen Aorta mit ausgeprägter Arteriosklerose konnten in der vorliegenden Arbeit, korrelierend zu den zunehmenden CX₃CR1⁺ DCs der FACS Analyse, CX₃CR1⁺ Zellen luminal im Bereich der Plaque Areale gezeigt werden. Diese könnten also in Anbetracht der Ergebnisse von Williams et al. nicht nur „monocyte-derived DCs, die schon in früheren Arbeiten im Bereich aortalen Intima unter arteriosklerotischen Bedingungen beschrieben wurden (160), sondern auch residente MAC^{AIR} umfassen (90). Das neu beschriebene CD103⁻CD11b⁺F4/80⁻ DC-Subset, wie auch das CD103⁺ DC Subset hingegen zeigten auch unter arteriosklerotischen Bedingungen keine relevante CX₃CR1 Expression.

In Zusammenschau mit der zunehmenden CD64 Expression unter inflammatorischen Bedingungen, sowie dem Flt3L-unabhängigen Wachstum unterstützt auch das CX₃CR1-Expressionsmuster des CD103⁻CD11b⁺F4/80⁺ Subsets und CD103⁻CD11b⁺F4/80⁻ Subsets in der murinen Aorta die Hypothese, dass es sich hierbei um DCs monozytären Ursprungs, sogenannte moDCs handelt.

Die fehlende CD64 Expression, das CX₃CR1 Expressionsmuster sowie die Flt3L-abhängige Entwicklung des CD103⁺ CD11b⁻F4/80⁻ DCs Subset in der murinen Aorta deuten auf eine Zugehörigkeit zu klassischen konventionellen cDCs hin. Diese Subsets wären entsprechend der Nomenklatur von Guillaums et al. den cDC1s zuzuordnen (22). Auch im Rahmen aktueller scRNA-seq-Analysen konnte eine korrespondierende CD103⁺ cDC Population identifiziert werden, die jedoch nicht in der Intima, sondern in der Adventitia lokalisiert werden konnte (90).

8 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass sich die Population vaskulärer CD11c+MHCII+ Zellen, die gemäß der ursprünglich akzeptierten Definition als DCs der murinen Gefäßwand anerkannt wurden, über die Entwicklung der Arteriosklerose in distinkte Subsets unterteilen lassen. Die einzelnen Subsets weisen eine unterschiedliche Wachstumsdynamik während der Entstehung von Arteriosklerose auf und konnten anhand unterschiedlicher Oberflächenmarker, die potentiell Aufschluss über Herkunft oder Funktion der einzelnen Subsets geben, näher charakterisiert werden. Eine genaue funktionelle Charakterisierung der einzelnen Subsets blieb jedoch ausstehend und sollte Gegenstand weiterführender Studien sein. Auch die Frage, inwieweit es sich bei den beschriebenen Subsets um tatsächliche Subpopulationen aortaler DCs handelt oder, ob das Bild einzelner Subsets nur durch Hoch- und Tiefregulation einzelner Oberflächenmarker entsteht, konnte basierend auf den durchflusszytometrischen Daten nicht eindeutig geklärt werden. Zudem konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass DCs nach Aktivierung CD11c herunterregulieren und Makrophagen CD11c unter inflammatorischen Bedingungen hochregulieren können (112, 161). Das stellt CD11c als *pan-DC-Marker*, vor allem im Hinblick auf die Differenzierung zwischen Makrophagen und DCs in Frage. Die systematische Phänotypisierung der einzelnen Subsets über die Entwicklung der Arteriosklerose, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, konnte einen wichtigen Beitrag für das genauere Verständnis der Rolle von Immunzellen, insbesondere DCs und Makrophagen in der Arteriosklerose leisten. In jüngsten Jahren hat sich jedoch durch neue Technologien wie scRNA-seq (16, 17, 97, 103), Massenzytometrie (162) und *lineage tracing* Modelle (20, 34) die Definition von DCs und das Verständnis von DCs in der Arteriosklerose maßgeblich verändert. Die Ergebnisse aus Genexpressionsanalysen konnten aufzeigen, dass die Definition einzelner Zelllinien, wie z.B. residente vaskuläre DCs, sowie die Unterteilung in Subsets basierend auf Oberflächenmarkern uneindeutig sein kann (16, 17, 19). So konnten Williams et al zeigen, dass

CD11c⁺MHCII⁺ Zellen der Intima keine residenten vaskulären DCs, sondern residente MAC^{AIR} sind (90), die mit den intimalen CD11c⁺ Zellen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden, korrelieren. Darüber hinaus konnten Williams et al auch CD103⁺DCs in der Gefäßwand identifizieren, jedoch lokalisiert in der Adventitia (90). Diese zeigen wahrscheinlich eine Überlappung mit dem CD103⁺ Subset, das hier beschreiben und charakterisiert wurden. Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten CD103⁻CD11b⁺F4/80⁺ DCs und CD103⁻CD11b⁺F4/80⁻ DCs entsprechend basierend auf Ergebnissen von Bosteels et al. am ehesten inf-cDC2s und nicht wie ursprünglich angenommen moDCs (17). Diese jüngsten Genexpressionsanalysen haben bereits einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis von DCs in der Arteriosklerose geleistet. Aufbauend darauf könnte das Ziel zukünftiger Arbeiten eine systematische Charakterisierung von DCs während der Entwicklung von Arteriosklerose basierend auf scRNA-seq Analysen sein.

9 Literaturverzeichnis

1. Busch M, Westhofen TC, Koch M, Lutz MB, Zernecke A. Dendritic cell subset distributions in the aorta in healthy and atherosclerotic mice. *PLoS One*. 2014;9(2):e88452.
2. Paul WE. Bridging innate and adaptive immunity. *Cell*. 2011;147(6):1212-5.
3. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001;106(3):255-8.
4. Mashayekhi M, Sandau MM, Dunay IR, Frickel EM, Khan A, Goldszmid RS, et al. CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity*. 2011;35(2):249-59.
5. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*. 2007;26(4):503-17.
6. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137(5):1142-62.
7. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(3):151-61.
8. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev*. 2010;234(1):45-54.
9. Schraml BU, Reis e Sousa C. Defining dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2015;32:13-20.
10. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol*. 2012;13(12):1145-54.
11. Guo X, Zhou Y, Wu T, Zhu X, Lai W, Wu L. Generation of mouse and human dendritic cells in vitro. *J Immunol Methods*. 2016;432:24-9.
12. Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol*. 2008;181(9):5829-35.
13. Nussenzweig MC, Steinman RM, Unkeless JC, Witmer MD, Gutchinov B, Cohn ZA. Studies of the cell surface of mouse dendritic cells and other leukocytes. *J Exp Med*. 1981;154(1):168-87.
14. Steinman RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med*. 1979;149(1):1-16.
15. Menezes S, Melandri D, Anselmi G, Perchet T, Loschko J, Dubrot J, et al. The Heterogeneity of Ly6C(hi) Monocytes Controls Their Differentiation into iNOS(+) Macrophages or Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Immunity*. 2016;45(6):1205-18.
16. Villani AC, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*. 2017;356(6335).
17. Bosteels C, Neyt K, Vanheerswynghels M, van Helden MJ, Sichien D, Debeuf N, et al. Inflammatory Type 2 cDCs Acquire Features of cDC1s and Macrophages to Orchestrate Immunity to Respiratory Virus Infection. *Immunity*. 2020;52(6):1039-56.e9.

18. Williams M, Dutertre CA, Scott CL, McGovern N, Sichien D, Chakarov S, et al. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity*. 2016;45(3):669-84.
19. Dutertre CA, Becht E, Irac SE, Khalilnezhad A, Narang V, Khalilnezhad S, et al. Single-Cell Analysis of Human Mononuclear Phagocytes Reveals Subset-Defining Markers and Identifies Circulating Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity*. 2019;51(3):573-89.e8.
20. Wu X, Briseño CG, Durai V, Albring JC, Haldar M, Bagadia P, et al. Mafb lineage tracing to distinguish macrophages from other immune lineages reveals dual identity of Langerhans cells. *J Exp Med*. 2016;213(12):2553-65.
21. Maier B, Leader AM, Chen ST, Tung N, Chang C, LeBerichel J, et al. A conserved dendritic-cell regulatory program limits antitumour immunity. *Nature*. 2020;580(7802):257-62.
22. Williams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(8):571-8.
23. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science*. 2006;311(5757):83-7.
24. Waskow C, Liu K, Darrasse-Jeze G, Guermonprez P, Ginhoux F, Merad M, et al. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol*. 2008;9(6):676-83.
25. Ginhoux F, Liu K, Helft J, Bogunovic M, Greter M, Hashimoto D, et al. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103⁺ DCs. *J Exp Med*. 2009;206(13):3115-30.
26. Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Ohteki T, Jarrossay D, Manz MG. Identification of clonogenic common Flt3⁺M-CSFR⁺ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol*. 2007;8(11):1207-16.
27. Devi KS, Anandasabapathy N. The origin of DCs and capacity for immunologic tolerance in central and peripheral tissues. *Semin Immunopathol*. 2017;39(2):137-52.
28. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 1997;91(5):661-72.
29. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000;404(6774):193-7.
30. Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, et al. Development of CD8 α -positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science*. 2000;290(5499):2152-4.
31. Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM, Yao K, et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science*. 2009;324(5925):392-7.
32. Bogunovic M, Ginhoux F, Helft J, Shang L, Hashimoto D, Greter M, et al. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity*. 2009;31(3):513-25.

