

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Professor Dr. Steffen Massberg

**Ontogenetische Herkunft von Makrophagen der Aorta
und deren Reaktion auf Angiotensin-induzierte Inflammation**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



Vorgelegt von
Christian Schleifer
aus
Tübingen
im Jahr 2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Christian Schulz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Andreas May Prof. Dr. Markus Sperandio Prof. Dr. Vigo Heissmeiyer
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	19.05.2021

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Ursprünge von Gewebemakrophagen	1
1.1.1 Entdeckung von Makrophagen und historische Hypothesen zu deren Ursprung	1
1.1.2 Aktuelles Verständnis	3
1.1.3 Umfang des knochenmarkabhängigen Ersatzes von Gewebemakrophagen	7
1.2 Epidemiologische Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen	9
2 Fragestellung	11
3 Material und Methoden	12
3.1 Material	12
3.2 Tierversuche	17
3.2.1 Tierhaltung	17
3.2.2 Mausmodelle	17
3.2.3 Flt3 ^{Cre/WT} ; Rosa26 ^{LSL-eYFP/WT}	19
3.2.4 Csf1r ^{Mer-iCre-Mer/WT} ; Rosa26 ^{LSL-eYFP/WT}	19
3.2.5 Tie2 ^{Mer-iCre-Mer/WT} ; Rosa26 ^{LSL-eYFP/WT}	19
3.2.6 C-Kit ^{Mer-Cre-Mer/WT} ; Rosa26 ^{LSL-eGFP/WT}	20
3.2.7 Genotypisierung	20
3.2.8 Zeitlich terminierte Verpaarung	20
3.2.9 Venöse Blutentnahme	21
3.2.10 Narkose	21
3.2.11 Fate mapping	21
3.2.12 Detektion von Zellproliferation	23
3.2.13 Bestrahlungsunabhängiges Knochenmarktransplantationsmodell	23
3.2.14 Subkutane Implantation osmotischer Pumpen	25
3.3 Histologie	26
3.3.1 Entnahme der Aorta und Anfertigung von Gefrierschnitten	26
3.3.2 Masson-Trichrom-Färbung	26
3.3.3 Auflichtmikroskopische Analyse und Quantifizierung der Gefäßwandfibrose	27

Inhaltsverzeichnis

3.3.4 Immunfluoreszenzfärbung	27
3.3.5 Fluoreszenz- und konfokalmikroskopische Analyse	28
3.3.6 Bestimmung des Abstands von Makrophagen zur Gefäßmedia	28
3.3.7 Untersuchung von Clusterbildung durch Makrophagen	29
3.4 Durchflusszytometrie	30
3.4.1 Aufbereitung des Blutes	30
3.4.2 Aufbereitung des Knochenmarks	30
3.4.3 Aufbereitung der Leber	30
3.4.4 Aufbereitung der Aorta adulter Tiere	30
3.4.5 Aufbereitung der Aorta von Embryonen	31
3.4.6 Färbung der Proben	31
3.4.7 Analyse und Zellsortierung	31
3.5 Statistik	34
4 Ergebnisse	35
4.1 Ergebnisse I: Zweigeteilte Herkunft von Makrophagen der Aorta	35
4.1.1 Etablierung aortaler Makrophagenpopulationen durch Csf1r-exprimierende embryonale Vorläuferzellen	35
4.1.2 Beitrag von EMPs zum Aortenmakrophagenpool der adulten Maus	37
4.1.3 Beitrag von HSCs zum Aortenmakrophagenpool der adulten Maus	39
4.1.4 Ersatz von Aortenmakrophagen durch Monozyten	40
4.1.5 Charakterisierung der zwei ontogenetisch unterschiedlichen Aortenmakrophagenpopulationen	44
4.2 Ergebnisse II: Reaktion der zwei Aortenmakrophagenpopulationen auf Angiotensin-induzierte Inflammation	47
4.2.1 Vaskuläre Fibrose und erhöhte Aortenmakrophagenanzahl im Angiotensin II-Modell	47
4.2.2 Akute Reaktion der Aortenmakrophagen auf Inflammation und Fibrose	48
4.2.3 Chronische Reaktion der Aortenmakrophagen auf Inflammation und Fibrose	51
5 Diskussion	54
5.1 Äquivalenter Beitrag von HSCs und EMPs zum Aortenmakrophagenpool	54

Inhaltsverzeichnis

5.2 Lokale Proliferation als dominierender Mechanismus für den Erhalt der Aortenmakrophagenanzahl.....	55
5.3 Kein Unterschied zwischen EMP- und HSC-abhängigen Makrophagen in Lokalisation oder Tendenz zur Clusterbildung	56
5.4 Vorübergehend erhöhter Einstrom von Monozyten in akuter Inflammation und Fibrose	58
5.5 Partielle Rekonstitution von Steady-state-Verhältnissen in chronischer Inflammation und Fibrose	59
5.6 Ausblick.....	60
6 Zusammenfassung.....	62
7 Abbildungsverzeichnis	64
8 Tabellenverzeichnis.....	65
9 Abkürzungsverzeichnis	66
10 Literaturverzeichnis.....	69
11 Eidesstattliche Versicherung	81
12 Danksagung.....	82

1 Einleitung

Diese Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Herkunft von Gewebemakrophagen der Aorta sowie deren Reaktion auf Angiotensin-induzierte Inflammation in der Gefäßwand.

Auf den folgenden Seiten wird zunächst der Weg von der Entdeckung der Makrophagen bis hin zum aktuellen Verständnis ihrer Herkunft beschrieben. Daraufhin folgt ein kurzer Überblick über die epidemiologische Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen, damit ein Kontext für die im Anschluss an die Einleitung gestellten Fragen (Abschnitt 2) geschaffen wird.

1.1 Ursprünge von Gewebemakrophagen

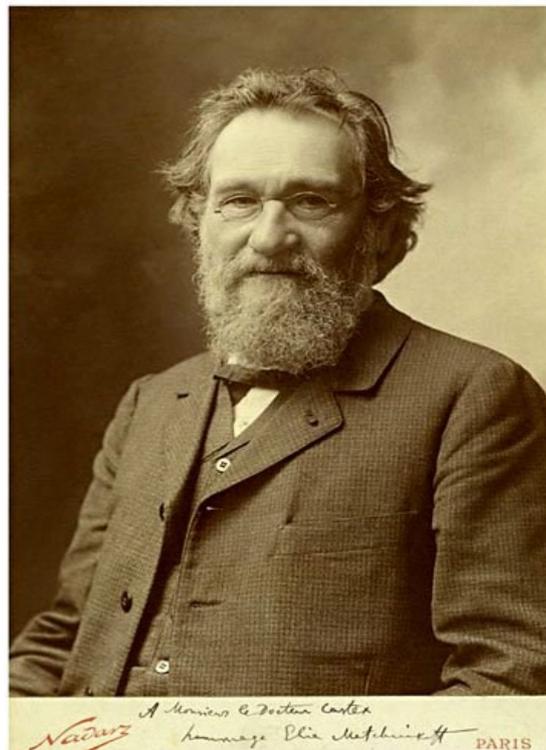
Dieser Abschnitt stellt dar, wann Makrophagen entdeckt wurden, was ursprüngliche Erklärungsansätze zu ihrem Ursprung waren, und wie im Laufe der Zeit neue Erkenntnisse zu ihrer Herkunft gewonnen wurden. Abschließend wird der gegenwärtige Stand der Forschung auf diesem Gebiet ausführlich dargelegt.

1.1.1 Entdeckung von Makrophagen und historische Hypothesen zu deren Ursprung

Das Konzept der Phagozytose, heute definiert als die zelluläre Aufnahme von Partikeln einer Größe von über 0,5 Mikrometer (μm) mittels eines von Aktin abhängigen Mechanismus [1], wurde erstmals von Ilja Iljitsch Metschnikow im Jahre 1892 als Abwehrmechanismus vielzelliger Lebewesen beschrieben [2]. Erstmals in Seesternen und später in zahlreichen Säuglingsspezies wies Metschnikow umherwandernde, amöboide Zellen nach, die sich als wahre Spezialisten der Phagozytose erwiesen. Anhand ihrer Fähigkeit, lebende Mikroorganismen aufzunehmen und abzutöten, schrieb er ihnen besondere Bedeutung in der zellulären Immunabwehr von Organismen zu. Er erkannte weiterhin, dass die amöboiden Zellen eine besondere Rolle bei der Homöostase zahlreicher Gewebe einzunehmen schienen. Diese von ihm erstmals als „Makrophagen“ beschriebenen Zellen waren in Geweben sowohl von embryofetalen als auch adulten Tieren zahlreich vorhanden [3].

Früh stellte sich die Frage, woher diese Makrophagen denn kämen. Von der Abstammung von Endothel- [4] oder Adventitia-Zellen [5] über die Herkunft von Monozyten [6] oder Lymphozyten [7] bis zur dualen Abstammung von Monozyten und

Lymphozyten [8] konkurrierten zahlreiche wissenschaftliche Hypothesen. Angesichts zunehmender Evidenz dafür, dass Makrophagen in Zellkultur aus Monozyten entstehen können [9] und neu rekrutierte Makrophagen in Entzündungen am ehesten von zirkulierenden Monozyten abstammen [6, 10-13], beschrieben Ralph van Furth und Zanvil Cohn im Jahr 1968 erstmals ein zusammenhängendes System aus mononukleären Phagozyten. Die beiden Autoren zeigten, dass knochenmarksresidente Monozytenvorläufer, Blutmonozyten sowie Makrophagen ein zusammenhängendes System einkerniger Phagozyten darstellen [14]. 1972 prägten van Furth und Cohn hierfür den Begriff „Mononukleäres Phagozytensystem (MPS)“. Des Weiteren postulierten sie, dass das gesamte MPS und dadurch impliziert auch sämtliche Gewebemakrophagen den Monozyten und damit dem Knochenmark entstammen würden. Im MPS wurden Zellen klassifiziert, die eine ausgeprägte Phagozytoseeignung demonstrierten und sich fest an Glasoberflächen anheften konnten. Begründet durch die vermeintlich gemeinsame Herkunft, fasste man diese Zellen zu einem System zusammen.



*Abbildung 1: Porträt von Ilya
Metschnikow,
Erstbeschreiber der Makrophagen*

*Aus [3]. Mit freundlicher Genehmigung des
Elsevier Copyright Clearance Center's
RightsLink*

Bereits im selben Jahr (1972) wurde gezeigt, dass die ersten Makrophagen der Maus unabhängig von Monozytenvorläufern im Dottersack entstehen [15]. In den kommenden Jahren wies man in Ratten [16], Mäusen [17] und auch Menschen [18] schon vor Beginn der knochenmarkabhängigen Hämatopoese nicht nur im Dottersack, sondern auch in der fetalen Leber Makrophagen nach. Diese schienen sich in der Embryonalentwicklung auf ontogenetisch unterschiedlichem Wege unabhängig von Monozytenvorläuferformen zu entwickeln [19-21]. Retrospektiv lässt sich also festhalten, dass schon früh Hinweise gegen ein rein vom Knochenmark abhängiges Makrophagen-System aufkamen. Die Relevanz dieser Entdeckungen und mögliche Folgen daraus wurden allerdings vorerst nicht erkannt.

Im Jahr 1993 konnte bei Vögeln demonstriert werden, dass Mikroglia (Gewebemakrophagen des ZNS) nicht von zirkulierenden Monozyten, sondern am ehesten von migrierenden Makrophagen mit starker Proliferationskapazität abstammen [22, 23]. 1999 wurde daraufhin erstmals postuliert, dass Mikroglia der adulten Maus möglicherweise von jenen vorbeschriebenen primitiven Dottersackmakrophagen abstammen könnten [24]. Diese beachtenswerte Hypothese, welche noch weiterer wissenschaftlicher Bestätigung bedurfte, markierte den Wendepunkt im Verständnis der zwei Jahrzehnte zuvor gemachten Entdeckung der Dottersackmakrophagen. Sowohl neue Hypothesen zur möglichen Bedeutung der Dottersackmakrophagen als auch die Entwicklung neuer gentechnischer Methoden wie fate mapping (Abschnitt 3.2.11) ebneten den Weg für die Erforschung des eigentlichen Ursprungs der Gewebemakrophagen.

1.1.2 Aktuelles Verständnis

In mehreren Pionierarbeiten konnte in den vergangenen 15 Jahren durch zahlreiche, teils genetisch hochkomplexe Mausmodelle gezeigt werden, dass in der adulten Maus mindestens zwei ontogenetisch unterschiedliche Makrophagenpopulationen existieren [25-31]. In zahlreichen Review-Artikeln [32-39] wurde und wird laufend versucht, die Flut an neu gewonnener Evidenz zu einer Systematik zu kategorisieren. Auf den folgenden Seiten werden aktuelle Ideen zu einem möglichen Gesamtkonzept zusammengefasst. Hierbei sei angemerkt, dass dies lediglich den Stand einer intensiv beforschten Thematik vor Veröffentlichung dieser Dissertation darstellt und die Notwendigkeit einer Modifikation des Gesamtkonzepts durch neue Evidenz möglich und durchaus wahrscheinlich ist.

Ein dualer Ursprung von Gewebemakrophagen einerseits aus Makrophagenvorläufern, die dem Dottersack abstammen, sowie andererseits aus hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), die dem Knochenmark abstammen, ist mittlerweile wissenschaftlich allgemein anerkannt. Bezüglich der genaueren Unterteilung in mehrere hämatopoetische Wellen besteht hingegen noch eine Kontroverse. An dieser Stelle soll – ergänzt durch Ideen weiterer Autoren [39-41] – die von Godin und Cumano erstmals aufgebrachte Theorie von drei zeitlich gestaffelten, sich teils jedoch überlappenden Wellen beschrieben werden [42].

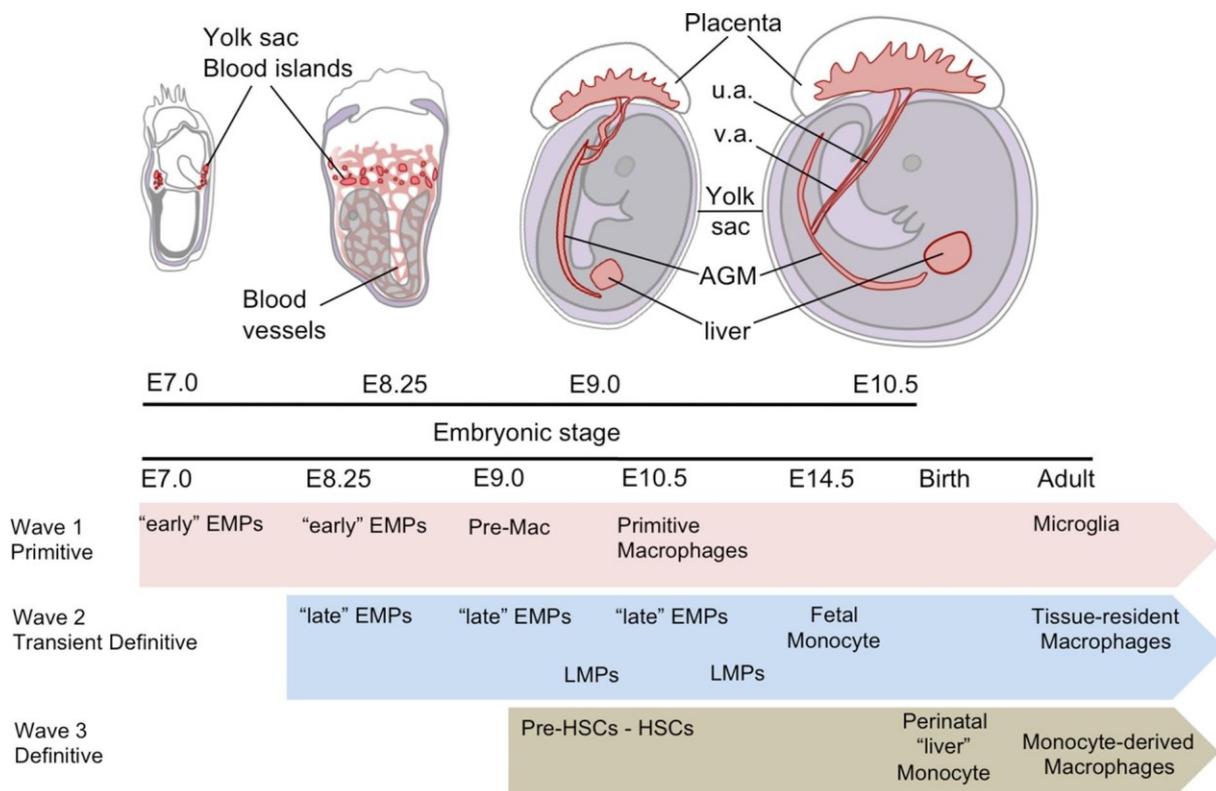


Abbildung 2: Hämatopoetische Wellen des murinen Embryos

Während der murinen Embryonalentwicklung kann man die Hämatopoese in 3 sequenzielle Wellen einteilen: Eine erste, im Dottersack entstehende, „primitive“ Generation an frühen EMPs. Eine zweite, ebenfalls im Dottersack entstehende „transient definitive“ Generation an EMPs sowie, ab Tag E10.5 beginnend, eine in der AGM-Region entstehende, „definitive“ Welle bestehend aus HSCs. Man beachte, dass es eine beträchtliche zeitliche Überlappung der Wellen gibt.

Aus [39]. Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Copyright Clearance Center's RightsLink

1.1.2.1 Erste hämatopoetische Welle: Primitive Dottersackmakrophagen

Beginnend an Tag 7.5 der Embryonalentwicklung der Maus (E7.5) entstehen die ersten hämatopoetischen Vorläuferzellen, auch als primitive hämatopoetische Vorläuferzellen bezeichnet, im extraembryonal gelegenen Dottersack [42, 43]. Es bestehen Hinweise darauf, dass diese sich – im Gegensatz zu den hämatopoetischen Vorläuferzellen nachfolgender Wellen – nicht aus hämogenen endothelialen Zellen differenzieren, sondern möglicherweise von ontogenetisch distinkten Vorläuferzellen abstammen [44]. In dieser ersten primitiven Welle wiederum werden zwei unterschiedliche Zelllinien mit Potenzial zur Differenzierung hin zu Erythrozyten und Megakaryozyten oder Makrophagen unterschieden [45]. Die aus dieser Welle hervorgehenden primitiven Dottersackmakrophagen, von anderen Autoren auch als „early EMPs“ (frühe erythromyeloische Progenitorzellen) bezeichnet [39], begründen nach Ausbildung einer systemischen Blutzirkulation im Mausembryo zum Zeitpunkt E8.25 [46] die Mikroglia population des Gehirns [47].

Wie in Abschnitt 1.1.1 beschrieben, wurde am Beispiel der Mikroglia erstmals die Hypothese aufgestellt, dass diese auch im adulten Tier von Dottersackvorläufern abstammen könnten [24]. Zahlreiche genetische Modelle lieferten starke Evidenz dafür, dass Zellen des Dottersacks, welche zu Tag E7.5 Runx1 sowie Csf1r [48], Tie2 [31] und c-Kit [49] exprimieren, Herkunft der Mikroglia population der adulten Maus sein könnten. Diskutiert wird allerdings, ob die zeitliche Auflösung der Markierung von Zellen mittels tamoxifenabhängiger Cre-Rekombinase (im weiteren als fate mapping bezeichnet, Abschnitt 3.2.11) ausreicht, um die Herkunft der Mikroglia abschließend der ersten von drei hämatopoetischen Wellen zuordnen zu können [37].

1.1.2.2 Zweite hämatopoetische Welle: Erythromyeloische Progenitorzellen

Beginnend ab Tag E8.25 entstehen im Dottersack Zellen der zweiten hämatopoetischen Welle [42]. Diese von Perdiguero et al. 2015 als erythromyeloische Progenitorzellen (EMPs) bezeichneten Zellen [31] unterscheiden sich von HSCs in drei Punkten: 1. mangelndem Differenzierungspotenzial zur lymphozytären Linie hin, 2. fehlendem längerfristigen Selbsterhaltungspotenzial, sowie 3. fehlender Expression des Oberflächenrezeptors Sca1 [50]. Während man vor acht Jahren noch davon ausging, dass – abgesehen von Mikroglia – sämtliche Gewebemakrophagen der adulten Maus HSC-abhängig entstünden [48], konnten Schulz et al. 2012 zeigen, dass eine distinkte Linie myeloider Zellen existiert, die im Gegensatz zu HSCs von c-myb unabhängig ist [25].

Diese von Perdiguero drei Jahre später in weiteren Fate-mapping-Versuchen als EMPs beschriebenen myeloiden Zellen [31] stellen Evidenz dafür dar, dass Gewebemakrophagen unabhängig von HSCs entstehen und lebenslang persistieren können. EMPs der zweiten Welle wandern ab Tag E10.0 in die fetale Leber des Embryos ein, proliferieren dort [51] und differenzieren sich ab E12.5 mit der Ausnahme von Lymphozyten zu sämtlichen Zelllinien des Blutes [52, 53]. Als Monozyten treten sie in die Blutzirkulation ein und besiedeln nahezu sämtliche Gewebe der Maus als selbsterhaltende Makrophagen [54].

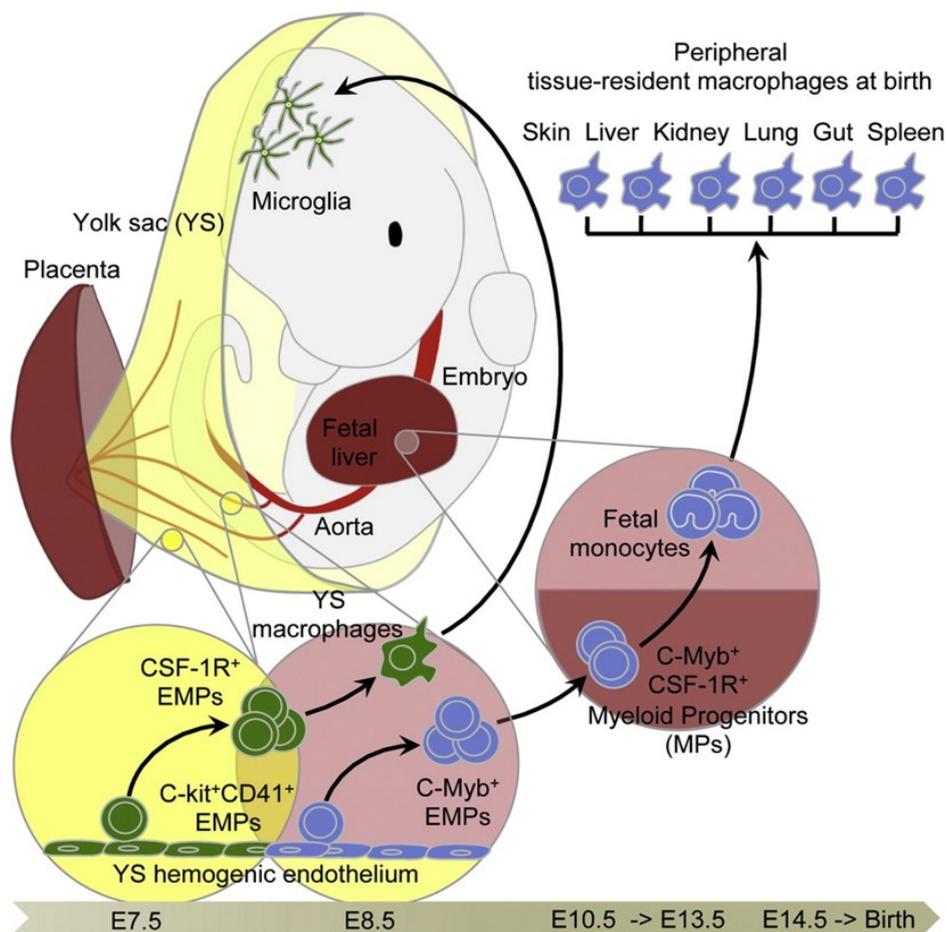


Abbildung 3: Vom Dottersack ausgehende hämatopoetische Wellen

Ab Tag E7.5 entstehen Csf1r^+ -EMPs im Dottersack, die anschließend die Mikroglia population begründen (in grün). Teils zeitlich überlappend kommt es ca. ab Tag E8.25 zur Entstehung von c-myb -abhängigen EMPs, welche den Ursprung eines Großteils der geweberesidenten Makrophagen der meisten Gewebe der Maus darstellen (in blau).

Aus [54]. Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Copyright Clearance Center's RightsLink

1.1.2.3 Dritte hämatopoetische Welle: Hämatopoetische Stammzellen

Die dritte hämatopoetische Welle umfasst die Entwicklung von fetalen sowie adulten HSCs. In diesem Abschnitt soll die Entwicklung des endgültigen hämatopoetischen Systems sowie die Bedeutung fetaler HSCs für die Etablierung der Gewebemakrophagenpopulationen beleuchtet werden. Der Beitrag adulter HSCs zum Erhalt der Gewebemakrophagenpopulationen wird im nächsten Abschnitt abgehandelt.

HSCs können definiert werden als Zellen mit dem Phänotyp $c\text{-kit}^+$ [55], $Sca1^+$ [56, 57], $CD41^+$ [58], mit der Potenz zur längerfristigen Reproduktion sämtlicher Blutzellen und mit der Befähigung zur Selbsterneuerung [59, 60]. Ab Tag E10.5 [61] entwickeln sich im murinen Embryo aus Endothelzellen der ventralen Wand der dorsalen Aorta in der Aorto-Gonado-Mesonephros-Region (AGM-Region) erste Runx1-abhängige fetale HSCs [62-64]. Auch andere intraembryonale Regionen, wie beispielsweise die Plazenta, können Ursprungsregionen von HSCs darstellen [65]. Von Tag E10.5 bis Tag E11.5 nimmt die Zahl von HSCs in der AGM-Region zu, um anschließend rapide abzusinken [55, 61, 66, 67]. Dieser Abfall wird dadurch erklärt, dass diese Zellen ab Tag E11.0 die Leber besiedeln [68]. Hier beginnen sie, schnell zu proliferieren [69]. Ihr Beitrag zur fetalen Myelopoese hingegen bleibt zunächst gering [54]. Die HSC-Anzahl verdoppelt sich von Tag E11.0 bis E15.5 etwa alle 24 Stunden. Trotz weiterhin konstanter proliferativer Aktivität der HSCs nimmt ihre Anzahl in der Leber anschließend ab [69], da sie erneut in die Blutzirkulation eintreten, um Milz und Knochenmark als Endziel ihrer Reise zu besiedeln [70].

Es konnte gezeigt werden, dass gegen Ende der Embryonalperiode EMPs der zweiten Welle nicht mehr in der Leber nachweisbar sind. Im Blut hingegen lässt sich eine konstante Anzahl fetaler Monozyten nachweisen, was ein indirekter Hinweis für die Differenzierung fetaler leberständiger HSCs hin zu Monozyten und anschließend Makrophagen sein könnte [54]. Perinataler Einstrom von Monozyten, die von fetalen HSCs abstammen, sowie deren Differenzierung hin zu Gewebemakrophagen, wurde 2016 in der Leber und 2017 im Hoden nachgewiesen [71, 72]. Der genaue Umfang, in dem fetale HSCs zur Etablierung der Gewebemakrophagenpopulationen beitragen, kann mit den vorhandenen Daten jedoch noch nicht verlässlich bestimmt werden.

1.1.3 Umfang des knochenmarkabhängigen Ersatzes von Gewebemakrophagen

Die Bedeutung von adulten HSCs sowie knochenmarkabhängigem Monozyten-Einstrom für den Erhalt der Makrophagenpopulation in der adulten Maus ist

organabhängig sehr heterogen. Dottersackabhängige Gewebemakrophagen der Dermis [29] und des Darms [30] werden bereits innerhalb der ersten Lebenswochen nahezu vollständig von knochenmarkabhängigen, sich zu Makrophagen differenzierenden Monozyten ersetzt. Dabei weisen die Organe Haut und Darm die Gemeinsamkeit auf, dass sie beide als Barriere zur Umwelt dienen und schon früh mit dem Mikrobiom konfrontiert werden. In Herz [27, 73] und Pankreas [74] findet der Ersatz durch knochenmarkabhängige Monozyten langsamer statt, sodass sich dort in der adulten Maus zwei ontogenetisch unterschiedliche Makrophagenpopulationen wiederfinden. Im Gehirn wurde gezeigt, dass vom Knochenmark abhängige Einwanderung von Monozyten unter normalen Bedingungen vernachlässigbar gering ist. Es wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass die intakte Blut-Hirn-Schranke spätestens nach Geburt einen relevanten Monozyten-Einstrom verhindert [48, 75]. Experimentell bewiesen ist diese Hypothese bis dato allerdings nicht.