33. Varol C, Vallon-Eberhard A, Elinav E, Aychek T, Shapira Y, Luche H, et al. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity*. 2009;31(3):502-12.
34. Feng J, Pucella JN, Jang G, Alcántara-Hernández M, Upadhaya S, Adams NM, et al. Clonal lineage tracing reveals shared origin of conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. 2022;55(3):405-22.e11.
35. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656-61.
36. Belz GT, Nutt SL. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(2):101-13.
37. Karsunky H, Merad M, Cozzio A, Weissman IL, Manz MG. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3⁺ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3⁺ dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 2003;198(2):305-13.
38. Holmes ML, Carotta S, Corcoran LM, Nutt SL. Repression of Flt3 by Pax5 is crucial for B-cell lineage commitment. *Genes Dev*. 2006;20(8):933-8.
39. Brasel K, McKenna HJ, Morrissey PJ, Charrier K, Morris AE, Lee CC, et al. Hematologic effects of flt3 ligand in vivo in mice. *Blood*. 1996;88(6):2004-12.
40. Naik SH, Proietto AI, Wilson NS, Dakic A, Schnorrer P, Fuchsberger M, et al. Cutting edge: generation of splenic CD8⁺ and CD8⁻ dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J Immunol*. 2005;174(11):6592-7.
41. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, et al. CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med*. 1996;184(2):695-706.
42. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994;179(4):1109-18.
43. Helft J, Böttcher J, Chakravarty P, Zelenay S, Huotari J, Schraml BU, et al. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity*. 2015;42(6):1197-211.
44. Greter M, Helft J, Chow A, Hashimoto D, Mortha A, Agudo-Cantero J, et al. GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity*. 2012;36(6):1031-46.
45. Sathe P, Pooley J, Vremec D, Mintern J, Jin JO, Wu L, et al. The acquisition of antigen cross-presentation function by newly formed dendritic cells. *J Immunol*. 2011;186(9):5184-92.
46. Vremec D, Lieschke GJ, Dunn AR, Robb L, Metcalf D, Shortman K. The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *Eur J Immunol*. 1997;27(1):40-4.
47. Kingston D, Schmid MA, Onai N, Obata-Onai A, Baumjohann D, Manz MG. The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis. *Blood*. 2009;114(4):835-43.

48. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):533-44.
49. MacDonald KP, Rowe V, Bofinger HM, Thomas R, Sasmono T, Hume DA, et al. The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion. *J Immunol.* 2005;175(3):1399-405.
50. Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, Dai XM, et al. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol.* 2006;7(3):265-73.
51. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(1):19-30.
52. Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, Bosch E, et al. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science.* 2008;320(5877):807-11.
53. Hashimoto D, Miller J, Merad M. Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity.* 2011;35(3):323-35.
54. Naik SH. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol Cell Biol.* 2008;86(5):439-52.
55. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:563-604.
56. Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol.* 2000;164(6):2978-86.
57. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med.* 2007;204(8):1775-85.
58. Tamoutounour S, Henri S, Lelouard H, de Bovis B, de Haar C, van der Woude CJ, et al. CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *Eur J Immunol.* 2012;42(12):3150-66.
59. Zernecke A. Dendritic cells in atherosclerosis: evidence in mice and humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(4):763-70.
60. Choi JH, Cheong C, Dandamudi DB, Park CG, Rodriguez A, Mehandru S, et al. Flt3 signaling-dependent dendritic cells protect against atherosclerosis. *Immunity.* 2011;35(5):819-31.
61. Doring Y, Zernecke A. Plasmacytoid dendritic cells in atherosclerosis. *Front Physiol.* 2012;3:230.
62. Manthey HD, Zernecke A. Dendritic cells in atherosclerosis: functions in immune regulation and beyond. *Thromb Haemost.* 2011;106(5):772-8.
63. Libby P. Inflammation in Atherosclerosis-No Longer a Theory. *Clin Chem.* 2021;67(1):131-42.
64. Wolf D, Ley K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2019;124(2):315-27.
65. Organization WH. World Health Organization. Cardiovascular diseases

(CVDs) Fact Sheet. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-cvds>. 2021.

66. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2017;135(10):e146-e603.
67. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011;145(3):341-55.
68. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2017;38(32):2459-72.
69. Dahlöf B. Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *Am J Cardiol*. 2010;105(1 Suppl):3a-9a.
70. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.
71. Gimbrone MA, Jr., García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-36.
72. Huang L, Chambliss KL, Gao X, Yuhanna IS, Behling-Kelly E, Bergaya S, et al. SR-B1 drives endothelial cell LDL transcytosis via DOCK4 to promote atherosclerosis. *Nature*. 2019;569(7757):565-9.
73. Skálén K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*. 2002;417(6890):750-4.
74. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*. 2011;12(3):204-12.
75. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(5):551-61.
76. Llorente-Cortés V, Martínez-González J, Badimon L. LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(6):1572-9.
77. Ylä-Herttua S, Bentzon JF, Daemen M, Falk E, Garcia-Garcia HM, Herrmann J, et al. Stabilisation of atherosclerotic plaques. Position paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on atherosclerosis and vascular biology. *Thromb Haemost*. 2011;106(1):1-19.
78. Yurdagul A, Jr., Doran AC, Cai B, Fredman G, Tabas IA. Mechanisms and Consequences of Defective Efferocytosis in Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2017;4:86.
79. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):56.
80. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17(11):1410-22.
81. Cardoso L, Weinbaum S. Microcalcifications, Their Genesis, Growth, and Biomechanical Stability in Fibrous Cap Rupture. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1097:129-55.

82. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med*. 2013;368(21):2004-13.
83. Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(10):802-15.
84. Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(5):1104-15.
85. Jawień J, Nastafek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*. 2004;55(3):503-17.
86. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992;71(2):343-53.
87. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*. 1994;14(1):133-40.
88. Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, Roth L, Van der Donckt C, Martinet W, et al. Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2017;816:3-13.
89. Vallejo J, Cochain C, Zernecke A, Ley K. Heterogeneity of immune cells in human atherosclerosis revealed by scRNA-Seq. *Cardiovasc Res*. 2021;117(13):2537-43.
90. Williams JW, Zaitsev K, Kim KW, Ivanov S, Saunders BT, Schrank PR, et al. Limited proliferation capacity of aortic intima resident macrophages requires monocyte recruitment for atherosclerotic plaque progression. *Nat Immunol*. 2020;21(10):1194-204.
91. Robbins CS, Chudnovskiy A, Rauch PJ, Figueiredo JL, Iwamoto Y, Gorbatov R, et al. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation*. 2012;125(2):364-74.
92. Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R, et al. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest*. 2007;117(1):195-205.
93. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, et al. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 2007;117(1):185-94.
94. Combadière C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B, et al. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 2008;117(13):1649-57.
95. Carlin LM, Stamatiades EG, Auffray C, Hanna RN, Glover L, Vizcay-Barrena G, et al. Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*. 2013;153(2):362-75.
96. Quintar A, McArdle S, Wolf D, Marki A, Ehinger E, Vassallo M, et al. Endothelial Protective Monocyte Patrolling in Large Arteries Intensified by Western Diet and Atherosclerosis. *Circ Res*. 2017;120(11):1789-99.

97. Zerneck A, Winkels H, Cochain C, Williams JW, Wolf D, Soehnlein O, et al. Meta-Analysis of Leukocyte Diversity in Atherosclerotic Mouse Aortas. *Circ Res.* 2020;127(3):402-26.
98. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(10):709-21.
99. Cochain C, Zerneck A. Macrophages and immune cells in atherosclerosis: recent advances and novel concepts. *Basic Res Cardiol.* 2015;110(4):34.
100. Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo JL, et al. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med.* 2013;19(9):1166-72.
101. Weinberger T, Esfandyari D, Messerer D, Percin G, Schleifer C, Thaler R, et al. Ontogeny of arterial macrophages defines their functions in homeostasis and inflammation. *Nat Commun.* 2020;11(1):4549.
102. Härdtner C, Kornemann J, Krebs K, Ehlert CA, Jander A, Zou J, et al. Inhibition of macrophage proliferation dominates plaque regression in response to cholesterol lowering. *Basic Res Cardiol.* 2020;115(6):78.
103. Cochain C, Vafadarnejad E, Arampatzi P, Pelisek J, Winkels H, Ley K, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis. *Circ Res.* 2018;122(12):1661-74.
104. Pan H, Xue C, Auerbach BJ, Fan J, Bashore AC, Cui J, et al. Single-Cell Genomics Reveals a Novel Cell State During Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Potential Therapeutic Targets for Atherosclerosis in Mouse and Human. *Circulation.* 2020;142(21):2060-75.
105. Jongstra-Bilen J, Haidari M, Zhu SN, Chen M, Guha D, Cybulsky MI. Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis. *J Exp Med.* 2006;203(9):2073-83.
106. Choi JH, Do Y, Cheong C, Koh H, Boscardin SB, Oh YS, et al. Identification of antigen-presenting dendritic cells in mouse aorta and cardiac valves. *J Exp Med.* 2009;206(3):497-505.
107. Paulson KE, Zhu SN, Chen M, Nurmohamed S, Jongstra-Bilen J, Cybulsky MI. Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis. *Circ Res.* 2010;106(2):383-90.
108. Liu P, Yu YR, Spencer JA, Johnson AE, Vallanat CT, Fong AM, et al. CX3CR1 deficiency impairs dendritic cell accumulation in arterial intima and reduces atherosclerotic burden. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(2):243-50.
109. Yilmaz A, Weber J, Cicha I, Stumpf C, Klein M, Raithel D, et al. Decrease in circulating myeloid dendritic cell precursors in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(1):70-80.
110. Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F, Ouzilleau B, Pirault J, Deswaerte V, et al. Conventional dendritic cells at the crossroads between immunity and cholesterol homeostasis in atherosclerosis. *Circulation.* 2009;119(17):2367-75.
111. Nickel T, Schmauss D, Hanssen H, Sicic Z, Krebs B, Jankl S, et al. oxLDL uptake by dendritic cells induces upregulation of scavenger-receptors, maturation and differentiation. *Atherosclerosis.* 2009;205(2):442-50.