Auch die Kolonisierung von Leber [71] und Lunge [31, 54, 76] mit Gewebemakrophagen ist bis wenige Wochen nach der Geburt abgeschlossen. Monozyten-Einstrom scheint anschließend nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

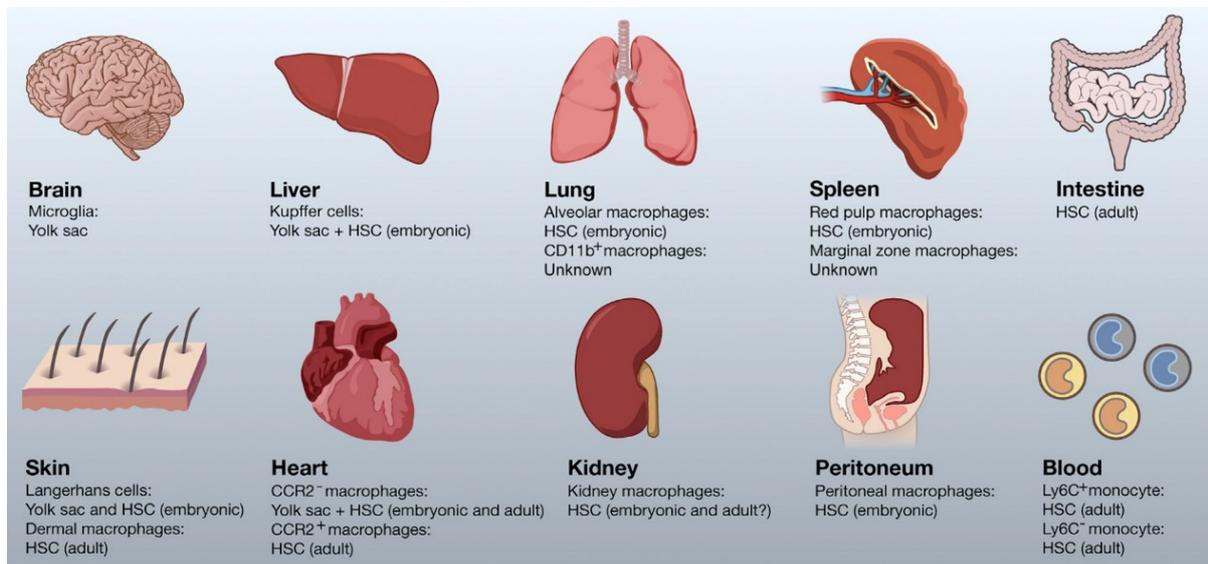


Abbildung 4: Ontogenetische Herkunft der Gewebemakrophagen unterschiedlicher Organe in der adulten Maus

Während die Mikroglia des Gehirns gänzlich ihren Ursprung in primitiven EMPs des Dottersacks haben, finden sich in den meisten Organen der adulten Maus wie Leber, Lunge, Herz u. a. mindestens zwei ontogenetisch distinkte Makrophagenpopulationen. Makrophagen der Haut (mit Ausnahme der Langerhanszellen) sowie des Darmes werden im Verlauf wahrscheinlich größtenteils durch von HSCs abstammende Makrophagen ersetzt.

Aus [32]. Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Copyright Clearance Center's RightsLink

1.2 Epidemiologische Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen

Makrophagen sind zentrale Akteure bei kardiovaskulären Erkrankungen. Eine Zusammenfassung des aktuellen Wissensstands über ihre Rolle dabei würde den Rahmen dieser Einleitung sprengen und ist bereits in mehreren umfassenden Review-Artikeln erfolgt, auf welche an dieser Stelle verwiesen sei [77-80]. Im Folgenden werden die durch kardiovaskuläre Erkrankungen verursachten epidemiologischen Folgen dargestellt, um die Relevanz der Erforschung der Aortenmakrophagenherkunft aufzuzeigen: Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen den bedeutendsten Mortalitätsfaktor unserer Zeit dar [81]. Im Jahr 2015 waren sie für 17,9 Millionen (entsprechend 32 % aller globalen) Todesfälle verantwortlich [82].

Gemäß der *World Health Organization* (WHO) können unter dem Begriff *kardiovaskuläre Erkrankungen* (CVDs) folgende Krankheiten zusammengefasst werden: Koronare Herzkrankheit inkl. Akutes Koronarsyndrom (ACS), zerebrovaskuläre Erkrankungen inkl. Schlaganfall, periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), rheumatische Herzerkrankung, angeborene Herzfehler, Kardiomyopathien sowie kardiale Arrhythmien [83]. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist insbesondere der ebenfalls von der WHO definierte Unterbegriff *atherosklerotisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen* (aCVDs) bedeutend. Dieser bezieht sich auf jene Erkrankungen der CVD-Definition, die nach aktuellem Kenntnisstand maßgeblich durch Atherosklerose mitbedingt sind [84]: Koronare Herzkrankheit inkl. ACS, zerebrovaskuläre Erkrankungen inkl. Schlaganfall sowie Erkrankungen der Aorta und Arterien, welche Hypertonie und pAVK einschließen [83].

91 % der 17,9 Millionen durch kardiovaskuläre Erkrankungen bedingten Todesfälle werden durch atherosklerotisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen verursacht, wobei 85 % davon auf Herzinfarkte und Schlaganfälle zurückzuführen sind [82]. Der durch eine Erkrankung verursachte sozioökonomische Schaden ist jedoch durch andere Kennzahlen als die reine Mortalitätsrate besser abzubilden. Im Rahmen der ersten *Global Burden of Disease*-Studie 1990, veröffentlicht im *World Development Report* 1993, wurde die Berechnung der „disability-adjusted life-years“ (DALYs) eingeführt. DALYs werden aus der Summe der „years of life lost“ (YLLs) und „years lived with disability“ (YLDs) berechnet. YLLs sind das Produkt aus der Anzahl der durch die Erkrankung verursachten Todesfälle und der verbliebenen Lebenserwartung im Sterbealter. YLDs errechnen sich aus der Anzahl der Fälle, multipliziert mit einem

Gewichtungsfaktor für den Schweregrad der Erkrankung sowie der durchschnittlichen Dauer der Krankheit bis zur Heilung oder zum Tod [85]. Auch in der Rangliste der Erkrankungen, welche die meisten DALYs verursachen, nahmen im Jahr 2015 die ischämische Herzkrankheit sowie zerebrovaskuläre Erkrankungen, beide aCVDs, Platz 1 respektive Platz 2 ein. Mit 303 Millionen DALYs sind aCVDs für 12,3 % aller insgesamt durch Krankheiten, Unfälle, Kriege und Naturkatastrophen verursachten DALYs verantwortlich. Um diese immense Zahl in ein Verhältnis zu setzen, sei folgender Vergleich angeführt: Sämtliche neoplastische Erkrankungen zusammengefasst verschulden nur etwa 69 % der durch aCVDs verursachten DALYs [86].

2 Fragestellung

Seit geraumer Zeit herrscht Konsens über die verheerenden epidemiologischen Auswirkungen von atherosklerotisch bedingten kardiovaskulären Erkrankungen (Abschnitt 1.2) sowie die herausragende Bedeutung von Makrophagen bei inflammatorischen Krankheitsprozessen der Gefäßwand [77-80]. Die Herkunft von Gewebemakrophagen ist aktuell noch Gegenstand anhaltender wissenschaftlicher Diskussion (Abschnitt 1.1.2) und in der aortalen Gefäßwand nicht ausreichend verstanden.

Im Zentrum dieser Arbeit steht deswegen die Beantwortung der folgenden Fragen:

*Zu welchem Anteil tragen Makrophagen, die von
dottersackabhängigen erythromyeloischen Progenitorzellen abstammen,
zum aortalen Makrophagenpool bei?*

*Zu welchem Anteil tragen Makrophagen, die von
knochenmarkabhängigen hämatopoetischen Stammzellen abstammen,
zum aortalen Makrophagenpool bei?*

*Gibt es von der Herkunft abhängige Unterschiede
im Verhalten der Makrophagenpopulationen?*

*Was ist der dominierende Mechanismus
zum Erhalt des Aortenmakrophagenpools?*

*Wie reagieren die
sich in ihrer Herkunft unterscheidenden Makrophagenpopulationen
auf Angiotensin-induzierte Inflammation in der Gefäßwand?*

Antworten auf diese Fragen sollen helfen, den Ursprung von Aortenmakrophagen sowie deren Verhalten im Rahmen von pathologischen Prozessen in der Gefäßwand besser zu verstehen. Perspektivisch könnte ein besseres Verständnis hiervon neue Therapieansätze für kardiovaskuläre Erkrankungen aufzeigen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Aceton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DNase I	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
EDTA	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Eindeckmedium für Fluoreszenzhistologie (Mounting-Medium)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Elastase	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey, USA
FCS	Bio&Sell GmbH, Nürnberg, Deutschland
Glyzin	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hyaluronidase	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Immersionsöl	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Kollagenase D	Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Risch, Schweiz
Kollagenase I	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kollagenase II	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey, USA
Kollagenase IV	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kollagenase XI	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
NaCl 0.9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
PBS (10x Konzentrat)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PFA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Poly(I:C)	InvivoGen, SanDiego, Kalifornien, USA
Saponin	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Steriles PBS	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Sucrose	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypsin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tween 20	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ziegenserum	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Tabelle 2: Auflistung der Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung (jeweils gelöst in PBS)
Blockierlösung	1 % BSA, 0,5 % Saponin, 10 % Ziegen Serum
Durchflusszytometriepuffer	0,5 % BSA, 2mM EDTA
PBS-T	1 ml/l Tween 20
Verdauungsenzymmix Adult I	312,5 U/ml Kollagenase II, 5,63 U/ml Elastase
Verdauungsenzymmix Adult II	450 U/ml Kollagenase I, 125 U/ml Kollagenase XI, 60 U/ml DNase I, 60 U/ml Hyaluronidase
Verdauungsenzymmix Embryo	1 mg/dl Kollagenase D, 100 U/ml DNase I, 3 % FCS
Verdauungsenzymmix Leber	600 U/ml Kollagenase IV, 2,5 mg/ml DNase I

Tabelle 3: Auflistung verwendeter Hersteller-Kits

Hersteller-Kit	Hersteller
Alzet micro-osmotic pump, Modell 1002	Durect Corporation, Cupertino, Kalifornien, USA
Alzet micro-osmotic pump, Modell 1004	Durect Corporation, Cupertino, Kalifornien, USA
Ammoniumchloridlysepuffer (Erythrozytenlysepuffer)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
EDTA-Röhrchen (Microvette)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
EdU-Färbung (Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Bildgebungs-Kit)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Masson-Trichrom-Färbekit	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PCR (DNeasy Blood & Tissue)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Tabelle 4: Auflistung verwendeter Primärantikörper für Immunfluoreszenzhistologie

Antikörper	Verdünnung in Blockierlösung	Klon	Konjugat	Katalognummer	Unternehmen
Anti-F4/80	1:50	BM8	ungekoppelt	14-4801-85	eBioscience
Anti-GFP	1:100	Polyklonal, Hase	ungekoppelt	A-11122	Invitrogen
Anti-GFP	1:100	Polyklonal, Ziege	ungekoppelt	Ab6673	abcam

Tabelle 5: Auflistung verwendeter Isotypen-Kontroll-Antikörper

Antikörper	Verdünnung in PBS-T	Klon	Konjugat	Katalognummer	Unternehmen
Hase Immunglobulin Fraktion	Wie anti-GFP	Polyklonal, Hase	ungekoppelt	X0936	Dako
Isotyp IgG2a, κ	Wie anti-F4/80	MOPC-173	ungekoppelt	400201	BioLegend

Isotyp IgG2a, κ	Wie anti-F4/80	eBR2a	ungekoppelt	14-4321-82	eBioscience
Ziege IgG	Wie anti-GFP	Polyklonal, Ziege	ungekoppelt	Sc-2028	Santa Cruz

Tabelle 6: Auflistung verwendeter Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzhistologie

Antikörper	Verdünnung in PBS-T	Klon	Konjugat	Katalognummer	Unternehmen
AF350 Ziege Anti-Hase	1:200	Polyklonal	Alexa Fluor 350	A-11046	Invitrogen
AF488 Esel Anti-Ziege	1:200	Polyklonal	Alexa Fluor 488	A-11055	Invitrogen
AF488 Ziege Anti-Hase	1:200	Polyklonal	Alexa Fluor 488	A-11034	Invitrogen
AF488 Ziege Anti-Maus	1:200	Polyklonal	Alexa Fluor 488	A-11001	Invitrogen
AF594 Ziege Anti-Hase	1:200	Polyklonal	Alexa Fluor 594	A-11037	Invitrogen
AF647 Ziege Anti-Hase	1:200	Polyklonal	Alexa Fluor 647	A-21244	Invitrogen
Cy3 Ziege Anti-Ratte	1:200	Polyklonal	Cy3	112-165-003	Jackson Immuno-research
Cy5 Ziege Anti-Hase	1:200	Polyklonal	Cy5	111-175-144	Jackson Immuno-research
Cy5 Ziege Anti-Ratte	1:150	Polyklonal	Cy5	112-175-143	Jackson Immuno-research

Tabelle 7: Auflistung verwendeter Antikörper für Durchflusszytometrie

Antikörper	Verdünnung in Durchflusszytometriepuffer	Klon	Konjugat	Katalognummer	Unternehmen
Anti-CD115 (CSF-1R)	1:100	AFS98	Brilliant Violet 421	135513	BioLegend
Anti-Cd11b	1:100	M1/70	PE-Cy7	552850	BD Bioscience
Anti-Cd11c	1:100	N418	PE	117307	BioLegend
Anti-CD16/32	1:100	2.4G2	ungekoppelt	553142	BD Bioscience
Anti-CD45	1:100	30-F11	APC-Cy7	557659	BD Bioscience
Anti-CD45.1	1:100	A20	FITC	560579	BD Bioscience
Anti-CD45.2	1:100	104	APC-Cy7	560694	BD Bioscience
Anti-F4/80	1:50	BM8	Brilliant Violet 421	123131	BioLegend

Anti-SiglecF	1:100	E50-2440	PE	552126	BD Bioscience
Anti-TER-119	1:100	TER-119	PE	116207	BioLegend

Tabelle 8: Auflistung verwendeter Pharmaka

Pharmakon	Hersteller
Angiotensin II human	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Buprenorphin (Buprenovet)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Dexapanthenol (Bepanthen Augen- und Nasensalbe)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Fentanyl (Fentadon)	Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland
Heparin	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Isofluran (Isofluran CP)	cp-pharma, Burgdorf, Deutschland
Medetomidin (Dorbene vet)	Zoetis Duetschland GmbH, Berlin, Deutschland
Midazolam	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Tabelle 9: Auflistung verwendeter Geräte

Gerät	Hersteller
-20 °C Gefrierschrank GPS Series	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
-20 °C Gefrierschrank Liebherr Comfort	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
-80 °C Gefrierschrank HERAfreeze Top	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Cryostar NX70 Kryomikrotom	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axio Imager M2	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
FTA-1 Aspirator	bioSan, Riga, Lettland
Isofluranverdampfer Datex-Ohmeda Isotec 5	UniVet Porta Fa. Groppler, Deggendorf
Konfokalmikroskop LSM-510	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Kühlzentrifuge Centrifuge 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA
Wärmeplatte EHE-3503-CU-5WCR	FMI Föhr Medical Instruments, Seeheim/Ober-Beerbach
Zentrifuge Centrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tabelle 10: Auflistung verwendeter Software

Programm	Hersteller
AxioVision SE64 Version Rel. 4.9	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
EndNote Version x9.2	Clarivate, Philadelphia, Pennsylvania, USA
FlowJo Version 10.6	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA
GraphPad Prism Version 8.4	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA
Microsoft Office Suite Version 16.0	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

3.2 Tierversuche

Alle durchgeführten Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern unter den Aktenzeichen 55.2.1.54-2532-93-13, 55.2-1-54-2532-55-2015, ROB-55.2-2532.Vet_02-19-1 sowie ROB-55.2-2532.Vet_02-19-17 genehmigt und gemäß den Vorgaben des § 8 Tierschutzgesetz durchgeführt. Sämtliche Experimente wurden mit einer Mindestanzahl von 3 Mäusen pro (Versuchs-/Kontroll-)Gruppe durchgeführt.