112. Koltsova EK, Garcia Z, Chodaczek G, Landau M, McArdle S, Scott SR, et al. Dynamic T cell-APC interactions sustain chronic inflammation in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2012;122(9):3114-26.
113. Weber C, Meiler S, Döring Y, Koch M, Drechsler M, Megens RT, et al. CCL17-expressing dendritic cells drive atherosclerosis by restraining regulatory T cell homeostasis in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2898-910.
114. Sun J, Hartvigsen K, Chou MY, Zhang Y, Sukhova GK, Zhang J, et al. Deficiency of antigen-presenting cell invariant chain reduces atherosclerosis in mice. *Circulation.* 2010;122(8):808-20.
115. Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J, et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med.* 2006;12(2):178-80.
116. Ye Y, Yang X, Zhao X, Chen L, Xie H, Zeng Y, et al. Serum chemokine CCL17/thymus activation and regulated chemokine is correlated with coronary artery diseases. *Atherosclerosis.* 2015;238(2):365-9.
117. Cho HJ, Shashkin P, Gleissner CA, Dunson D, Jain N, Lee JK, et al. Induction of dendritic cell-like phenotype in macrophages during foam cell formation. *Physiol Genomics.* 2007;29(2):149-60.
118. Lindquist RL, Shakhar G, Dudziak D, Wardemann H, Eisenreich T, Dustin ML, et al. Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nature immunology.* 2004;5(12):1243-50.
119. Paigen B, Holmes PA, Mitchell D, Albee D. Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H. *Atherosclerosis.* 1987;64(2-3):215-21.
120. Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, Burns DK. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest.* 1994;93(5):1885-93.
121. Brasel K, De Smedt T, Smith JL, Maliszewski CR. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood.* 2000;96(9):3029-39.
122. Wang Y, Goulart RA, Pantanowitz L. Oil red O staining in cytopathology. *Diagn Cytopathol.* 2011;39(4):272-3.
123. Lin Y, Bai L, Chen Y, Zhu N, Bai Y, Li Q, et al. Practical assessment of the quantification of atherosclerotic lesions in apoE^{-/-} mice. *Mol Med Rep.* 2015;12(4):5298-306.
124. Odell ID, Cook D. Immunofluorescence techniques. *J Invest Dermatol.* 2013;133(1):e4.
125. Galkina E, Kadh A, Sanders J, Varughese D, Sarembock IJ, Ley K. Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent. *J Exp Med.* 2006;203(5):1273-82.
126. Macritchie N, Grassia G, Sabir SR, Maddaluno M, Welsh P, Sattar N, et al. Plasmacytoid dendritic cells play a key role in promoting atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(11):2569-79.
127. Iqbal AJ, McNeill E, Kapellos TS, Regan-Komito D, Norman S, Burd S, et al. Human CD68 promoter GFP transgenic mice allow analysis of monocyte to macrophage differentiation in vivo. *Blood.* 2014;124(15):e33-44.

128. Lahoud MH, Proietto AI, Gartlan KH, Kitsoulis S, Curtis J, Wettenhall J, et al. Signal regulatory protein molecules are differentially expressed by CD8- dendritic cells. *J Immunol.* 2006;177(1):372-82.
129. Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. *Trends Cell Biol.* 2009;19(2):72-80.
130. Langlet C, Tamoutounour S, Henri S, Luche H, Ardouin L, Grégoire C, et al. CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J Immunol.* 2012;188(4):1751-60.
131. Landsman L, Bar-On L, Zerneck A, Kim KW, Krauthgamer R, Shagdarsuren E, et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood.* 2009;113(4):963-72.
132. Rowinska Z, Koeppel TA, Sanati M, Schelzig H, Jankowski J, Weber C, et al. Role of the CX3C chemokine receptor CX3CR1 in the pathogenesis of atherosclerosis after aortic transplantation. *PLoS One.* 2017;12(2):e0170644.
133. Liu X, Lu G, Shen J. Silencing CX3CR1 production modulates the interaction between dendritic and endothelial cells. *Mol Biol Rep.* 2011;38(1):481-8.
134. Sutti S, Bruzzi S, Heymann F, Liepelt A, Krenkel O, Toscani A, et al. CX(3)CR1 Mediates the Development of Monocyte-Derived Dendritic Cells during Hepatic Inflammation. *Cells.* 2019;8(9).
135. Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity.* 2014;40(5):642-56.
136. Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, Randolph GJ. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(6):453-60.
137. Wu H, Gower RM, Wang H, Perrard XY, Ma R, Bullard DC, et al. Functional role of CD11c+ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia. *Circulation.* 2009;119(20):2708-17.
138. Gower RM, Wu H, Foster GA, Devaraj S, Jialal I, Ballantyne CM, et al. CD11c/CD18 expression is upregulated on blood monocytes during hypertriglyceridemia and enhances adhesion to vascular cell adhesion molecule-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(1):160-6.
139. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rössner S, Koch F, Romani N, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods.* 1999;223(1):77-92.
140. Mayer CT, Ghorbani P, Nandan A, Dudek M, Arnold-Schrauf C, Hesse C, et al. Selective and efficient generation of functional Batf3-dependent CD103+ dendritic cells from mouse bone marrow. *Blood.* 2014;124(20):3081-91.
141. Johansson-Lindbom B, Svensson M, Pabst O, Palmqvist C, Marquez G, Förster R, et al. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med.* 2005;202(8):1063-73.
142. Brawand P, Fitzpatrick DR, Greenfield BW, Brasel K, Maliszewski CR, De Smedt T. Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J Immunol.* 2002;169(12):6711-9.

143. Hanna RN, Shaked I, Hubbeling HG, Punt JA, Wu R, Herrley E, et al. NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis. *Circ Res.* 2012;110(3):416-27.
144. Soehnlein O, Weber C. Myeloid cells in atherosclerosis: initiators and decision shapers. *Semin Immunopathol.* 2009;31(1):35-47.
145. Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(7):1506-16.
146. Bobryshev YV, Lord RS. Detection of vascular dendritic cells accumulating calcified deposits in their cytoplasm. *Tissue Cell.* 1998;30(3):383-8.
147. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol.* 2009;27:165-97.
148. Gil-Pulido J, Zernecke A. Antigen-presenting dendritic cells in atherosclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2017;816:25-31.
149. Barclay AN, Van den Berg TK. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRP α) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:25-50.
150. Adams S, van der Laan LJ, Vernon-Wilson E, Renardel de Lavalette C, Döpp EA, Dijkstra CD, et al. Signal-regulatory protein is selectively expressed by myeloid and neuronal cells. *J Immunol.* 1998;161(4):1853-9.
151. Fortin G, Raymond M, Van VQ, Rubio M, Gautier P, Sarfati M, et al. A role for CD47 in the development of experimental colitis mediated by SIRP α +CD103-dendritic cells. *J Exp Med.* 2009;206(9):1995-2011.
152. Baba N, Van VQ, Wakahara K, Rubio M, Fortin G, Panzini B, et al. CD47 fusion protein targets CD172a+ cells in Crohn's disease and dampens the production of IL-1 β and TNF. *J Exp Med.* 2013;210(6):1251-63.
153. Coombes JL, Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(6):435-46.
154. Raymond M, Rubio M, Fortin G, Shalaby KH, Hammad H, Lambrecht BN, et al. Selective control of SIRP- α -positive airway dendritic cell trafficking through CD47 is critical for the development of T(H)2-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(6):1333-42.e1.
155. Bobryshev YV, Taksir T, Lord RS, Freeman MW. Evidence that dendritic cells infiltrate atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Histol Histopathol.* 2001;16(3):801-8.
156. Cheong C, Choi JH. Dendritic cells and regulatory T cells in atherosclerosis. *Mol Cells.* 2012;34(4):341-7.
157. Tamoutounour S, Guilliams M, Montanana Sanchis F, Liu H, Terhorst D, Malosse C, et al. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity.* 2013;39(5):925-38.
158. Min J, Yang D, Kim M, Haam K, Yoo A, Choi JH, et al. Inflammation induces two types of inflammatory dendritic cells in inflamed lymph nodes. *Exp Mol Med.* 2018;50(3):e458.

159. Nakano H, Lyons-Cohen MR, Whitehead GS, Nakano K, Cook DN. Distinct functions of CXCR4, CCR2, and CX3CR1 direct dendritic cell precursors from the bone marrow to the lung. *J Leukoc Biol.* 2017;101(5):1143-53.
160. Liu P, Patil S, Rojas M, Fong AM, Smyth SS, Patel DD. CX3CR1 deficiency confers protection from intimal hyperplasia after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(9):2056-62.
161. Singh-Jasuja H, Thiolat A, Ribon M, Boissier MC, Bessis N, Rammensee HG, et al. The mouse dendritic cell marker CD11c is down-regulated upon cell activation through Toll-like receptor triggering. *Immunobiology.* 2013;218(1):28-39.
162. Winkels H, Ehinger E, Vassallo M, Buscher K, Dinh HQ, Kobiyama K, et al. Atlas of the Immune Cell Repertoire in Mouse Atherosclerosis Defined by Single-Cell RNA-Sequencing and Mass Cytometry. *Circ Res.* 2018;122(12):1675-88.

10 Abbildungsverzeichnis

1. Abb. 1: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von DCs, die aus peripheren lymphoiden Organen der Maus (A) Milz, (B) Lymphknoten.

Quelle: (6).....9

2. Abb.2: Der Ursprung und die Entwicklung von Dendritischen Zellen

Im Knochenmark entstehen aus den CD34+ multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC) der *common lymphoid progenitor* (CLP) sowie der *common myeloid progenitor* (CMP), (20, 21). Ein Teil der CMP-Population reift zu einem gemeinsamen Vorläufer für Monozyten Makrophagen und DCs, dem „macrophage-DC-progenitor“ (MDP) der als direkter Vorläufer des „common DC progenitor“ (CDP) angesehen wird. CDPs bilden den ersten „DC-exklusive-Vorläufer“ und reifen im Knochenmark zu plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDCs) und zu sogenannten „pre-DCs (25, 32, 33).

Quelle: modifiziert nach (35).....13

3. Abb.3: Entwicklung von Arteriosklerose.

Die fortgeschrittene fibroatheromatöse Plaque bildet durch die Apoptose von Makrophagen und anderen Plaquezellen einen nekrotischer Kern, der von einer fibrösen Kappe aus Kollagen bedeckt ist, die aus Matrix und einer Schicht aus glatten Muskelzellen besteht (78-80). Innerhalb der Plaque und von der Adventitia aus kann es zur Neovaskularisation kommen, und die Undichtigkeit der fragilen Gefäßen kann zu einer Plaque-Blutung führen.

Quelle: modifiziert nach(83).....21

- 4. Abb.4: Immunfluoreszenzaufnahmen der Aortenwurzel bei gesunden ApoE^{-/-}CD11c^{YFP}reporter Mäusen**
- Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt. Das Bild B zeigt die Übereinanderlagerung der YFP-Aufnahme mit der DAPI-Aufnahme. Die weißen Pfeile markieren CD11c⁺ grüne Zellen Thilo Westhofen und Martin Busch.....45
- 5. Abb.5: Immunfluoreszenzaufnahmen der Aortenwurzel (A,B), der Arteria brachiocephalica (C,D) und des Aortenbogens (E,F) bei arteriosklerotischen ApoE^{-/-}CD11c^{YFP}reporter Mäusen**
- Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt. Die Bilder Bild B, D, F zeigen jeweils die Übereinanderlagerung der YFP-Aufnahme mit der DAPI-Aufnahme. Die weißen Pfeile markieren CD11c⁺ grüne Zellen. Die ApoE^{-/-}CD11c^{YFP}reporter Mäuse waren 6 Wochen unter *high-fat* Diät Thilo Westhofen und Martin Busch.....46
- 6. Abb.6: Gating-Strategie zur Identifizierung der DC-Subsets aus Flt3L-Kulturen**
- Repräsentative *pseudocolour* FACS Plots. CD11c⁺MHCII⁺ Zellen wurden als DCs identifiziert und gemäß CD103-, CD11b- und F4/80- Expression weiter unterteilt Thilo Westhofen.....48
- 7. Abb.7: Gating-Strategie zur Identifizierung der DC-Subsets in der Aorta**
- Repräsentative contour FACS Plots zur Identifizierung einzelner aortaler DC-Subsets bei gesunden C57BL/6-Mäusen, und bei, Ldlr^{-/-}Mäusen unter normaler- oder *high-fat* Diät. Nach Ausschluss von TCRb⁺/CD19⁺ T and B Zellen wurden CD11c⁺MHCII⁺ Zellen als DCs identifiziert und gemäß CD103-, CD11b- und F4/80- Expression weiter unterteilt Thilo Westhofen und Martin Busch.....50

8. Abb.8: Quantifizierung von DCs(B), Makrophagen(A) und der einzelnen DC-Subsets(C-F) in der Aorta

Darstellung der mittleren Zellzahl mit Standardabweichung. Durchflusszytometrische Messung der Aorta von C57BL/6J Mäusen und Ldlr^{-/-} Mäusen unter normaler Diät und Ldlr^{-/-} Mäusen nach 6 bzw. 12 Wochen *high-fat* Diät. Gepoolte Auswertung von 2-3 Aorten pro Experiment; n = 6–9 Mäuse pro Gruppe; statistisch signifikante Unterschiede (p<0.05) mit * gekennzeichnet. Thilo Westhofen und Martin Busch52

9. Abb.9: Prozentuale Anteil der einzelnen DC-Subsets in der Aorta

Darstellung der mittleren prozentualen Anteile der einzelnen DC-Subsets gemessen an der Gesamtpopulation der DCs inkl. Standardabweichung. Durchflusszytometrische Messung der Aorta von C57BL/6J Mäusen und Ldlr^{-/-} Mäusen unter normaler Diät und Ldlr^{-/-} Mäusen nach 6 bzw. 12 Wochen *high-fat* Diät. Gepoolte Auswertung von 2-3 Aorten pro Experiment; n = 6–9 Mäuse pro Gruppe; statistisch signifikante Unterschiede (p<0.05) mit * gekennzeichnet Experimentator: Thilo Westhofen und Martin Busch.....53

10. Abb.10: Immunfluoreszenzaufnahmen(A-C) und Oil-red-O-Färbung(D) der Aortenwurzel bei arteriosklerotischen Ldlr^{-/-} Mäusen

Ko-Immunfluoreszenzfärbungen mit CD11c(A), F4/80(B) und Overlay aus CD11c⁺F4/80⁺ Zellkerne mit DAPI gefärbt(C). Die weißen Pfeilköpfe markieren CD11c⁺ Zellen, die dünnen Pfeile markieren F4/80⁺ Zellen, die dicken Pfeile markieren doppelt positive CD11c⁺ F4/80⁺ Zellen.

Die Färbung wurde an repräsentativen Kryo-Schnitten der Aortenwurzel von Ldlr^{-/-} Mäusen nach 12 Wochen *high-fat* Diät durchgeführt. Die Oil-red-O-Färbung wurde zur Darstellung von Lipiden angewendet.

Experimentator: Thilo Westhofen und Miriam Koch.....	55
--	----

11. Abb.11: Immunfluoreszenzaufnahmen(A-C) und Oil-red-O-Färbung(D) der Aortenwurzel bei arteriosklerotischen Ldlr^{-/-} Mäusen

Ko-Immunfluoreszenzfärbungen mit CD11c(A), CD68(B) und Overlay aus CD11c+CD68+Zellkerne mit DAPI gefärbt(C). Die weißen Pfeilköpfe markieren CD11c⁺ Zellen, die dünnen Pfeile markieren CD68⁺ Zellen, die dicken Pfeile markieren doppelt positive CD11c⁺ CD68⁺ Zellen.

Die Färbung wurde an repräsentativen Kryo-Schnitten der Aortenwurzel von Ldlr^{-/-} Mäusen nach 12 Wochen *high-fat* Diät durchgeführt. Die Oil-red-O-Färbung wurde zur Darstellung von Lipiden angewendet.

Experimentator: Thilo Westhofen und Miriam Koch.....	57
--	----

12. Abb.12: Expression von Sirpα der einzelnen DC-Subsets und der Makrophagen in der Aorta

Darstellung der Sirpα-Expression bei Ldlr^{-/-} Mäusen unter normaler Diät und nach 12 Wochen *high-fat* Diät. Gepoolte Auswertung von 2-3 Aorten pro Experiment, Histogramme der einzelnen Subsets jeweils repräsentativ für n=6-9 Mäuse pro Gruppe Experimentator: Thilo Westhofen und Martin Busch.....

Busch.....	59
------------	----

13. Abb. 13: Expression von Flt3 der einzelnen DC-Subsets und der Makrophagen in der Aorta

Darstellung der Flt3-Expression bei Ldlr^{-/-} Mäusen nach 6 Wochen *high-fat* Diät. Gepoolte Auswertung von 2-3 Aorten pro Experiment, Histogramme der einzelnen Subsets jeweils repräsentativ für n=9 Mäuse pro Gruppe

Experimentator: Thilo Westhofen und Martin Busch.....	60
---	----

14. Abb.14: Quantifizierung der einzelnen DC-Subsets in der Aorta von Flt3L^{-/-} Mäusen

(A) Repräsentative contour FACS Plots zur Identifizierung einzelner aortaler DC-Subsets

(B) Darstellung der mittleren Zellzahl mit Standardabweichung aortaler Makrophagen und der einzelnen DC Subsets. Gepoolte Auswertung von n=6 Mäusen Experimentator: Thilo Westhofen und Martin Busch.....62

15. Abb.15: Expression von CD64 der einzelnen DC-Subsets und der Makrophagen in der Aorta

Darstellung der CD64-Expression bei Ldlr^{-/-} Mäusen unter normaler Diät und nach 12 Wochen *high-fat* Diät. Gepoolte Auswertung von 2-3 Aorten pro Experiment, Histogramme der einzelnen Subsets jeweils repräsentativ für n=6-9 Mäuse pro Gruppe Experimentator: Thilo Westhofen und Martin Busch.....64

16. Abb.16: Expression von CX₃CR1 der einzelnen DC-Subsets und der Makrophagen in der Aorta

Darstellung der CX₃CR1-Expression bei ApoE^{-/-}CX₃CR1^{GFP}reporter Mäusen Mäusen unter normaler Diät und nach 12 Wochen *high-fat* Diät. Histogramme der einzelnen Subsets aus gepoolter Auswertung von 3-6 Aorten Experimentator: Thilo Westhofen.....65

17. Abb.17: Immunfluoreszenzaufnahmen der Aortenwurzel bei arteriosklerotischen ApoE^{-/-}CX₃CR1^{GFP}reporter Mäusen

Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (B,E). Die Bilder C und F zeigen jeweils die Übereinanderlagerung der GFP-Aufnahme mit der DAPI-Aufnahme. Die weißen Pfeile markieren CX₃CR1⁺grüne Zellen. Die ApoE^{-/-}

CX₃CR1^{GFP}reporter Mäuse waren 12 Wochen unter *high-fat* Diät
Experimentator: Thilo Westhofen.....67

11 Zugrundeliegende Originalarbeit *Dendritic Cell Subset
Distributions in the Aorta in Healthy and Atherosclerotic Mice*

Dendritic Cell Subset Distributions in the Aorta in Healthy and Atherosclerotic Mice

Martin Busch¹*, Thilo C. Westhofen¹*, Miriam Koch^{1,2}*, Manfred B. Lutz³, Alma Zernecke^{2,4*}

1 Rudolf Virchow Center; University of Würzburg, Würzburg, Germany, **2** Institute of Clinical Biochemistry and Pathobiocchemistry, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany, **3** Institute of Virology and Immunobiology, University of Würzburg, Würzburg, Germany, **4** Department of Vascular Surgery, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Munich, Germany

Abstract

Dendritic cells (DCs) can be sub-divided into various subsets that play specialized roles in priming of adaptive immune responses. Atherosclerosis is regarded as a chronic inflammatory disease of the vessel wall and DCs can be found in non-inflamed and diseased arteries. We here performed a systematic analyses of DCs subsets during atherogenesis. Our data indicate that distinct DC subsets can be localized in the vessel wall. In C57BL/6 and low density lipoprotein receptor-deficient (*Ldlr*^{-/-}) mice, CD11c⁺ MHCII⁺ DCs could be discriminated into CD103⁺ CD11b⁺F4/80⁺, CD11b⁺F4/80⁺ and CD11b⁻ F4/80⁺ DCs and CD103⁺ CD11b⁻ F4/80⁺ DCs. Except for CD103⁺ CD11b⁻ F4/80⁺ DCs, these subsets expanded in high fat diet-fed *Ldlr*^{-/-} mice. Signal-regulatory protein (Srp)- α was detected on aortic macrophages, CD11b⁺ DCs, and partially on CD103⁺ CD11b⁻ F4/80⁺ but not on CD103⁺ DCs. Notably, in FMS-like tyrosine kinase 3-ligand-deficient (*Flt3l*^{-/-}) mice, a specific loss of CD103⁺ DCs but also CD103⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ DCs was evidenced. Aortic CD103⁺ and CD11b⁺ F4/80⁺ CD103⁺ DCs may thus belong to conventional rather than monocyte-derived DCs, given their dependence on Flt3L-signalling. CD64, postulated to distinguish macrophages from DCs, could not be detected on DC subsets under physiological conditions, but appeared in a fraction of CD103⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ and CD11b⁺ F4/80⁺ cells in atherosclerotic *Ldlr*^{-/-} mice. The emergence of CD64 expression in atherosclerosis may indicate that CD11b⁺ F4/80⁺ DCs similar to CD11b⁺ F4/80⁺ DCs are at least in part derived from immigrated monocytes during atherosclerotic lesion formation. Our data advance our knowledge about the presence of distinct DC subsets and their accumulation characteristics in atherosclerosis, and may help to assist in future studies aiming at specific DC-based therapeutic strategies for the treatment of chronic vascular inflammation.