3.2.1 Tierhaltung

Die Tiere wurden teils von The Jackson Laboratory eingeführt, teils von externen Specific-Pathogen-Free (SPF)-Tierställen bezogen. Anschließend wurden sie unter SPF-Bedingungen im *Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung* sowie im *Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin* gehalten. Vor Versuchsbeginn erhielten die Mäuse zur Stressreduktion jeweils eine Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche. Zusätzlich zur Schaffung der Bedingungen sowie Umsetzung der Verfahren zur bestmöglichen artgerechten Haltung der Mäuse wurden Score-Sheets zur engmaschigen Kontrolle der Versuchstiere verwendet (Abbildung 5). Sämtliche Anforderungen der Regierung von Oberbayern an die Tierhaltung wurden zu jedem Zeitpunkt erfüllt.

3.2.2 Mausmodelle

Tabelle 11: Auflistung verwendeter Mausmodelle

Genotyp	Hintergrund	Beschreibung in Abschnitt
CD45 ^{1/1} \triangleq Wildtyp C57BL/6 [87]	C57BL/6	3.2.13
CD45 ^{2/2} \triangleq Wildtyp C57BL/6	C57BL/6	3.2.13
C-Kit ^{Mer-Cre-Mer/WT} [49, 88]	C57BL/6	3.2.6
Csf1 ^{rMer-iCre-Mer/WT} [89]	FVB	3.2.3
Flt3 ^{Cre/WT} [90]	C57BL/6	3.2.3
Mx1 ^{Cre/WT} [91]	C57BL/6	3.2.13
Myb ^{flox/flox} [92, 93]	C57BL/6	3.2.13
Rosa26 ^{LSL-eGFP/WT} [94]	C57BL/6	3.2.11
Rosa26 ^{LSL-eYFP/LSL-eYFP} [95]	C57BL/6	3.2.11
Tie2 ^{Mer-iCre-Mer/WT} [31]	C57BL/6	3.2.5

**Score System für den Erweiterungsantrag
Versuchsabschnitt AT-II induzierte Fibrose**

Datum Beginn des chronischen Tierversuchs:
Tier- Identifikations Nummer:
Tier-Alter bei Versuchsbeginn

Parameter	Score 0		Score 1		Score 2		Scorezeitpunkt (SZP)																	
	gut	(normale Aktivitäten, z.B. Fressen, Ruhen, Bewegen)	vermindert	(gewölbter Rücken, gestraubtes Fell, bewegt sich verlangsamt) angestrengte Atmung, eingefallene Flanken	stark vermindert	(Dehydriert, apathisch, kühle Körperoberfläche, flache oder Pumpatmung, Schwellungen, kachektisch, verklebte Augen)	d0 (1.)	d0 (2.)	d1	d2	d4	d6	d8	d10	d12	d14	d16	d18	d20	d22	d24	d26	d28	
Allgem. Befinden																								
Body Condition Score *	BC 3		BC2 oder BC 4		BC 1 oder BC 5																			
Bewegungsaktivität	umherlaufen, Mettern an den Gitterstäben		zurückgezogen (hockt in der Ecke), schläfrig		liegt bewegungslos > 24h																			
Verhalten	Nestbau, interessiert an der Umgebung, munter		Desinteresse an der Umgebung		Automutilation oder Apathisch, abgesondert																			
Haut	nicht verändert (keine Rötung, Entzündungszeichen zu erkennen), keine Veränderungen der Nähte		Rötung der Haut an der Naht, leichte Entzündungszeichen		Nächtelhsistenz, starke Entzündungszeichen																			
Atmung / Kreislauf	nicht verändert		entfällt (0 oder 2)		Atmung: mühsam, pfeifend, schneidend, Keuchend																			
Gesamtscore																								

* erstellt in Anlehnung an folgende Publikationen:
1) Guidelines for Assessing the Health and Condition of Mice. Chermaine J. Foltz and Mollie Ullman-Cullere, Lab Animal, April 1999, Vol 28, No. 4, pps. 28-32.
2) Use of body condition scoring as an endpoint for tumor growth studies. Debra L. Hickman, Report to the Department of Veterans Affairs, January 31, 2006.

Abbruchkriterien: bei Score 2 oder mindestens drei Mal hintereinander Score 1 **
** in Anlehnung an den Vortrag von PD Dr. med. vet. DjeCLAM Margarete Arras "Abbruchkriterien aus wissenschaftlicher Sicht" bei der 2. Fortbildungsveranstaltung für Tierschutzbeauftragte Berlin, 28. Mai 2009

Abbildung 5: Beispiel eines Score-Sheets

Score-Sheets dieser Art wurden für alle Tierversuche erstellt und für jedes der Versuchstiere, das einer Intervention wie bspw. der Implantation einer Pumpe unterzogen wurde, ausgefüllt.

3.2.3 Flt3^{Cre/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}

In Mäusen des Genotyps Flt3^{Cre/WT} wurde eine Cre-Rekombinase (3.2.11) unter die Kontrolle des Flt3 Gens gestellt, das für die „receptor tyrosine kinase Flt3“ (Flt3, Flk-2) codiert [96]. Flt3 wird von fetalen sowie adulten HSCs exprimiert, nicht jedoch von Zellen der embryonalen Dottersack-Hämatopoese [25, 31]. Flt3^{Cre/WT}-Männchen wurden mit Rosa26^{LSL-eYFP/LSL-eYFP}-Weibchen verpaart. In Mäusen mit dem Genotyp Flt3^{Cre/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT} kommt es in allen Zellen und deren Abkömmlingen, die zum Zeitpunkt der Analyse oder jemals zuvor zumindest intermittierend Flt3 exprimierten, zur genetischen Rekombination und dauerhaften Expression von YFP. Wir analysierten die Aorta 3 sowie 9 Monate alter Tiere durchflusszytometrisch. Weiterhin untersuchten wir die Aorta von 9 Monate alten Tieren immunfluoreszenzhistologisch.

3.2.4 Csf1r^{Mer-iCre-Mer/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}

In Mäusen des Genotyps Csf1r^{Mer-iCre-Mer/WT} wurde eine Mer-iCre-Mer-Rekombinase (3.2.11) unter die Kontrolle des „c-fms“ Gens gestellt, das für den „Colony-stimulating factor-1 receptor“ (Csf1r) codiert [97]. Embryonale Csf1r-exprimierende Zellen etablieren Gewebemakrophagenpopulationen der adulten Maus [25, 89, 98]. Csf1r^{Mer-iCre-Mer/WT}-Weibchen wurden mit Rosa26^{LSL-eYFP/LSL-eYFP}-Männchen zeitlich terminiert verpaart. Trächtigen Weibchen injizierten wir an Tag E8.5 75 µg/g Körpergewicht 4-Hydroxytamoxifen intraperitoneal. Zusätzlich applizierten wir 37,5 µg/g Körpergewicht Progesteron, um einen Tamoxifen-induzierten Abort zu unterbinden [99]. In Csf1r^{Mer-iCre-Mer/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}-Embryonen konnte es folglich zu einer zeitlich limitierten genetischen Rekombination kommen. Die Embryonen wurden an Tag E16.5 durchflusszytometrisch analysiert. Weitere Mäuse untersuchten wir im Alter von 3 und 6 Monaten durchflusszytometrisch sowie im Alter von 12 Monaten histologisch.

3.2.5 Tie2^{Mer-iCre-Mer/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}

In Mäusen des Genotyps Tie2^{Mer-iCre-Mer/WT} wurde eine Mer-iCre-Mer-Rekombinase (3.2.11) unter die Kontrolle des Tie2-Gens gestellt, das für den „Tie2 Tyrosine-protein kinase receptor“ (Tie2) codiert [100]. Tie2 wird von Endothelzellen, Vorläuferzellen im Dottersack, Zellen der AGM-Region, der fetalen Leber, sowie adulten HSCs exprimiert [31, 101, 102]. Tie2^{Mer-iCre-Mer/WT}-Weibchen wurden mit Rosa26^{LSL-eYFP/LSL-eYFP}-Männchen zeitlich terminiert verpaart. An Tag E7.5 respektive Tag E10.5 wurden 2,5 mg Tamoxifen sowie zur Unterbindung eines Tamoxifen-induzierten Aborts 1,75 mg

Progesteron intraperitoneal appliziert. In $Tie2^{Mer-iCre-Mer/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}$ -Embryonen konnte hierdurch eine zeitlich limitierte genetische Rekombination stattfinden. Im Alter von zwei Monaten wurde das Knochenmark der Tiere durchflusszytometrisch sowie deren Aorta immunfluoreszenzhistologisch analysiert. Die Versuchstierhaltung dieser Tiere sowie die durchflusszytometrische Analyse des Knochenmarks erfolgten durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Reimer Rodewald am Institut für Immunologie in Heidelberg.

3.2.6 $C-Kit^{Mer-Cre-Mer/WT}; Rosa26^{LSL-eGFP/WT}$

In Mäusen des Genotyps $c-kit^{Mer-iCre-Mer/WT}$ wurde eine Mer-iCre-Mer-Rekombinase (3.2.11) unter die Kontrolle des c-kit-Gens gestellt, das für die „tyrosine-protein kinase KIT“ (c-kit, CD117) codiert [97]. C-kit wird sowohl von EMPs als auch von embryofetalen sowie adulten HSCs – einschließlich jenen der Adventitia [103] – exprimiert [55]. Reife Blutzellen sowie Makrophagen exprimieren c-kit nicht mehr [102]. $C-Kit^{Mer-Cre-Mer/WT}$ -Weibchen wurden mit $Rosa26^{LSL-eGFP/WT}$ -Männchen verpaart. Mäuse der F1-Generation mit dem Genotyp $c-Kit^{Mer-Cre-Mer/WT}; Rosa26^{LSL-eGFP/WT}$ wurden im Alter von 6–8 Wochen über einen Zeitraum von 28 Tagen mit Tamoxifen-angereichertem Futter (400 mg/kg) gefüttert. Hierdurch konnte in diesen Tieren eine zeitlich limitierte genetische Rekombination stattfinden. Wir untersuchten im Anschluss die Aorta der Mäuse immunfluoreszenzhistologisch.

3.2.7 Genotypisierung

Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde nach Standardprotokollen der Hersteller (Tabelle 3) mit Material von $Myb^{flox/flox_-}$, $Csf1r^{Mer-iCre-Mer/WT_-}$, $c-kit^{Mer-Cre-Mer/WT_-}$, $Tie2^{Mer-iCre-Mer/WT_-}$ sowie $Flt3^{Cre/WT_-}$ -Mäusen durch labortechnische Assistenz durchgeführt.

3.2.8 Zeitlich terminierte Verpaarung

Da für Fate-mapping-Versuche (Abschnitt 3.2.11) die genaue Kenntnis des Alters der Embryonen nötig ist, wurden separat gehaltene Männchen und Weibchen zur Verpaarung abends um 18:00 Uhr zusammengesetzt. Nach 14 Stunden erfolgte die Trennung von Männchen und Weibchen sowie die Untersuchung der weiblichen Maus auf Bildung eines Vaginalpropfes. 13:00 Uhr am Tag der Kontrolle des Vaginalpropfes wurde als Zeitpunkt E0.5 festgelegt. Vor Injektion von 4-Hydroxytamoxifen respektive

Polyinosin-Polycytidyl-Säure (poly(I:C)) wurde die Schwangerschaft des Weibchens sonographisch bestätigt. Zur zusätzlichen Kontrolle des Alters bestimmten wir dieses durch die Beurteilung des embryonalen Entwicklungsstadiums anhand vorbeschriebener Entwicklungsspezifika [104].

3.2.9 Venöse Blutentnahme

Vor Beginn der Blutentnahme wurden die Mäuse zur Stressreduktion mit 5 Volumenprozent Isofluran und zusätzlichem Sauerstofffluss von 2 Litern pro Minute in einem Plexiglasrestrainer in Kurznarkose gelegt. Anschließend wurde eine der Schwanzvenen mittels einer 23-Gauge(G)-Kanüle punktiert, und es wurden jeweils maximal 100 Mikroliter (μ l) Blut entnommen.

3.2.10 Narkose

Die Narkose wurde zunächst mit Isofluran eingeleitet. Nach Erlöschen des Stellreflexes wurden in rascher Abfolge Medetomidin (0,5 Milligramm (mg)/Kilogramm (kg) Körpergewicht (KG)), Midazolam (5,0 mg/kg KG) sowie Fentanyl (0,05 mg/kg KG) unter Verwendung einer 30-G-Kanüle intraperitoneal appliziert. Um die Corneae vor Austrocknung zu schützen, wurde für die Dauer der Narkose Augensalbe aufgetragen. Zur Sicherstellung einer ausreichenden Narkosetiefe überprüften wir in regelmäßigen Abständen den Zwischenzehenreflex und dosierten bei Auslösbarkeit entsprechend nach.

3.2.11 Fate mapping

Die Funktionsweise der genetischen Methodik des fate mapping (auch „pulse labelling“ genannt) soll an dieser Stelle beispielhaft an Mäusen des Genotyps $Csf1^{Mer-iCre-Mer/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}$ erläutert werden.

Hierbei wird das Cre/loxP-System des Bakteriophagen P1 genutzt [105-107]. Die Cre-Rekombinase wird unter die Kontrolle eines ubiquitär exprimierten oder zelllinienspezifischen Genpromotors gestellt [108-110]. Als Rekombinase kann das konstitutiv aktive Cre-Protein (bzw. eine effizientere „improved Cre“ (iCre)-Variante [111]) verwendet werden. Alternativ kann man das Cre- respektive iCre-Protein an beiden Enden mit dem „murine estrogen receptor“ (Mer), der von (4-Hydroxy-)Tamoxifen, nicht jedoch von mauseigenem Östrogen gebunden werden kann, fusionieren (im Weiteren als Mer-iCre-Mer bezeichnet). Dies führt dazu, dass das Cre-Protein ohne gebundenem

(4-Hydroxy-)Tamoxifen sofort wieder abgebaut wird, während es mit gebundenem (4-Hydroxy-)Tamoxifen aktiv werden kann [112]. Sämtliche Cre-Varianten sind in der Lage, genetische Information, die zwischen zwei speziellen Basenpaarabfolgen, genannt loxP-Sequenzen, liegt, aus dem Genom herauszuschneiden [113]. Im Csf1r-Modell wurde eine Mer-iCre-Mer-Rekombinase unter die Kontrolle des Csf1r-Gens gestellt [89, 98]. Mäuse dieser Linie wurden mit einer sog. „Reporter-Linie“ verpaart, in der durch homologe Rekombination das Fluoreszenzprotein „enhanced yellow fluorescent protein“ (eYFP) in den ubiquitär exprimierten Rosa26-Genlocus eingebracht wurde (Abbildung 6 A). Vor die eYFP-Sequenz wurde ein von zwei loxP-Regionen

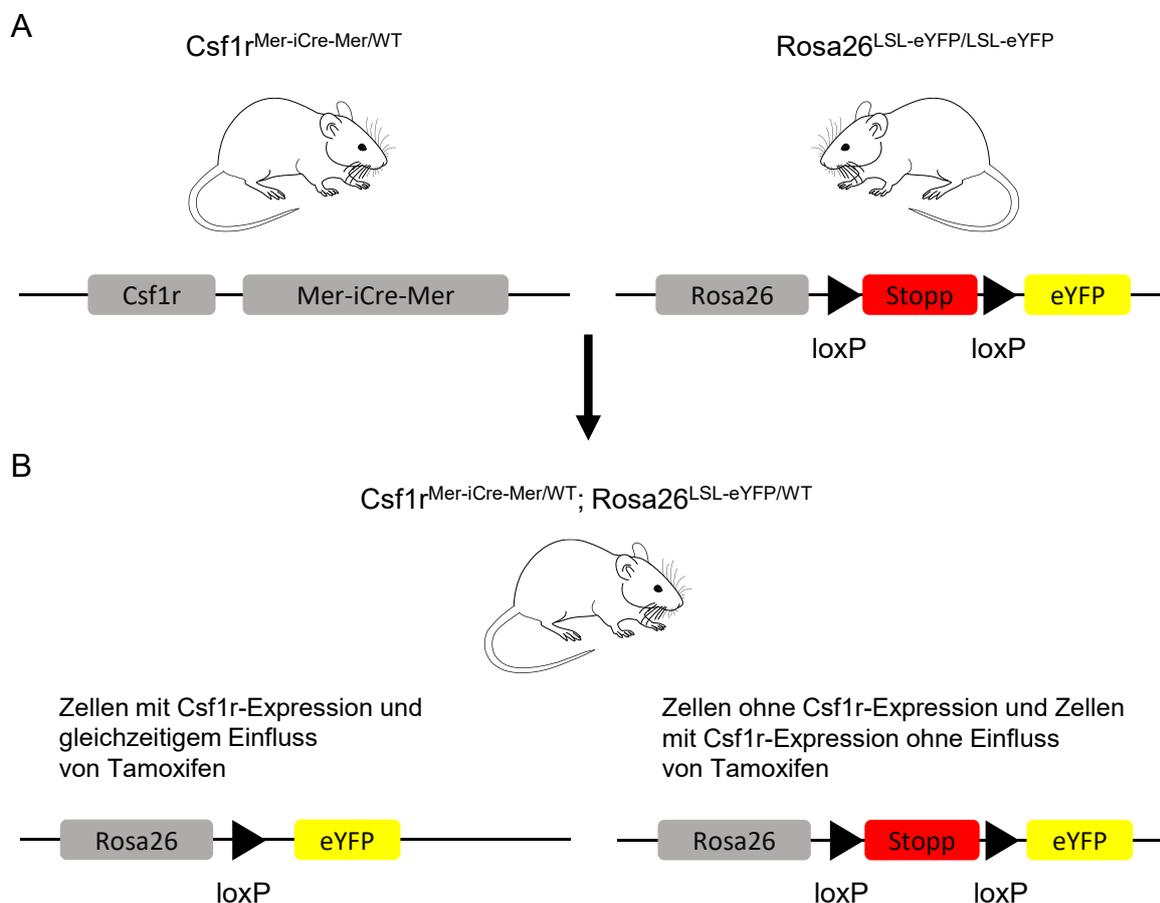


Abbildung 6: Funktionsweise von fate mapping am Beispiel des Csf1r-Modells

A: Verpaart werden Mäuse des Genotyps $Csf1r^{Mer-iCre-Mer/WT}$ mit Mäusen des Genotyps $Rosa26^{LSL-eYFP/LSL-eYFP}$. In Ersteren unterliegt die Expression einer tamoxifenabhängigen Cre-Rekombinase dem Promotor des Cfs1r-Gens. In Letzteren wurde eYFP in den Rosa26-Lokus eingebracht, der ubiquitär exprimiert wird. Ein eingebrachtes, loxP-flankiertes Stopcodon verhindert die Expression.

B: In Zellen, die Csf1r und damit die tamoxifenabhängige Cre-Rekombinase exprimieren kommt es in Anwesenheit von Tamoxifen zur Exzision des loxP-flankierten Stopcodons, was zur dauerhaften Expression von eYFP führt.

eingerahmtes Stopcodon eingebracht, das unter normalen Bedingungen die Expression von eYFP verhindert [95]. Führt man allerdings dem trächtigen Weibchen (4-Hydroxy-)Tamoxifen zu (enteral oder parenteral), so wird das Stopcodon in sämtlichen *Csf1r*-exprimierenden Zellen des Embryos herausgeschnitten (Abbildung 6 B). Ab diesem Zeitpunkt wird eYFP in jener Zelle sowie sämtlichen Abkömmlingen derselben exprimiert.

3.2.12 Detektion von Zellproliferation

Zur Detektion proliferierender Zellen verwendeten wir 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin (EdU). EdU ist ein Molekül, das bei DNA-Neusynthese (entsprechend auch bei Zellteilung) anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird [114]. EdU kann anschließend nicht-immunologisch durch eine chemische Zykoadditionsreaktion mit einem Fluorophor gekoppelt werden [115]. Im Fluoreszenz- respektive Konfokalmikroskop können proliferierende Zellen daraufhin durch Detektion des intranukleär lokalisierten Fluoreszenzsignals spezifisch identifiziert werden.

Bei der Applikation des EdU verwendeten wir ein standardisiertes Schema. 5 Tage vor Versuchsende (Tag -5) wurde den Tieren jeweils 1 mg EdU gelöst in 150 μ l Natriumchlorid (NaCl) 0.9 % intraperitoneal injiziert. Dies wurde an Tag -3 und Tag -1 in gleicher Dosierung wiederholt. Nach Anfertigung der Gefrierschnitte (Abschnitt 3.3.1) erfolgten die nötigen Schritte zur Durchführung der Zykoadditionsreaktion gemäß dem Standardprotokoll des Herstellers (Tabelle 3).

3.2.13 Bestrahlungsunabhängiges Knochenmarktransplantationsmodell

In Mäusen des Genotyps $Mx1^{Cre/WT}$ wurde die Cre-Rekombinase unter die Kontrolle des durch Interferonderivate induzierbaren *Mx1*-Promotors gestellt [116, 117]. Nach Applikation von Interferonderivaten wird somit auch die Cre-Rekombinase exprimiert. Alternativ kann man das günstigere poly(I:C) injizieren, das zur Freisetzung von Interferonen und anderen Zytokinen aus Immunzellen der Maus führt [91].

Mäuse des Genotyps $Mx1^{Cre/WT}$ wurden mit Mäusen des Genotyps $myb^{lox/lox}$, deren *myb*-Gen beidseitig von einer loxP-Sequenz flankiert ist, verpaart. Durch Poly(I:C)-Gabe kommt es in $Mx1^{Cre/WT}; Myb^{lox/lox}$ -Mäusen zur Exzision des *myb*-Gens aus der DNA. *Myb* ist essenziell für HSC-abhängige, nicht jedoch für EMP-abhängige Hämatopoese [25, 37, 118]. Folglich führt die *Myb*-Deletion zur konsekutiven Knochenmarksdepletion [93].

Mäusen des Genotyps $Mx1^{Cre/WT}$; $Myb^{flox/flox}$ mit der Leukozyten-Antigenvariante $CD45^{2/2}$ (entspricht der Standardvariante der C57BL/6-Linie) injizierten wir insgesamt zwischen 3 und 5 Mal alle 48 Stunden intraperitoneal poly(I:C) in einer Dosierung von $10 \mu\text{g/g KG}$. Zur Kompensation des Knochenmarkverlusts wurden den Mäusen am Tag nach der letzten Poly(I:C)-Injektion 1×10^7 Knochenmarkzellen von Mäusen des Genotyps $CD45^{1/1}$; $myb^{+/+}$ transplantiert (Abbildung 7). Per definitionem handelt es sich ab diesem Zeitpunkt um knochenmarkschimäre Mäuse. Der $CD45^{1/1}/CD45^{2/2}$ -Chimärismus wurde nach 28 Tagen durch durchflusszytometrische Erfassung des Anteils $CD45^{1/1}$ -positiver Monozyten an allen Monozyten im Blut bestimmt. Für die genaue Durchführung der Knochenmarksisolation und -transplantation verwendeten wir vorbeschriebene Protokolle [119].

Für weiterführende Versuche wurden ausschließlich Mäuse mit einem Anteil von 90 % oder mehr $CD45^{1/1}$ -Monozyten an allen Monozyten verwendet.

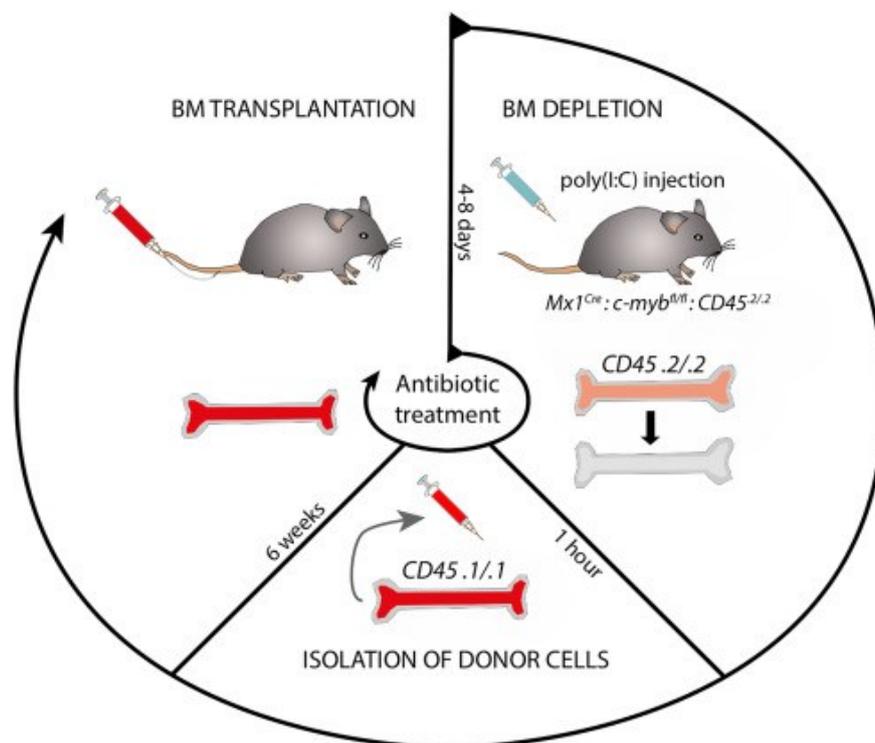


Abbildung 7: Etablierung knochenmarkschimärer Mäuse

Aus [119]. Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Copyright Clearance Center's RightsLink

3.2.14 Subkutane Implantation osmotischer Pumpen

Kontinuierliche Applikation von Angiotensin II über einen Zeitraum von 28 Tagen mittels eines subkutanen osmotischen Pumpensystems führt in Mäusen mit erhöhten sowie – in abgeschwächter Form – in Mäusen mit normwertigen LDL-Cholesterinwerten im Blut zur Verdickung der Gefäßwandmedia sowie zur Inflammation und Fibrosierung der Adventitia [120-125]. Des Weiteren kommt es zur vermehrten Entstehung von Gefäßwandaneurysmen [125-127]. Folglich stellt das Angiotensin II-Pumpenmodell ein etabliertes Modell für vaskuläre Inflammation und Fibrose dar.

Zur Vorbereitung der Pumpenimplantation befüllten wir die Pumpen der Tiere der Versuchsgruppe mit Angiotensin II in einer Dosierung von 18 ($\mu\text{g}/\text{kg KG}$)/min. Die Pumpen der Kontrollgruppe befüllten wir mit NaCl 0.9 %. Das Gesamtfüllvolumen betrug in beiden Gruppen 100 μl . Im Anschluss implantierten wir die Pumpe unter Narkose subkutan im kaudalen Nackenbereich in paralleler Ausrichtung zur Wirbelsäule zum optimalen Erhalt der Bewegungsfreiheit der Mäuse. Während der OP setzten wir Wärmeplatten zum Wärmeerhalt ein. Das Wohlbefinden der Tiere kontrollierten wir im Anschluss an die OP anhand von Score Sheets (Abbildung 5). Nach 10 respektive 28 Tagen wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Aorta immunfluoreszenzhistologisch (Abschnitt 3.3.1) sowie durchflusszytometrisch (Abschnitt 3.4.4) analysiert. Auf eine detaillierte Beschreibung der Pumpenimplantation inkl. Videoanleitung, nach der wir uns richteten, sei verwiesen [126].