Citation: Busch M, Westhofen TC, Koch M, Lutz MB, Zernecke A (2014) Dendritic Cell Subset Distributions in the Aorta in Healthy and Atherosclerotic Mice. PLoS ONE 9(2): e88452. doi:10.1371/journal.pone.0088452

Editor: Lucia Gabriele, Istituto Superiore di Sanità, Italy

Received: March 26, 2013; **Accepted:** January 10, 2014; **Published:** February 14, 2014

Copyright: © 2014 Busch et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR809, ZE827/1 2 and ZE827/4 1, SFB688 TPA12) to AZ. The authors have no conflicting financial interests. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E mail: alma.zernecke@uni-wuerzburg.de

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Atherosclerosis is regarded as a chronic inflammatory disease of the vessel wall [1]. Both macrophages and dendritic cells (DCs) can be found in non inflamed steady state aortae and accumulate in atherosclerotic lesions [1–6]. While DCs in the intima are important in initial lesion formation by uptake of lipids and their transformation into foam cell like cells [7], evidence is accumulating that DCs are also critical in shaping adaptive immune responses in atherosclerosis [1,5,6,8–10]. For instance, two DC subsets with distinct functions in controlling regulatory T cell homeostasis and atherosclerotic lesion formation have been revealed [1,10].

DCs can be sub divided into various subsets that play specialized roles in priming of adaptive immune responses [11]. However, although CD11c is commonly accepted as a pan DC marker, a clear identification of DCs is still limited by the lack of unambiguous surface markers. In particular, the discrimination of DCs from macrophages that share many markers and functions remains challenging. Recently, aortic CD11c⁺MHCII⁺ DCs were discriminated from CD11c⁺ MHCII⁺ macrophages by their low

phagocytic activity but strong immune stimulatory capacities, and subdivided into CD11b⁺ F4/80⁺, CD11b⁻ F4/80⁺ as well as CD103⁺ subsets [10]. A systematic analysis of the presence of these subsets and their accumulation in the course of lesion development, however, has not yet been performed. Although it remains to be determined if these cell subsets denominated as DCs and macrophages represent true lineage subsets with distinct transcriptional profiles, we here have adopted and refined the gating strategy applied by Choi *et al.* and others and used the term DCs when describing cells that express CD11c, and macrophages for CD11c⁻ cells [6,10,12,13]; we have characterized and quantified these cell subsets in C57BL/6 mice and atherosclerosis prone mice fed a high fat diet. Furthermore, we applied novel surface markers to characterize these cell subsets during atherogenesis.

Materials and Methods

Mouse Models

CD11c YFP reporter mice [14] were provided by M. Nussenzweig (Rockefeller University, New York, New York, USA). Apolipoprotein E deficient (*ApoE*^{-/-}) mice, low density

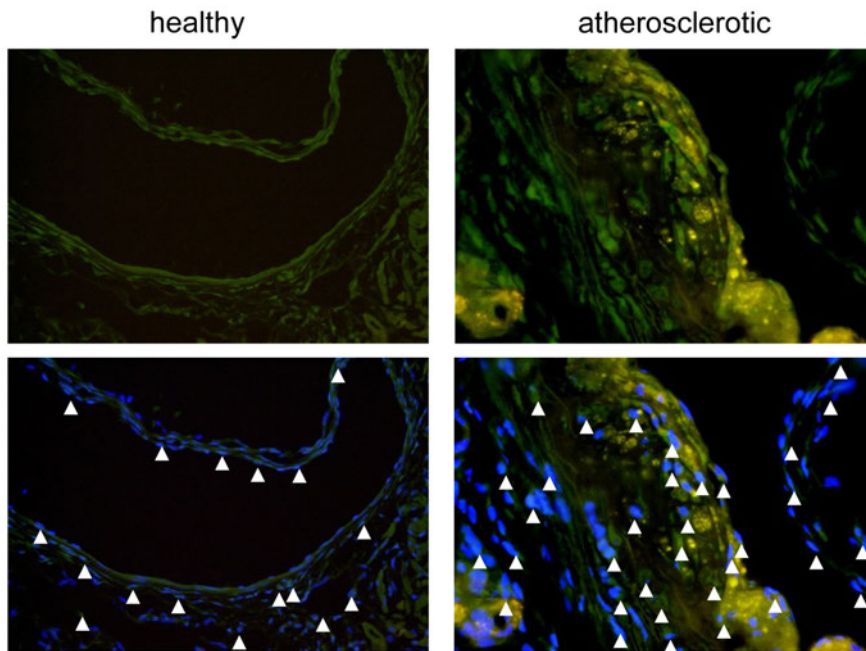


Figure 1. Localization of CD11c⁺ cells in the aortic root. (A) Aortic root sections of healthy and atherosclerotic *apoE*^{-/-} CD11c YFP mice (arrow heads indicate CD11c⁺ cells, green). Nuclei are counterstained with DAPI (blue; scale bars, 50 μ m). doi:10.1371/journal.pone.0088452.g001

lipoprotein receptor deficient (*Ldlr*^{-/-}) mice and C57BL/6J mice were obtained from the Jackson laboratory. Fms related tyrosine kinase 3 ligand (*Flt3l*^{-/-}) mice were obtained from Taconic. CD11c YFP mice were crossed with *ApoE*^{-/-} mice. Female mice were kept on a normal chow, or placed on a Western diet at 10–12 weeks of age for 6 or 12 weeks. Experiments were approved by local authorities and complied with German animal protection law. This study was carried out in accordance with the with German animal protection law, approved by the Regierung von Unterfranken, Würzburg, Germany (permit number 44/10).

Enzymatic Tissue Digestion and Flow Cytometry

For FACS analysis, aortae were flushed with PBS, excised, carefully cleaned of all perivascular fat, and enzymatically digested with liberase TL (Roche) for 30 minutes at 37°C in RPMI 1640 (Life Technologies). Fc receptors were blocked with CD16/CD32 (clone 93) antibodies (eBioscience) in PBS supplemented with 2% mouse serum, 2% rabbit serum and 0.2% BSA prior to fluorescent labeling. Staining for flow cytometric analysis included fluorescently labeled antibodies against CD11c (PE Cy7/AlexaFluor 488, clone N418), CD11b (AmCyan, clone M170), NK1.1 (PE Cy7, clone PK136), CD103 (PE/APC, clone 2E7), SIRP α (FITC, clone P84), MHCII (eFlour450, clone M5/114.15.2), TCR β (PerCP Cy5.5, clone H57 597), F4/80 (APC/PacBlue, clone BM8), PDCA (PE, clone eBio927) (eBioscience), CD19 (PerCP Cy5.5, clone 1D3), CD45 (APC Cy7, clone 30 F11), MHCII (FITC, clone 2G9) (BD Biosciences) and CD64 (APC, clone X54 5/7.1) (BioLegends) in HBSS with 0.3 mM EDTA and 0.1% BSA. Samples were analyzed using a FACSCanto II (BD Biosciences) and FlowJo software (Tree Star).

Tissue Sections and Immunofluorescence Staining

The heart and aortae were perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS, embedded in Tissue Tek and processed in 5 μ m serial cryosections. Slides were mounted and nuclei were

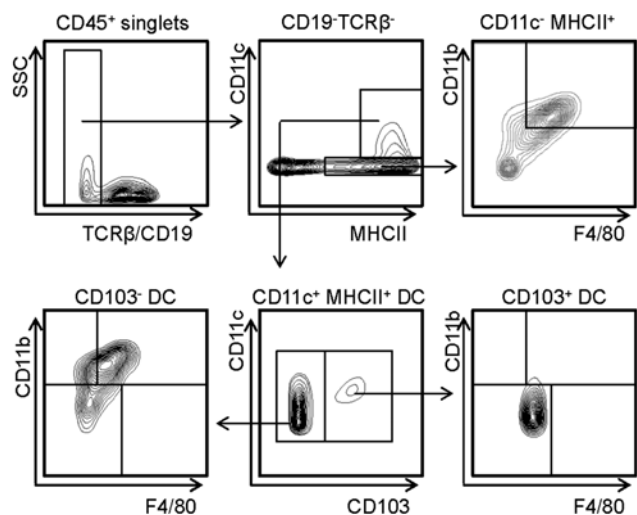


Figure 2. Identification of DC subsets in the aorta. Representative FACS plots for identification of DC subsets in healthy, chow fed *Ldlr*^{-/-} mice. After exclusion of TCR β ⁺/CD19⁺ T and B cells, CD11c⁺ MHCII⁺ DCs were further subdivided into CD103⁺ and CD103⁻ DCs. CD103⁺ DCs do not express CD11b or F4/80 while CD103⁻ DCs were further subdivided into CD11b⁺ F4/80⁻, CD11b⁺ F4/80⁺ and CD11b⁻ F4/80⁺ DCs. Macrophages were defined as CD11c⁺ MHCII⁺ CD11b⁺ F4/80⁺. Representative contour plots from 6–9 mice per group are shown. doi:10.1371/journal.pone.0088452.g002

counterstained with 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector laboratories). CD11c, F4/80 or CD68 staining was performed on cryosections of the aortic root using biotin labeled anti-CD11c (Biolegend, clone N418), anti-CD68 (AbD Serotec, clone FA11) or anti-F4/80 (AbD Serotec, clone CI:A3.1) antibodies, detected by Alexa Fluor 555 Streptavidin (Molecular probes, Life Tech

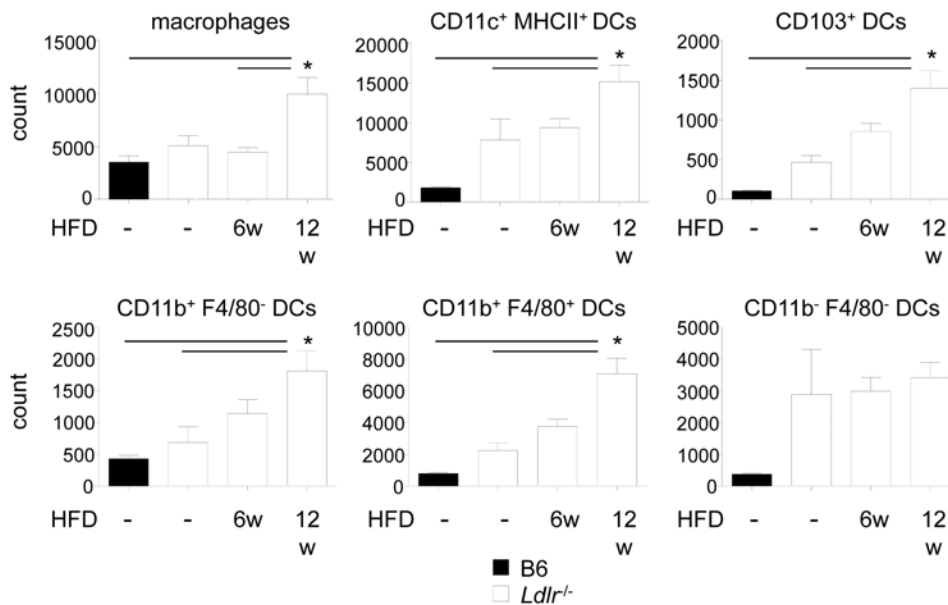


Figure 3. Quantification of aortic DC subsets. Aortic DC and macrophage numbers were quantified in the aorta of C57BL/6J and *Ldlr*^{-/-} mice fed a normal chow, or in *Ldlr*^{-/-} mice after 6 or 12 weeks of high fat diet feeding by flow cytometry (n=6–9 mice per group; data were obtained by pooling 2–3 aortae per experiment and then calculating the average number of cells per mouse and aorta, and represent 6–9 independent experiments). Data represent mean±SEM. **P*<0.05. doi:10.1371/journal.pone.0088452.g003

nologies), Alexa Fluor 488 anti rat IgG (Molecular probes, Life Technologies) or biotinylated anti rat antibody and Alexa Fluor 488 Streptavidin (Molecular probes, Life Technologies) respectively. Images were recorded using a Leica DMLB fluorescence microscope.