3.3 Histologie

3.3.1 Entnahme der Aorta und Anfertigung von Gefrierschnitten

Unter terminaler Anästhesie wurde zunächst der linke Ventrikel der Mäuse mittels einer Flügelkanüle punktiert und dessen Spitze dort einliegend belassen. Hierüber perfundierten wir das Gefäßsystem der Mäuse mit insgesamt 30 ml Paraformaldehyd(PFA)-in-PBS-Lösung (4 %). Anschließend wurde die Aorta mithilfe eines OP-Mikroskops freipräpariert, vom Abgang aus dem Herzen bis zur Bifurkation in die *Arteriae iliacae communes* dargestellt, entnommen, in „phosphate buffered saline“ (PBS) gewaschen und unverzüglich für 30 Minuten in einem 15-ml-Falcon mit PFA-in-PBS-Lösung (4 %) fixiert. Nach anschließendem einmaligen Waschen mit PBS wurde die Aorta über Nacht in Sucrose-in-PBS-Lösung (30 %) bei +4 °C gelagert und am folgenden Morgen auf Trockeneis in ein auf Glykolen basierendes Medium (Tissue-Tek) eingebettet. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Mithilfe eines Kryomikrotoms wurden 12 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt (Kammer-, Objekt- und Messertemperatur jeweils -20 °C). Nach Aufnahme der Schnitte auf Objektträger wurden diese bei -20 °C zwischengelagert und für einen idealen Erhalt der Oberflächenantigene innerhalb einer Woche, meist jedoch bereits am folgenden Tag, weiterverarbeitet.

3.3.2 Masson-Trichrom-Färbung

Gefrierschnitte der Aorta der Mäuse aus Pumpenimplantationsversuchen wurden nach zehnminütiger Fixierung in Aceton und anschließendem Waschen in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) für 3 Minuten mit Eisenhämatozylinlösung nach Weigert bedeckt. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser zur Differenzierung gespült. Darauf färbten wir die Schnitte mit Goldner I- (für 5 min), Goldner II- (für 3 min) und abschließend Goldner III-Lösung (für 3 min), wobei diese nach jedem Arbeitsschritt mit 1 % Essigsäure 30 Sekunden lang gewaschen wurden. Es folgte dreifaches Waschen in ddH₂O und eine Behandlung der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe sowie Xylol (70 % Ethanol für 1 min, 96 % Ethanol für 2 min, 100 % Ethanol für 2 min, Xylol 100 für 2 min). Zum Schluss wurden die Objektträger unter Zuhilfenahme eines schnell härtenden Eindeckmediums (Eukitt) mit Deckgläsern bedeckt. Bis zur lichtmikroskopischen Analyse lagerten wir die Objektträger geschützt vor Lichtexposition bei Raumtemperatur.

3.3.3 Auflichtmikroskopische Analyse und Quantifizierung der Gefäßwand-fibrose

Mit einem computergesteuerten Auflichtmikroskop wurden bei 20-facher Vergrößerung Bilder von Masson-Trichrom-gefärbten Schnitten der Aorta aus Pumpenimplantationsversuchen aufgenommen. Die Quantifizierung des Fibrosegrades der Gefäßwand wurde wie folgt durchgeführt:

Zunächst maßen wir softwaregestützt anhand farblicher Schwellenwerte den Innendurchmesser der Aorta aus. Anschließend wurde – wiederum softwaregestützt – unter Verwendung adaptierter Schwellenwerte die Fläche der Media der Gefäßwand berechnet. Beide Werte wurden anschließend zueinander ins Verhältnis gesetzt und der sich daraus ergebene Quotient als quantitatives Maß für den Fibrosegrad der Aorta verwendet.

3.3.4 Immunfluoreszenzfärbung

Die bei -20 °C im Kühlschrank lagernden Gefrierschnitte wurden zunächst für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgewärmt und getrocknet. Es erfolgte eine Fixierung mit PFA-in-PBS-Lösung (4 %) für 15 Minuten und dreimaliges Waschen in Glasküvetten mit PBS-T. Die Gefrierschnitte wurden anschließend für eine Stunde mit einer Blockierlösung bestehend aus PBS, BSA, Saponin und Ziegenserum (Tabelle 2) bedeckt. Durch BSA und Ziegenserum werden unspezifische Bindungen der Antikörper reduziert („blocken“). Dies begünstigt eine spezifischere Färbung der Zielantigene. Saponin sorgt für eine weitere Permeabilisierung der Zellmembran, sodass intrazelluläre Epitope besser zugänglich werden [128]. Nach vorsichtigem Abpipettieren der aufliegenden Lösung wurden die Primärantikörper (Verdünnungen gemäß Tabelle 4) für eine Stunde auf die Präparate aufgebracht. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T wurden die Sekundärantikörper (Verdünnungen gemäß Tabelle 6) aufgebracht und für eine Stunde in einer lichtgeschützten Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne für drei Minuten mit dem DNA-anfärbenden Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 [129] gefärbt und die Objektträger erneut drei Mal in PBS gewaschen. Die Präparate wurden unter Verwendung eines Eindeckmediums, das das Ausbleichen der Fluorochrome verzögert, mit Deckgläsern bedeckt. Bis zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse, die wir innerhalb einer Woche, meist jedoch direkt am folgenden Tag, durchführten, wurden die gefärbten Präparate geschützt vor Lichtexposition bei -20 °C gelagert.

Anti-F4/80 verwendeten wir zur Detektion von Makrophagen [130-132]. Anti-GFP diente dem Nachweis von GFP bzw. YFP, da deren eigene Fluoreszenz meist nicht zur verlässlichen Detektion ausreicht. Mit jeder Färbung wurde stets auch eine Isotypenkontrolle mit passenden Antikörpern (Tabelle 5) sowie eine Negativkontrolle, bei der keine Primär-, sondern nur Sekundärantikörper aufgetragen wurden, durchgeführt.

3.3.5 Fluoreszenz- und konfokalmikroskopische Analyse

Nach Anregung der an Antikörper gekoppelten Fluorochrome durch eine Fluoreszenzlampe (Fluoreszenzmikroskop) oder Laser (Konfokalmikroskop) unterschiedlicher Wellenlängen können die von den Fluorochromen emittierten Photonen durch entsprechende Optik und Sensorik detektiert werden. Die Verwendung vor- sowie nachgeschalteter Filter gewährleistet dabei eine selektivere Signaldetektion. Wählt man die Fluorochrome entsprechend so aus, dass sich deren Anregungs- und Emissionsspektren möglichst wenig überlappen, können drei oder mehr Fluorochrome für die Färbung eines histologischen Schnittes verwendet werden.

Gefärbte Gefrierschnitte analysierten wir mit einem computergestützten Epifluoreszenzmikroskop. Mithilfe von Z-Stack-Technologie sowie softwaregestützter Errechnung einer gemeinsamen Schärfebene und Mosaik-Technologie wurden Aufnahmen der gesamten Aorta in 20-facher Vergrößerung angefertigt. Dabei wurden jeweils zwischen 10 und 30 Schnitte pro Versuchstier aus unterschiedlichen Abschnitten der Aorta aufgenommen und ausgewertet. Die Auszählung der Makrophagen der Aorta erfolgte manuell unter Verblindung. Repräsentative Aufnahmen für diese Dissertation fertigten wir, sofern nicht anders angegeben, mit einem Konfokalmikroskop an.

3.3.6 Bestimmung des Abstands von Makrophagen zur Gefäßmedia

In Gefrierschnitten der Aorta von Flt3^{Cre/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}-Mäusen bestimmten wir zunächst die Distanz jeder F4/80⁺-Zelle der Adventitia zur Media. Dies erfolgte durch Messen des kürzesten Abstands der Zelle zur nächstliegenden äußersten elastischen Faser (erkennbar an der starken Autofluoreszenz) der Gefäßmedia. Anschließend wurden diese Zellen auf ihr Flt3-Expressionsverhalten hin untersucht und die zuvor gemessenen Abstände in Abhängigkeit davon verglichen.

3.3.7 Untersuchung von Clusterbildung durch Makrophagen

Qualitativ untersuchten wir Clusterbildung, indem wir ein virtuelles Koordinatensystem über die angefertigten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Gefrierschnitten der Aorta von Flt3^{Cre/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}-Mäusen projizierten. So konnten die Makrophagen farblich codiert nach ihrem Flt3-Expressionsmuster als Datenpunkte in das Koordinatensystem eingetragen werden.

Für eine zusätzliche quantitative Analyse verglichen wir die minimalen Abstände zum jeweils nächstliegenden, im Flt3-Expressionsverhalten gleichartigen Makrophagen. Es wurden zunächst sämtliche F4/80⁺-Zellen markiert sowie deren X- und Y-Koordinaten aus dem virtuellen Koordinatensystem ausgelesen. Anschließend wurde für jede dieser Zellen bestimmt, ob sie Flt3⁺ oder Flt3⁻ ist. Anhand der X- und Y-Koordinaten und dem Satz des Pythagoras für rechtwinklige Dreiecke bestimmten wir für jede F4/80⁺-Zelle die Abstände dieser Zelle zu allen anderen F4/80⁺-Zellen mit gleichem Flt3-Expressionsprofil. Anschließend wurde der minimale Wert dieser Abstände verwendet und die gemittelten Abstände zwischen F4/80⁺Flt3⁺- und F4/80⁺Flt3⁻-Zellen verglichen.

3.4 Durchflusszytometrie

3.4.1 Aufbereitung des Blutes

Zunächst wurde den Mäusen Blut entnommen (Abschnitt 3.2.9). Das Blut wurde unverzüglich einer Zelllyse mit 3 ml Erythrozytenlysepuffer (Tabelle 3) unterzogen. Diese wurde nach 5 Minuten durch Hinzufügen von 4 ml EDTA in PBS (2×10^{-3} mol/l) abgestoppt. Bei unzureichendem Erfolg der ersten Zelllyse wurde eine zweite nach gleichem Procedere durchgeführt. Das Blut mit nun lysierten Erythrozyten wurde anschließend bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt.

3.4.2 Aufbereitung des Knochenmarks

Nach zervikaler Dislokation wurden den Mäusen beide Femora entnommen und diese durch Abtrennen der Epiphysen mit einem Skalpell eröffnet. Durch anschließendes Spülen mit 10 ml PBS wurde Knochenmarkmaterial gewonnen. Dieses siebten wir durch ein 40 μ m Zellsieb und zentrifugierten die Gewebesuspension für 7 Minuten bei 350 g. Die Durchführung der Erythrozytenlyse erfolgte wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben.

3.4.3 Aufbereitung der Leber

Nach zervikaler Dislokation wurde den Mäusen die Leber entnommen. Wir zerkleinerten diese zunächst mithilfe eines Skalpells und siebten das Gewebematerial anschließend durch ein 100- μ m-Zellsieb. Es folgte ein Verdau mit „Verdauungsenzymmix Leber“ (Tabelle 2) für 45 Minuten bei 37 °C. Nach Zentrifugation bei 350 g für 7 Minuten wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt.

3.4.4 Aufbereitung der Aorta adulter Tiere

Der linke Ventrikel der Mäuse wurde zunächst unter terminaler Anästhesie mittels einer Flügelkanüle punktiert und dessen Spitze dort einliegend belassen. Hierüber perfundierten wir das Gefäßsystem der Mäuse mit insgesamt 10 ml Heparin in PBS (500 Internationale Einheiten/ml). Anschließend wurde die Aorta wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben entnommen. Nach einmaligem Waschen in PBS wurde die Aorta für 12 Minuten bei einer Temperatur von 37 °C mit „Verdauungsenzymmix Adult I“ (Tabelle 2) angeaut. Im Anschluss wurde die Adventitia unter lichtmikroskopischer Kontrolle von Media und Intima abgezogen. Media und Intima wurden für weitere 40 Minuten bei

ebenfalls 37 °C einem Verdau mit „Verdauungsenzymmix Adult II“ (Tabelle 2) unterzogen. Adventitia respektive Media und Intima wurden separat mittels eines Spritzenkolbens durch 70- μ m-Zellsiebe gesiebt und die Zellsuspension bei 350 g für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig abgesaugt. Das hier beschriebene Protokoll stellt eine Modifikation vorbeschriebener Procedere dar [133].

3.4.5 Aufbereitung der Aorta von Embryonen

Die trächtigen Muttertiere wurden zunächst durch zervikale Dislokation getötet. Daraufhin wurden die Embryonen entnommen und deren Aorta gemäß Abschnitt 3.3.1 präpariert.

Nach einmaligem Waschen in PBS wurde die embryonale Aorta für 20 Minuten bei einer Temperatur von 37 °C mit „Verdauungsenzymmix Embryo“ (Tabelle 2) angedaut. Anschließend wurde das Gewebe mit einem Spritzenkolben durch ein 100- μ m-Zellsieb gesiebt und die Zellsuspension bei 350 g für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig abgesaugt.

3.4.6 Färbung der Proben

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die nach der Zentrifugation verbliebenen Zellpellets mithilfe einer Pipette in 1:50 verdünnten Anti-CD16/32(Fc γ RIII/II)-Antikörper aufgenommen und in 96-Well-Platten überführt. Hierdurch verhindert man die unspezifische Bindung an die Fc-Region von Antikörpern aus dem zu analysierenden Material, was selektivere Färbungen gewährleistet. Nach 15-minütiger Inkubation wurden die gemäß Tabelle 7 verdünnten Antikörper zugegeben und die Proben für weitere 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte zweimaliges Waschen in Durchflusszytometriepuffer (Tabelle 2) mit jeweiliger Zentrifugation bei 350 g für 7 Minuten.

3.4.7 Analyse und Zellsortierung

Die durchflusszytometrische Analyse sowie Zellsortierung wurde unter Anwendung von in Abbildung 8 und Abbildung 9 beschriebenen Gating-Strategien durchgeführt. Für Experimente, die auf Zellsortierung angewiesen sind, konnten die durch Gating ausgewählten Zellen anschließend in mit PBS gefüllte Mikroreaktionsgefäße sortiert werden.

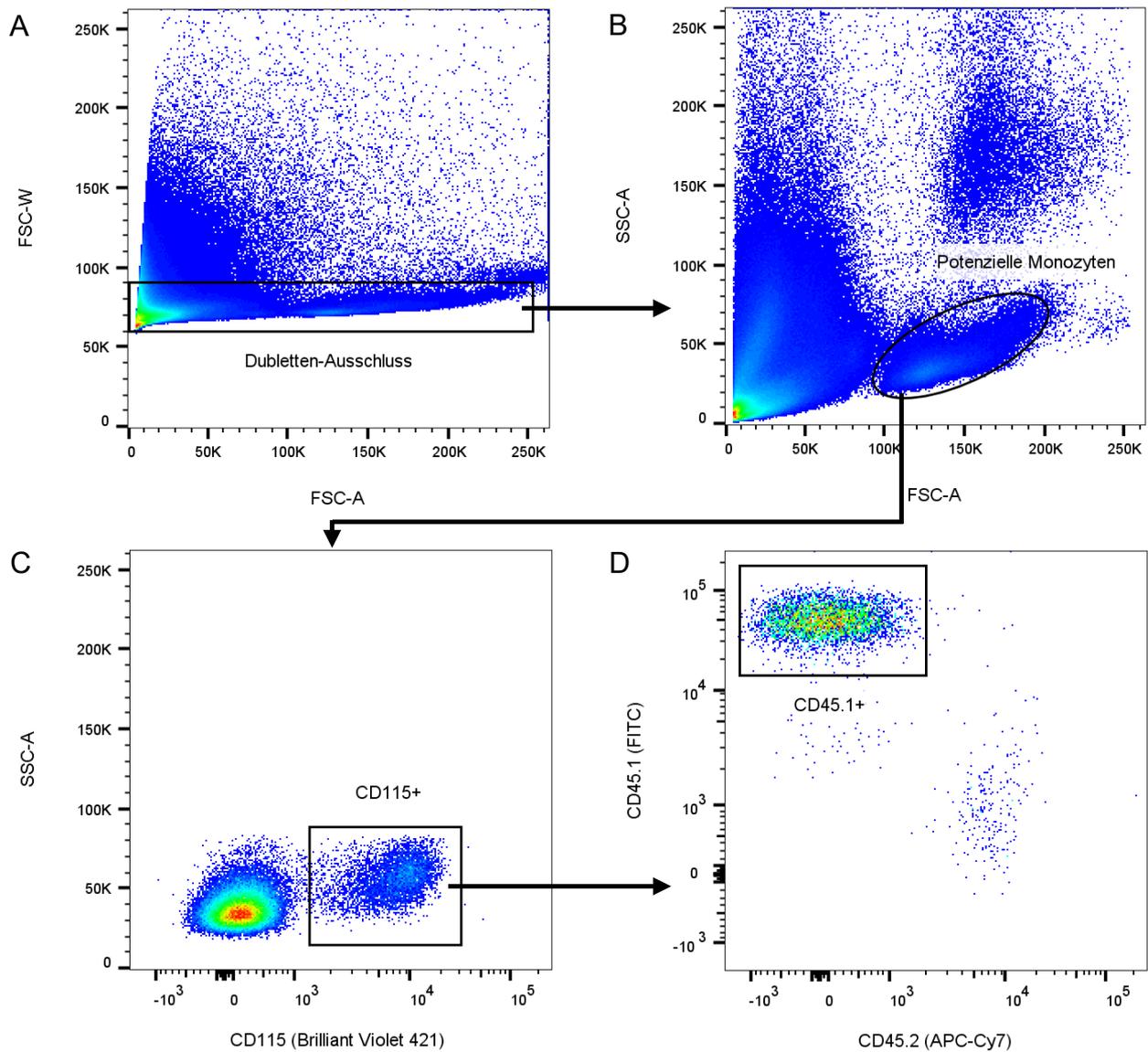


Abbildung 8: Gating-Strategie Blut

A: Durch Auftragen von FSC-W gegen FSC-A und entsprechendes Gating wurden zunächst Dubletten aus der Analyse ausgeschlossen.

B: Trägt man nun SSC-A gegen FSC-A auf, so kann man anhand der Granularität und Größe der Monozyten ein passendes Gate für diese erstellen. Durch Backgating-Strategien wurde dieses Gate stets auf Korrektheit überprüft.

C: CD115 (Csf1r) wurde in Proben des Blutes mit einem Antikörper markiert, an den Brilliant Violet 421 als Fluorochrom gebunden ist. Da CD115 im Blut nur auf Monozyten exprimiert ist, können so spezifisch Monozyten selektiert werden.

D: CD45.1 wurde mit einem FITC-gekoppelten Antikörper gefärbt. CD45.2 wurde mit einem APC-Cy7-gekoppelten Antikörper gefärbt. Es ist CD45.1 gegen CD45.2 aufgetragen und ein Gate auf die CD45.1⁺-Population der Makrophagen gelegt.

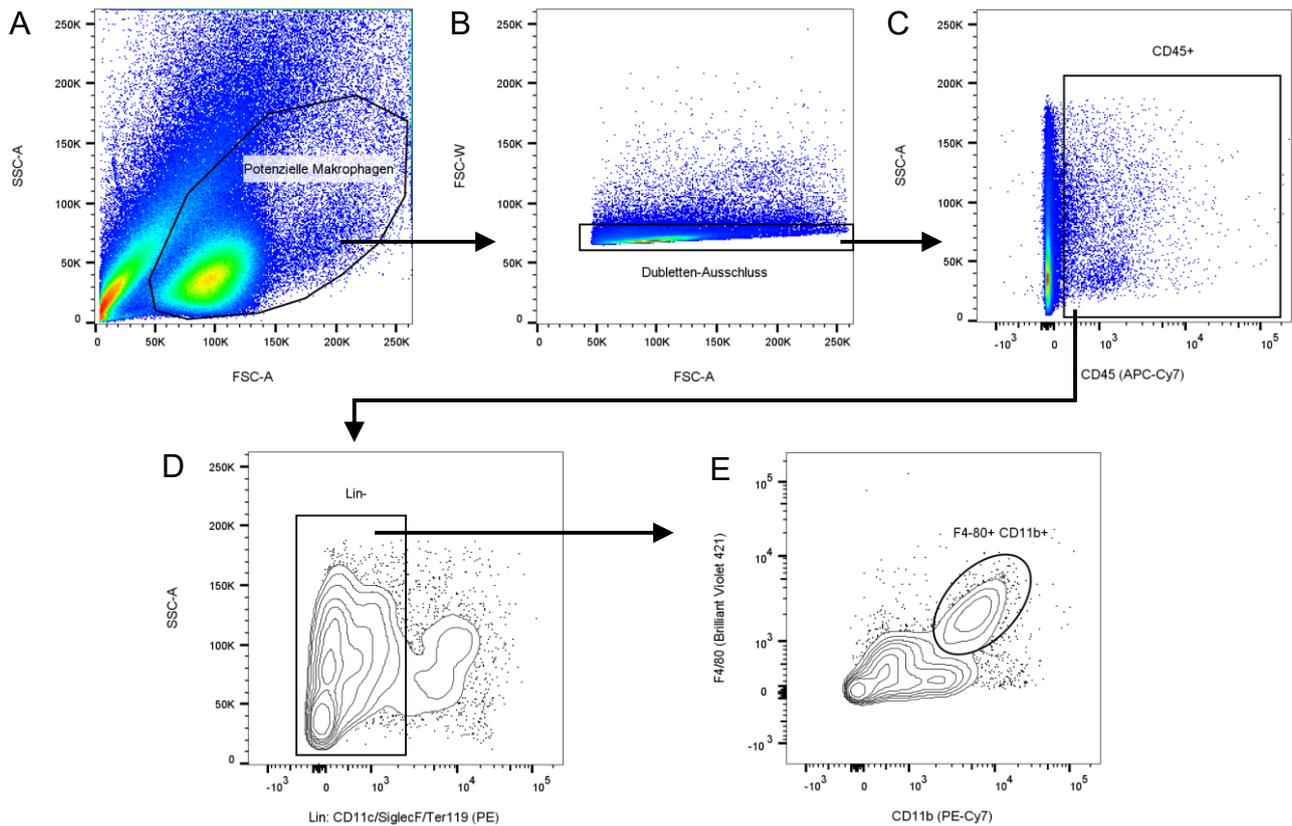


Abbildung 9: Gating-Strategie Aorta

A: Trägt man zunächst SSC-A gegen FSC-A auf, so kann man zunächst ein Gate erstellen, in welchem man die Aortenmakrophagen vermutet. Durch Backgating-Strategien wurde dieses Gate stets im Nachhinein auf Korrektheit überprüft.

B: Durch Auftragen von FSC-W gegen FSC-A und entsprechendes Gating wurden Dubletten aus der Analyse ausgeschlossen.

C: CD45 wurde mit einem Antikörper markiert, an den APC-Cy7 als Fluorochrom gebunden ist. Hierdurch können Leukozyten der Aorta für die Analyse ausgewählt werden.

D: Den sog. „Lineage“ (Lin)-Ausschluss führten wir durch PE-gekoppelte CD11c-, SiglecF-, sowie Ter119-Antikörper durch.

E: CD11b wurde mit einem PE-Cy7-gekoppelten Antikörper markiert. F4/80 wurde mit einem Antikörper markiert, an den Brilliant Violet 421 als Fluorochrom gebunden ist. Hierdurch kann ein Gate auf CD11b⁺F4/80⁺-Zellen gelegt werden.

Als Aortenmakrophagen definierten wir gemäß dieser Gating-Strategie CD45⁺Lin⁻CD11b⁺F4/80⁺-Zellen der Aorta.

3.5 Statistik

In den Diagrammen sind jeweils Mittelwert und der Standardfehler von diesem („standard error of the mean“) dargestellt. Statistische Signifikanz ist in allen Abbildungen gemäß Tabelle 12 gekennzeichnet. Zur Überprüfung der Normalverteilung wurde bei $n \geq 8$ der „D’Agostino & Pearson-Test“ sowie bei $n \geq 3$ der „Shapiro-Wilk-Test“ verwendet. Bei Normalverteilung wurde zum Vergleich zweier unverbundener Gruppen der zweiseitige „unpaired t-Test“ („student t-Test“) bzw. bei Vorliegen von unterschiedlichen Fallzahlen oder Varianzen der „Welch’s t-Test“ verwendet. Bei nicht parametrischer Verteilung wurde zum Vergleich zweier unverbundener Gruppen der „Mann-Whitney-Test“ verwendet. Zum Vergleich von mehr als zwei Stichproben wurde der einseitige oder zweiseitige „ANOVA-Test“ (wenn nötig mit „Brown-Forsythe and Welch“-Korrektur) angewendet. Für Mehrfachtestung wurde mit dem „Dunnet T3-Test“ oder „Sidak-Test“ korrigiert.

Sämtliche statistische Berechnungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism Version 8.4 durchgeführt.

Tabelle 12: Graphische Kennzeichnung statistischer Signifikanzniveaus

Kennzeichnung	Statistisches Signifikanzniveau
ns	$p > 0.05$
*	$p \leq 0.05$
**	$p \leq 0.01$
***	$p \leq 0.001$
****	$p \leq 0.0001$

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse I: Zweigeteilte Herkunft von Makrophagen der Aorta

4.1.1 Etablierung aortaler Makrophagenpopulationen durch *Csf1r*-exprimierende embryonale Vorläuferzellen

Zunächst untersuchten wir die Fragestellung, ob EMPs langlebige Makrophagenpopulationen in der Aorta etablieren. Hierfür markierten wir *Csf1r*^{Mer-iCre-Mer/WT}; *Rosa26*^{LSL-eYFP/WT}-Embryonen zum Zeitpunkt E8.5 durch intraperitoneale Injektion von 4-Hydroxytamoxifen in das trächtige Muttertier (Abbildung 10 A). In der

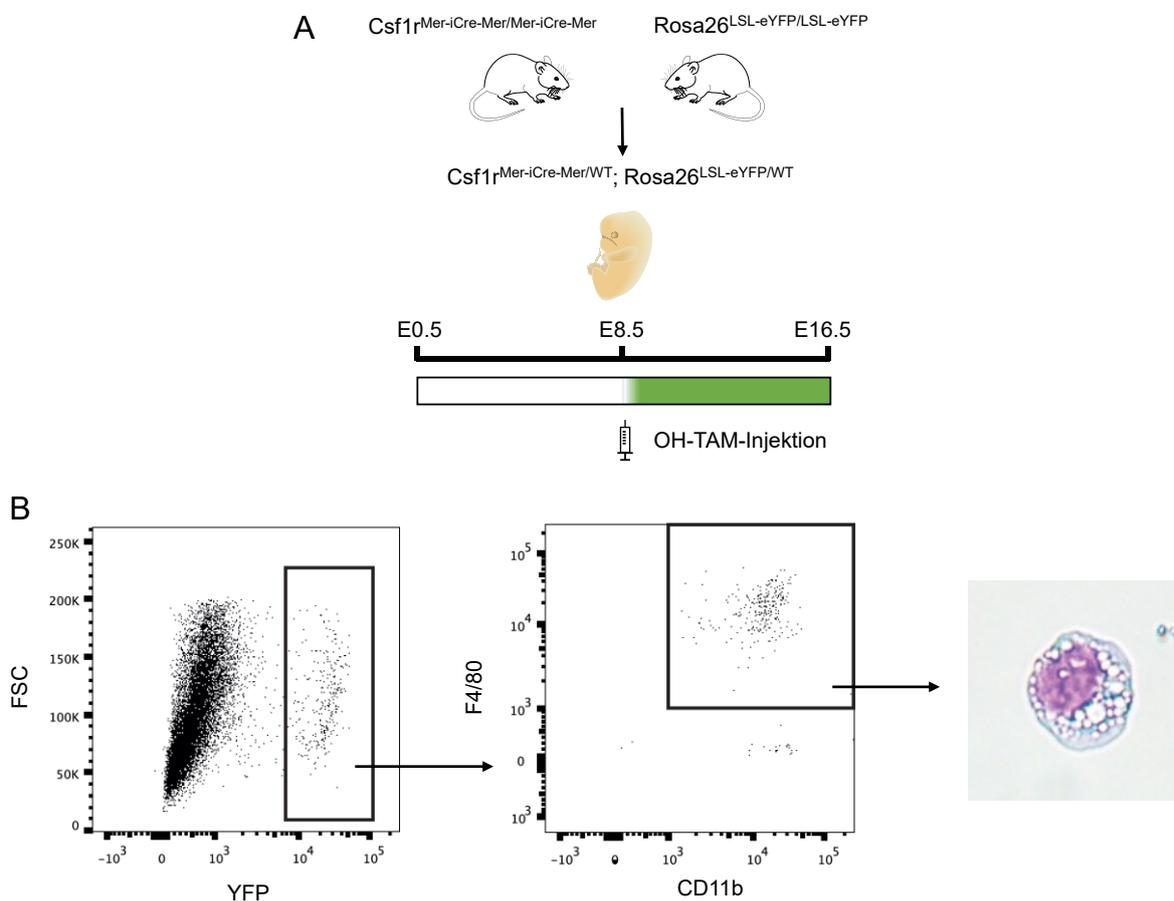


Abbildung 10: Nachweis von aus frühen *Csf1r*-abhängigen Vorläufern hervorgehenden Makrophagen in der Aorta von Embryonen