Statistics

Data represent mean±SEM and were analyzed by Student's *t* test, ANOVA with Dunnett's multiple comparison test (Prism 5.02 software, GraphPad), as appropriate. Differences where *P*<0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Localization of CD11c⁺ Cells

Employing CD11c YFP reporter mice, we used immunofluorescence microscopy to localize CD11c⁺ cells in chow fed healthy as well as atherosclerotic apolipoprotein E deficient (*apoE*^{-/-}) mice. CD11c⁺ cells could be detected in the intima, adventitia, and within the valves in the aortic sinus in CD11c YFP reporter mice, in line with previous findings [4,6,15,16] (Figure 1). In atherosclerotic CD11c YFP *apoE*^{-/-} mice, numerous CD11c⁺ cells were detectable throughout the intima with a preference to luminal plaque regions and the adventitia in the aortic sinus (Figure 1); in the aorta, in particular in regions of the aortic arch but also in thoracic and abdominal segments, and in the innominate artery, we similarly observed CD11c⁺ cells within plaques, whereas CD11c⁺ cells could only rarely be found in the adventitia in these regions (Figure S1, and not shown).

Identification and Quantification of Distinct Aortic DC Subsets

To phenotypically characterize and quantify DC subsets in healthy and atherosclerotic arteries, enzymatically digested aortae were subjected to multicolour flow cytometry. After exclusion of

CD19⁺ and TCRβ⁺ B and T cells, respectively, DCs were identified as CD11c⁺ MHCII⁺ cells within CD45⁺ leukocytes [6,10,12,13] in C57BL/6 mice (not shown) and chow fed low density lipoprotein receptor deficient (*Ldlr*^{-/-}) mice (Figure 2). Whereas the majority of aortic CD11c⁺ MHCII⁺ DCs showed no staining for E cadherin ligand CD103, a small CD103⁺ DC population could be confined. This subset displayed no expression of CD11b or F4/80 (Figure 2), in line with previous data [10]. In contrast, the CD103⁻ fraction of aortic DCs could further be subdivided into a large population of CD11c⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ DCs and a less abundant CD11c⁺ CD11b⁺ F4/80⁻ subset, as described previously [10], but also CD11c⁺ CD11b⁻ F4/80⁻ cells (Figure 2). Within the subset of CD11c⁺ CD11b⁻ F4/80⁻ cells we were able to identify sporadic CD11c^{lo} CD11b⁻ PDCA⁺ cells, in line with the presence of few plasmacytoid DCs (pDCs) [17,18]. Due to their low numbers (125±42 pDCs per aorta, amounting to approximately 1.6% of CD11c⁺ MHCII⁺ DCs), we refrained from further studying this DC subset in subsequent analyses in this study. All DC subsets were negative for expression of the NK/NKT cell marker NK1.1 (data not shown). In line with previous gating strategies [10], CD11c⁺ MHCII⁺ cells that co stained for CD11b and F4/80 were denominated as macrophages (Figure 2).

To assess the kinetics of the accumulation of these cell subpopulations during atherogenesis, we compared aortic digests of C57BL/6 mice with *Ldlr*^{-/-} mice fed a normal chow and *Ldlr*^{-/-} mice fed a high fat diet (HFD) for 6 and 12 weeks. In line with the presence of these cell types in healthy mice [3,4,6,16], numerous macrophages and also DCs could already be identified in C57BL/6 mice (Figure 3). *Ldlr*^{-/-} mice on normal chow displayed a non significant trend towards elevated numbers of DCs when compared to C57BL/6 mice. With the duration of diet, DC numbers significantly increased in *Ldlr*^{-/-} mice (Figure 3). While the subpopulations of CD11c⁺ CD103⁺ and CD11c⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ DCs showed the most marked expansion among all DC subsets, the smaller population of CD11c⁺ CD11b⁺ F4/80⁻ DCs showed a less dramatic increase. CD11c⁺ CD11b⁻ F4/80⁻ DCs showed a less dramatic increase.

80 DCs did not contribute to the increase in DC numbers with diet. Analysis of the frequencies of distinct DCs subsets among all DCs showed a slight but non significant expansion of CD11c⁺CD103⁺ DCs, whereas relative numbers of CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺ DCs decreased in *Ldlr*^{-/-} mice fed a HFD for 12 weeks compared to C57BL/6 mice; percentages among all other DC subsets showed no alterations in the course of atherosclerotic lesion development (Figure S2).

To further validate data obtained by flow cytometry, co immunofluorescence staining for CD11c and F4/80, as well as CD11c and CD68 were performed in sections of the aortic root of *Ldlr*^{-/-} mice fed a HFD for 12 weeks. As expected, we were able to identify cells positive for CD11c or F4/80 only, but also double positive CD11c⁺F4/80⁺ cells, in line with the presence of CD11c⁺F4/80⁺ and CD11c⁺F4/80⁻ DCs, as well as CD11c⁻F4/80⁺ macrophages, furthermore supporting our findings from flow cytometry (Figure 4). Similar results were obtained for CD11c and CD68 (Figure S3). In line with published data that also CD11c⁺ cells can take on a foam cell like appearance upon the engulfment of lipids similar to macrophages [6,7], no clear further discrimination into different cell populations was possible based on staining for lipids by Oil red O.

Characterization of Aortic DC Subsets

The signal regulatory protein (Sirp) α , a transmembrane receptor with functions in cell migration and phagocytosis, was

recently described to be expressed on CD11b⁺ DCs and monocytes/macrophages [11,19–21]. Its expression had not been investigated in aortic macrophages and DCs. We here demonstrate that CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺ and CD11c⁺CD11b⁻F4/80⁺ DCs express SIRP α , similarly to CD11c⁺MHCII⁺F4/80⁺ macrophages, whereas CD11c⁺CD11b⁻F4/80⁻ DCs display intermediate levels; CD11c⁺CD103⁺ DCs do not express SIRP α (Figure 5). No differences in SIRP α expression were noted between chow fed C57BL/6 and *Ldlr*^{-/-} mice or HFD fed *Ldlr*^{-/-} mice (not shown, and Figure 5).

The discrimination of monocytes/macrophages from DCs remains controversial. In the aorta, Choi *et al.* distinguished these cell types by functional criteria, i.e. phagocytic *versus* immune stimulatory capacities [10]. Moreover, CD11c⁺F4/80⁺CD11b⁺ macrophages were shown to depend on hematopoietin M-CSF, in line with a monocytic origin, whereas DCs were of two types, with CD11b⁺F4/80⁺ DCs being M-CSF but CD103⁺ DCs being FMS-like tyrosine kinase 3 (Flt3) dependent, as revealed by analysing *op/op* and *Flt3*^{-/-} mice on normal chow, respectively [10]. We analyzed aortic DC distributions in *Flt3l*^{-/-} mice. Similar to findings in *Flt3*^{-/-} mice [10], we observed a trend towards reduced total CD11c⁺MHCII⁺ DC counts in *Flt3l*^{-/-} compared to C57BL/6 mice (999 \pm 287 *vs.* 1827 \pm 137 cells per aorta, respectively; n = 3 independent experiments; n.s.) but no changes in CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺ macrophages (2929.0 \pm 763.1 *vs.* 3517.0 \pm 605.3 cell, n.s.). The analysis of individual DC populations

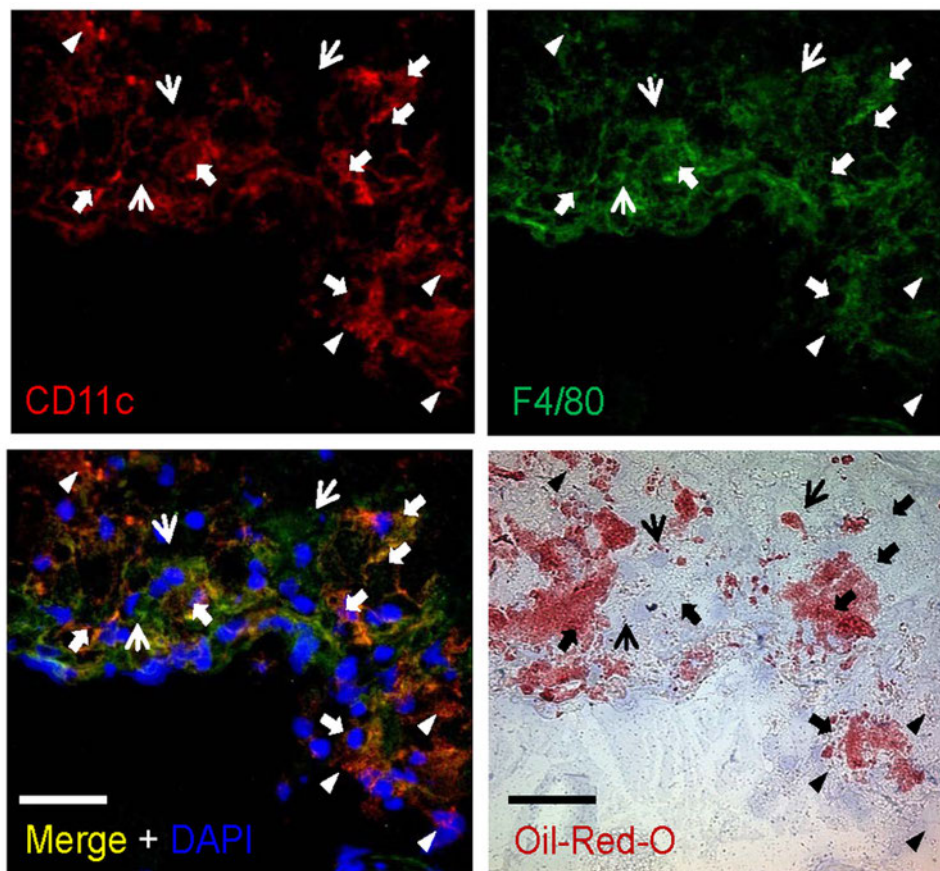


Figure 4. Characterization of aortic DC subsets. Representative co immunofluorescence staining of aortic root sections of *Ldlr*^{-/-} mice fed a high fat diet for 12 weeks, revealing cells showing staining for only CD11c (red, filled arrow heads) or F4/80⁺ (green, narrow arrows) as well as both CD11c and F4/80 (yellow, bold arrows). Nuclei are counterstained with DAPI (blue). Oil red O staining (red) for lipids in adjacent sections. Scale bars, 50 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0088452.g004

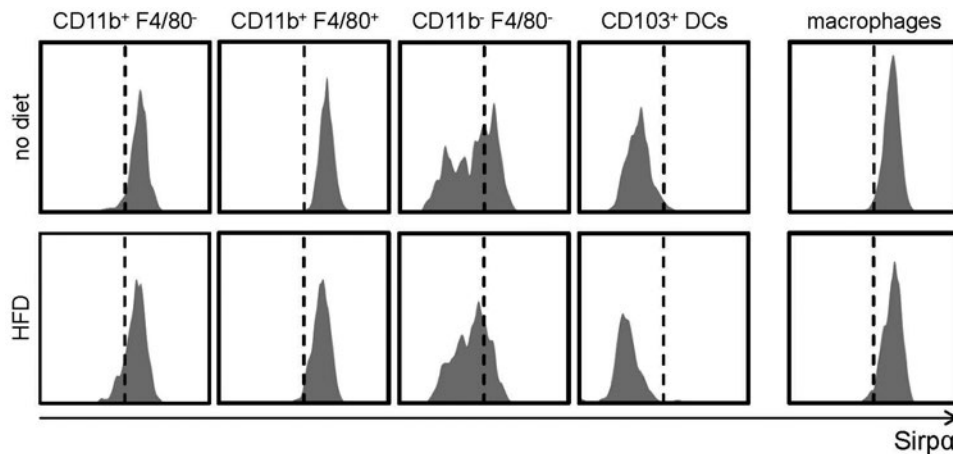


Figure 5. SIRP α expression on aortic DC subsets and macrophages. Representative histograms of the expression of SIRP α on DC subsets and macrophages in the aorta of *Ldlr*^{-/-} mice fed a normal chow or after 12 weeks of high fat diet feeding. Representative histograms from 6–9 mice per group are shown.

doi:10.1371/journal.pone.0088452.g005

revealed no alterations in CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺ DCs (512.2±143.2 vs. 797.2±63.1 cells, n.s.) and CD11c⁺CD11b⁻F4/80⁻ DCs (382.3±95.9 vs. 377.3±36.8 cells, n.s.) in *Flt3l*^{-/-} compared to C57BL/6 mice. Similar to *Flt3*^{-/-} mice, we evidenced a complete absence of CD11c⁺CD103⁺ DCs in *Flt3l*^{-/-} compared to C57BL/6 mice. Notably, we in addition evidenced an almost complete loss of CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁻ DCs in *Flt3l*^{-/-} mice (**Figure S4**). These findings demonstrate that not only aortic CD103⁺ DCs but also CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁻ DCs depend on Flt3/Flt3L signaling under physiological conditions, whereas CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺ and CD11b⁻F4/80⁻ DCs, similar to macrophages, accumulate Flt3L independently in the aorta in healthy mice.

Recent gene expression studies (Immunological Genome project) have revealed the high affinity Fc γ receptor I CD64 as a promising marker to distinguish macrophages from CD11b⁺ DCs [22]. Furthermore, CD64 was shown to be expressed on monocyte derived DCs but not conventional DCs [23,24]. We therefore tested the expression of CD64 on macrophages and on the identified distinct DC subsets. While CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺ macrophages showed uniform staining for CD64 (serving as a positive control), none of the CD11c⁺ MHCII⁺ DC subsets displayed any surface expression of CD64 in C57BL/6 or *Ldlr*^{-/-} mice on normal chow (not shown, **Figure 6**). These findings could suggest that aortic CD11c⁺ subsets are conventional DCs rather than monocyte derived DCs under physiological conditions. In contrast, when analyzing atherosclerotic *Ldlr*^{-/-} mice fed a HFD for 12 weeks, a small fraction of CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁻ DCs, and about half of all CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺ DCs stained positive for CD64, while CD11c⁺CD11b⁻F4/80⁻ DCs and CD11c⁺CD103⁺ DCs remained negative (**Figure 6**). Among all DCs, about 21% of cells stained positive for CD64 under atherogenic conditions (not shown). All macrophages remained CD64⁺ also in atherosclerotic mice (**Figure 6**). These data suggest that predominantly CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺ aortic DC subsets may be of monocytic origin in atherosclerosis.

Discussion

Extending previous studies [6,10,16] we here further refine the characterization of DCs in the aorta. After segregation of CD11c⁺ MHCII⁺ cells, denominated as macrophages [10,12,13], we

further discriminated CD11c⁺ MHCII⁺ ‘DCs’ into a distinct CD103⁺ population, and CD103⁻ DCs that could further be subdivided into CD11b⁻F4/80⁺ and CD11b⁺F4/80⁺ DCs, similar to DC populations defined by gating strategies proposed by others [6,10]. In addition we here were able to describe a CD11b⁻F4/80⁻ DC population. While it was demonstrated that all CD11b⁻F4/80⁻ DCs express CD103 [10], we identified two distinct CD11b⁻F4/80⁻ DC subsets, namely CD11b⁻F4/80⁻CD103⁺ DCs (as previously described by Choi *et al.*), but also CD11b⁻F4/80⁻CD103⁻ DCs. Koltsova *et al.* have previously referred to a subset of CD11c⁺CD11b⁻ DCs in the aorta, which may have overlapped with both CD11b⁻F4/80⁻CD103⁺ and CD11b⁻F4/80⁻CD103⁻ DCs [6]. These aortic DCs were present in healthy and diseased aortae (independent of atherosclerotic lesion formation). While we excluded staining for CD3, CD19, CD103, NK1.1, F4/80, CD11b and CD64, this CD11c⁺ MHCII⁺ DC subset remains to be characterized in more detail in future studies.

In line with its expression on monocytes/macrophages and CD11b⁺ DCs [11,19,20], we here for the first time revealed SIRP α expression primarily on aortic macrophages, CD11b⁺F4/80⁺ and CD11b⁺F4/80⁻ DCs, whereas the newly identified subset of CD11b⁻F4/80⁻CD103⁻ DCs showed partial staining for SIRP α .

Consistent with previous findings, substantially more macrophages than DCs could be detected in non-diseased, healthy vessels, which may primarily localize to the adventitia. In contrast, DCs have been ascribed to accumulate in the intima and in regions predisposed to atherosclerosis in non-diseased mice [3,4,10]. Although it was suggested that intimal DCs may originate from circulating monocytes [4], previous studies lacked DC subset specific analyses, and global gene expression analyses, for example from intimal regions, demonstrated expression of DC and macrophage markers [4]. Choi *et al.* showed that the subset of CD11b⁺F4/80⁺ DCs (but not CD11b⁺F4/80⁻ DCs), similarly to macrophages, strongly depends on M-CSF and expresses CX₃CR1 and CD14 in healthy mice, consistent with a potential monocytic origin. In contrast, only CD103⁺ DCs were identified as true DCs requiring Flt3 for their accumulation in the aorta [10].

None of the CD11c⁺ MHCII⁺ DCs displayed any surface expression of CD64 in healthy mice, postulated as a potentially powerful marker to distinguish macrophages from DCs [22] and

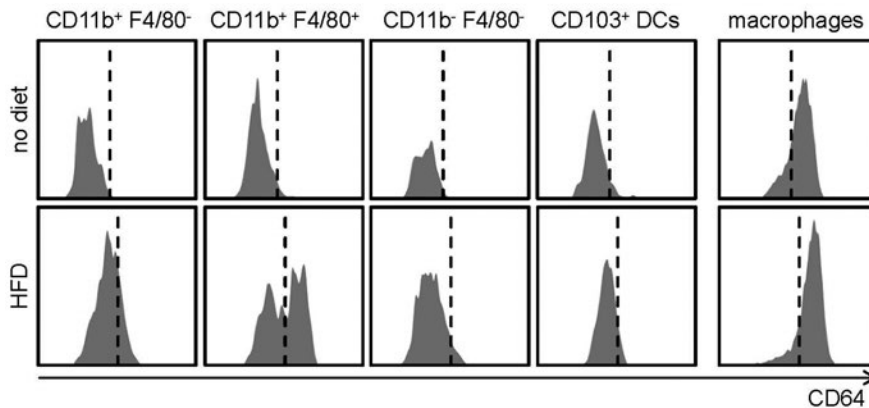


Figure 6. CD64 expression on aortic DC subsets and macrophages. Representative histograms of CD64 expression on aortic DC subsets and macrophages. Representative histograms from 6–9 mice per group are shown.
doi:10.1371/journal.pone.0088452.g006

to differentiate monocyte derived DCs from conventional (CD11b⁺) DCs [23]. Moreover, both CD11c⁺ CD103⁺ DCs and CD11c⁺ CD103[−] CD11b⁺ F4/80[−] DCs were Flt3L dependent and lacked surface expression of CD64. This would suggest not only aortic CD103⁺ [10] but also CD103[−] CD11b⁺ F4/80[−] DCs to belong to conventional rather than monocyte derived DCs and to differentiate from a designated DC precursor in the aorta under physiological conditions. This would also be supported by published data that show a reduction in both CD103⁺ and CD11b⁺ DCs in *Flt3* and *Flt3l* deficient mice in other nonlymphoid tissue [25,26], in accordance with a role of Flt3L in driving the differentiation of progenitor cells (but not monocytes) to the DC lineage [27] and Flt3 dependent common DC precursors (CDPs) and pre DCs to give rise to both CD103⁺ and CD11b⁺ cDCs in the liver and kidney [25]. Likewise, CD64^{−/lo} CD11b⁺ DCs were recently shown to develop in a Flt3L dependent manner under steady state conditions in the skin [24]. CD11c⁺ macrophages and CD11b⁺ F4/80⁺ DCs were unaffected by the deficiency of Flt3L in our experiments under physiological conditions. The exact differentiation pathways of DCs, in particular of CD11c⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ and CD11c⁺ CD103[−] CD11b⁺ F4/80[−] DCs, in the aorta in healthy mice, however, remain to be defined.

Notably, in the skin CD64^{lo/+} CD11b⁺ DCs were shown to develop from circulating Ly6C^{hi} monocytes and to display low to intermediate levels of CD64 [24], which may similarly apply to monocyte derived DCs in the aorta in mice. The emergence of CD64^{lo/+} CD11b⁺ F4/80[−] and CD11b⁺ F4/80⁺ DCs in the aorta in atherosclerosis may thus indicate that these subsets are in part derived from immigrated monocytes during atherosclerotic lesion formation. Although it may be possible that the marker CD64 does not assist in defining the origin of aortic DCs, we can rule out that lack of CD64 staining was due to technical problems, given the uniform staining of CD64 in macrophages in all experiments.

Notably, higher numbers of CD11c⁺ DCs than CD11c[−] macrophages [10] were observed in advanced atherosclerotic plaques. Given that CD11c⁺ MHCII⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ DCs represent the largest DC subpopulation, and that macrophages can express CD11c under inflammatory conditions [6,28], it remains to be defined whether this discrimination into DCs *versus* macrophages in the aorta, based on the expression of CD11c, holds true in future studies, in particular, as these cell subsets share similar expression of F4/80 and CD11b. Together with a foam cell like appearance of CD11c⁺ cells in the intima upon the

initiation of a HFD [6,7] and in atherosclerotic lesions of CD11c⁺ YFP *ApoE*^{−/−} reporter mice in our study, a further functional characterization of the capacity of aortic CD11c⁺ and CD11c[−] cells and of individual DC subsets (with regards to migration, phagocytosis and immune priming) is clearly warranted not only in healthy mice [10], but also under conditions of HFD to resolve this question. Unambiguous surface markers to discriminate these cell populations remain to be defined. Moreover, a decision on whether the gated DC populations represent true lineage subsets (as seen for CD4⁺ and CD8⁺ T cells), display different transcriptionally active states (as in Th1, Th2 and Tregs), or whether DC subsets just up or down regulate these surface markers (as also known for T cells or for macrophages during M1/M2 polarization) remains to be determined.

Our data enhance our knowledge about the presence of distinct DC subsets and their accumulation in atherosclerosis. The systematic survey of the phenotype and possible origin of aortic DCs are prerequisites for future studies aiming at defining specific DC based therapeutic strategies for the treatment of chronic vascular inflammation.

Supporting Information

Figure S1 Localization of CD11c⁺ cells in different vascular beds. Representative sections of the innominate artery and the aortic arch of atherosclerotic CD11c⁺ YFP *ApoE*^{−/−} reporter mice (arrow heads indicate CD11c⁺ cells, green). Nuclei are counterstained with DAPI (blue; scale bars, 50 μ m).
(PDF)

Figure S2 Aortic DC subset distribution. DC subsets as percentages of total DCs in the aorta of B6 and *Ldlr*^{−/−} mice fed a normal chow, or in *Ldlr*^{−/−} mice after 6 or 12 weeks of high fat diet feeding (6–9 mice per group). Data represent mean \pm SEM. **p* < 0.05.
(PDF)

Figure S3 Characterization of aortic DC subsets. Representative co immunofluorescence staining of aortic root sections of *Ldlr*^{−/−} mice fed a high fat diet for 12 weeks, revealing cells showing staining for only CD11c (red, filled arrow heads) or CD68⁺ (green, narrow arrows) as well as both CD11c and CD68 (yellow, bold arrows). Nuclei are counterstained with DAPI (blue). Oil red O staining (red) for lipids in adjacent sections. Scale bars, 50 μ m.
(PDF)

Figure S4 DCs in the *Flt3L*-deficient mice. Representative FACS plots for identification of DC subsets in healthy *Flt3L*^{+/+} and *Flt3L*^{-/-} mice, fed a normal chow. After exclusion of TCRβ⁺/CD19⁺ T and B cells, macrophages were defined as CD11c MHCII⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ (left panel), and CD11c⁺ MHCII⁺ DCs were further subdivided into CD103⁺ and CD103⁻ DCs (middle panel). CD103⁻ DCs were further subdivided into CD11b⁺ F4/80⁻, CD11b⁺ F4/80⁺ and CD11b⁻ F4/80⁺ DCs (right panel). (PDF)

References

- Weber C, Noels H (2011) Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 17: 1410–1422.
- Weber C, Zernecke A, Libby P (2008) The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol* 8: 802–815.
- Galkina E, Kadl A, Sanders J, Varughese D, Sarembock IJ, et al. (2006) Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent. *J Exp Med* 203: 1273–1282.
- Jongstra-Bilen J, Haidari M, Zhu SN, Chen M, Guha D, et al. (2006) Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis. *J Exp Med* 203: 2073–2083.
- Manthey H, Zernecke A (2011) Dendritic cells in atherosclerosis: functions in immune regulation and beyond. *Thromb Haemostasis* 106: 772–778.
- Koltsova EK, Garcia Z, Chodaczek G, Landau M, McArdle S, et al. (2012) Dynamic T cell-APC interactions sustain chronic inflammation in atherosclerosis. *J Clin Invest* 122: 3114–3126.
- Paulson KE, Zhu SN, Chen M, Nurmohamed S, Jongstra-Bilen J, et al. (2010) Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis. *Circ Res* 106: 383–390.
- Hansson GK, Hermansson A (2011) The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 12: 204–212.
- Sun J, Hartvigsen K, Chou MY, Zhang Y, Sukhova GK, et al. (2010) Deficiency of antigen-presenting cell invariant chain reduces atherosclerosis in mice. *Circulation* 122: 808–820.
- Choi JH, Cheong C, Dandamudi DB, Park CG, Rodriguez A, et al. (2011) Flt3 signaling-dependent dendritic cells protect against atherosclerosis. *Immunity* 35: 819–831.
- Lewis KL, Reizis B (2012) Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a007401.
- Robbins GS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, et al. (2013) Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med* 19: 1166–1172.
- Hanna RN, Shaked I, Hubbeling HG, Punt JA, Wu R, et al. (2012) NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis. *Circ Res* 110: 416–427.
- Lindquist RL, Shakhar G, Dudziak D, Wardemann H, Eisenreich T, et al. (2004) Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat Immunol* 5: 1243–1250.
- Choi JH, Do Y, Cheong C, Koh H, Boscardin SB, et al. (2009) Identification of antigen-presenting dendritic cells in mouse aorta and cardiac valves. *J Exp Med* 206: 497–505.
- Weber C, Meiler S, Doring Y, Koch M, Drechsler M, et al. (2011) CCL17-expressing dendritic cells drive atherosclerosis by restraining regulatory T cell homeostasis in mice. *J Clin Invest* 121: 2898–2910.
- Doring Y, Manthey HD, Drechsler M, Lievens D, Megens RT, et al. (2012) Auto-antigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis. *Circulation* 125: 1673–1683.
- Macritchie N, Grassia G, Sabir SR, Maddaluno M, Welsh P, et al. (2012) Plasmacytoid dendritic cells play a key role in promoting atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 2569–2579.
- Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H (2009) Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. *Trends in Cell Biology* 19: 72–80.
- Lahoud MH, Proietto AI, Gartlan KH, Kitsoulis S, Curtis J, et al. (2006) Signal regulatory protein molecules are differentially expressed by CD8⁺ dendritic cells. *J Immunol* 177: 372–382.
- Wu L, Shortman K (2005) Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol* 17: 304–312.
- Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, et al. (2012) Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol* 13: 1118–1128.
- Langlet C, Tamoutounour S, Henri S, Luche H, Ardouin L, et al. (2012) CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J Immunol* 188: 1751–1760.
- Tamoutounour S, Williams M, Montanana Sanchis F, Liu H, Terhorst D, et al. (2013) Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39: 925–938.
- Ginhoux F, Liu K, Helft J, Bogunovic M, Greter M, et al. (2009) The origin and development of nonlymphoid tissue CD103⁺ DCs. *J Exp Med* 206: 3115–3130.
- Bogunovic M, Ginhoux F, Helft J, Shang L, Hashimoto D, et al. (2009) Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31: 513–525.
- Hashimoto D, Miller J, Merad M (2011) Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity* 35: 323–335.
- Ley K, Miller YI, Hedrick CC (2011) Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 1506–1516.

Acknowledgments

We thank Theresa Moritz, Melanie Schott and Yvonne Kerstan for excellent technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AZ. Performed the experiments: MB TCW MK. Analyzed the data: MB TCW MK. Wrote the paper: MB TCW AZ. Revised the article critically for important intellectual content: MBL.

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Mentorin und Doktormutter Frau Professor Dr. med. Alma Zerneck-Madsen und meinem Betreuer Dr. Martin Busch für die besondere Unterstützung bei meiner Promotionsarbeit. Danken möchte ich darüber hinaus Frau Dr. Miriam Koch für die Unterstützung bei der Revision des gemeinsamen Papers, sowie der gesamten AG Zerneck: Frau Dr. Sweena Chaudhari, Frau Dr. Helga Manthey, Dr. Clement Cochain, Theresa Henninger, Luisa Molinari, insbesondere Melanie Rösch, die mich herzlich aufgenommen und stets hilfsbereit unterstützt haben.

Ein großes Dankeschön gilt meinem Freund Simon, der mir nicht nur wissenschaftlich stets mit Rat und Unterstützung zur Seite steht.

Darüber hinaus bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner Familie, die mich seit jeher unterstützt: Meine Eltern, und meine Schwester Sumi.

Zuletzt danke ich von Herzen meiner wunderbaren Frau Sophia, die mich bei dieser Arbeit und in meinem gesamten Werdegang uneingeschränkt unterstützt und mir stets beratend zur Seite steht.

13 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Die Entwicklung und Charakterisierung Dendritischer Zell-Subsets in der gesunden und arteriosklerotischen Aorta“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

München, 01.12.22

Thiyo Westhofen