A: Skizze vom Versuchsablauf

B: Durchflusszytometrische Analyse der Aorta eines Embryos an Tag E16.5

Es wurde zunächst ein Gate auf *YFP*⁺-Zellen gelegt (links). Anschließend wurden mithilfe eines cell sorters *F4/80*⁺*CD11b*⁺-Zellen isoliert (Mitte). Die isolierten Zellen zeigten nach Durchführung einer May-Grünwald-Giemsa-Färbung lichtmikroskopisch die typische Morphologie von Makrophagen (rechts).

durchflusszytometrischen Analyse der Aorta der Embryonen zum Zeitpunkt E16.5 konnten wir $YFP^+F4/80^+$ -Zellen nachweisen. Diese isolierten wir durch durchflusszytometrische Zellsortierung und analysierten sie nach Durchführung einer May-Grünwald-

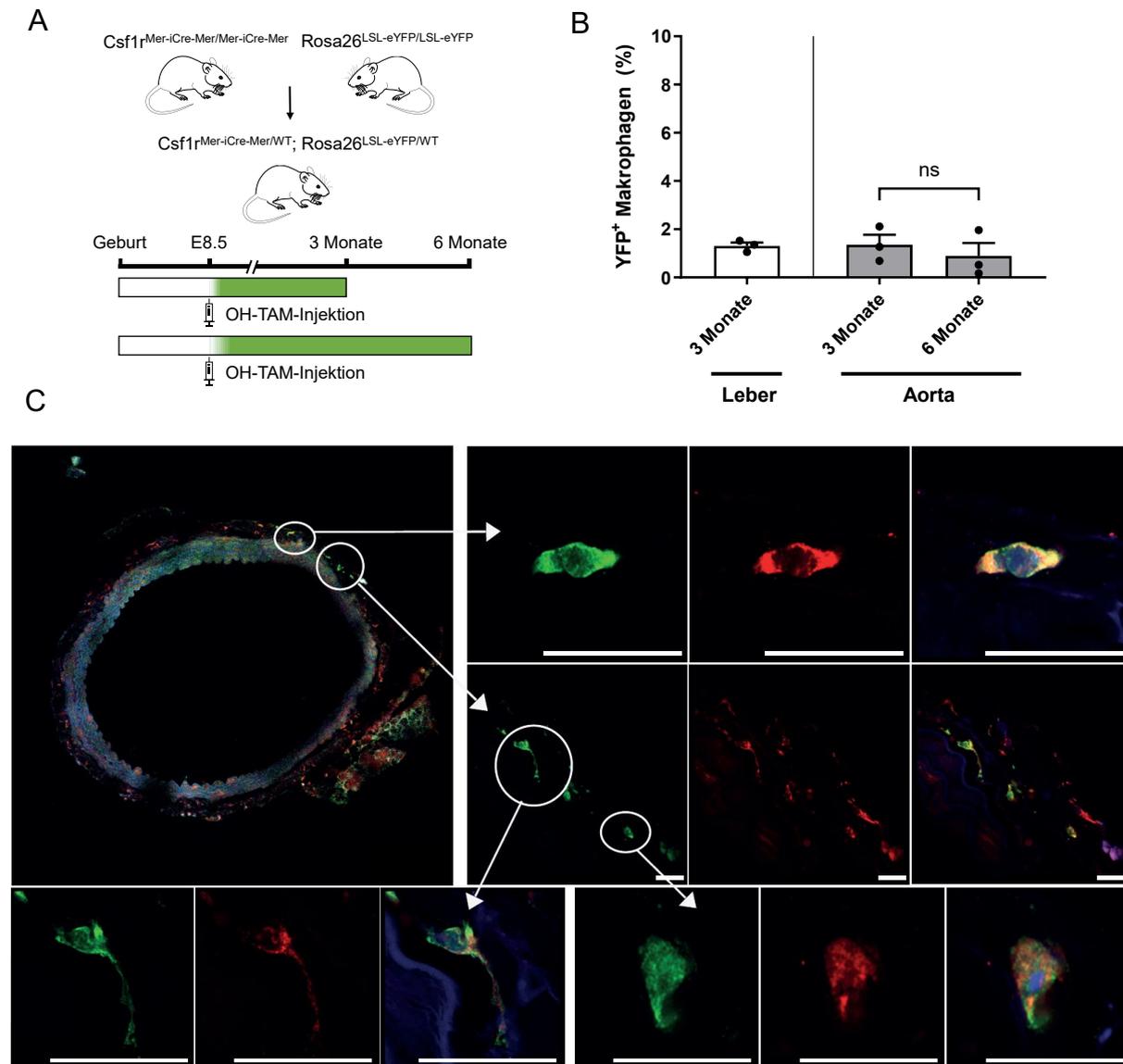


Abbildung 11: $Csf1r$ -abhängige embryonale Vorläuferzellen etablieren Makrophagenpopulationen in der Aorta adulter Mäuse.

A: Skizze vom Versuchsablauf

B: Durchflusszytometrische Analyse der Leber 3 Monate alter Mäuse (links, $n = 3$) sowie der Aorten von 3, bzw. 6 Monate alten Mäusen (rechts, $n = 3$). Der Anteil von YFP^+ -Makrophagen in der Leber ist mit $1,31 \pm 0,15\%$ etwa gleich hoch wie der von YFP^+ -Makrophagen in der Aorta (3 Monate: $1,36 \pm 0,41\%$, 6 Monate: $0,88 \pm 0,56\%$). Die Anteile von YFP^+ -Makrophagen in der Aorta nach 3, bzw. 6 Monaten zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,53$).

C: Konfokalmikroskopische Aufnahme der Aorta einer 12 Monate alten, an Tag E8.5 markierten $Csf1r^{Mer-iCre-Mer/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}$ -Maus. YFP: Grün; F4/80: Rot; DAPI: Blau.

Balken = 25 μm

Giemsa-Färbung im Auflichtmikroskop. Dabei wiesen die isolierten Zellen die für Makrophagen typische Morphologie auf (Abbildung 10 B). Unter Anwendung des gleichen Versuchsprotokolls untersuchten wir durchflusszytometrisch die Aorta von 3 respektive 6 Monate alten Mäusen des Genotyps $Csf1^{Mer-iCre-Mer/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}$. Zusätzlich analysierten wir die Leber von 3 Monate alten Tieren. Wie in Abbildung 11 B zu sehen ist, wiesen Aortenmakrophagen eine der Markierungsrate Kupfferscher Lebermakrophagen entsprechende YFP⁺ Markierungsrate von etwa 1 % auf (Leber 3 Monate: $1,31 \pm 0,15$ %, Aorta 3 Monate: $1,36 \pm 0,41$ %, Aorta 6 Monate: $0,88 \pm 0,56$ %). Zwischen der Markierungsrate in der Aorta von 3 Monate alten Tieren im Vergleich zu der in 6 Monate alten Tieren bestand kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,53$). In der dünn-schichtigen immunfluoreszenzhistologischen Aufarbeitung der Aorta einer 12 Monate alten, ebenfalls zum Zeitpunkt E8.5 markierten Maus gleichen Genotyps zeigten sich in der Adventitia YFP⁺ und somit von EMPs abstammende Makrophagenpopulationen verteilt über die gesamte Länge der Aorta (Abbildung 11 C). An dieser Stelle sei angemerkt, dass sich in unseren Versuchen Makrophagen fast ausschließlich innerhalb der Adventitia nachweisen ließen, was sich mit Observationen anderer Autoren deckt [134]. Im Weiteren beziehen sich die Aussagen über Makrophagen der Aorta deshalb primär auf Makrophagen der Adventitia der Aorta.

4.1.2 Beitrag von EMPs zum Aortenmakrophagenpool der adulten Maus

Um den Beitrag von EMPs zum Aortenmakrophagenpool der adulten Maus genauer bestimmen zu können, führten wir zwei Fate-mapping-Versuche mit Tieren des Genotyps $Tie2^{Mer-iCre-Mer/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}$ durch.

Im ersten Versuch erhielten die Muttertiere der Mäuse an Tag E7.5 intraperitoneal appliziertes 4-Hydroxytamoxifen. In der immunfluoreszenzhistologischen Untersuchung der Aorta von 2 Monate alten Tieren der F1-Generation zeigten sich $19,24 \pm 2,43$ % der Aortenmakrophagen YFP⁺. Gleichmaßen waren in der durchflusszytometrischen Analyse des Knochenmarks $16,53 \pm 3,68$ % der HSCs YFP⁺ (Abbildung 12 B).

Im zweiten Versuch erhielten die Muttertiere 4-Hydroxytamoxifen erst an Tag E10.5. Erneut analysierten wir Tiere der F1-Generation im Alter von 2 Monaten. Hierbei zeigten sich in der Aorta lediglich $4,16 \pm 0,67$ % der Makrophagen YFP⁺. Dieser Unterschied zum Vorwert war statistisch signifikant ($p = 0,001$). Im Gegensatz dazu blieb die durchflusszytometrisch ermittelte Markierungsrate von HSCs aus dem Knochenmark mit $16,86 \pm 3,32$ % konstant und unterschied sich nicht signifikant von jener aus

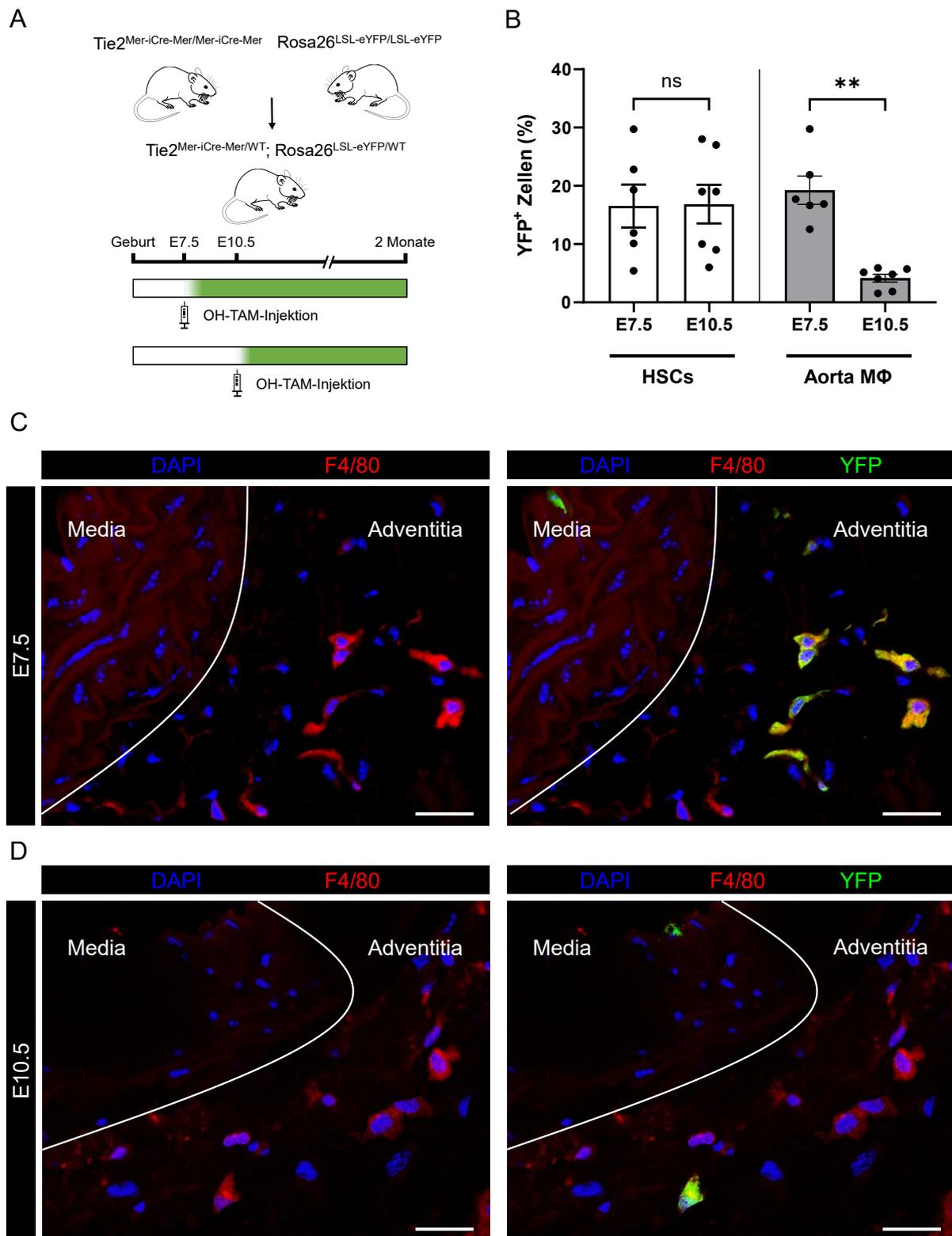


Abbildung 12: Beitrag von EMPs zum Aortenmakrophagenpool

A: Skizze vom Versuchsablauf. Die Versuchstierhaltung und Analyse der HSCs erfolgten durch die AG Rodewald am Institut für Immunologie in Heidelberg.

B: Der Anteil von YFP⁺-HSCs in der durchflusszytometrischen Analyse des Knochenmarks unterscheidet sich mit $16,53 \pm 3,68\%$ und $16,86 \pm 3,32\%$ nicht in Abhängigkeit vom Markierungszeitpunkt (links; $n_{E7.5} = 6$; $n_{E10.5} = 7$; $p = 0,95$). Der Anteil von YFP⁺-Makrophagen in der Aorta hingegen unterscheidet sich mit $19,24 \pm 2,43\%$ und $4,16 \pm 0,67\%$ statistisch signifikant in Abhängigkeit vom Markierungszeitpunkt (rechts; $n_{E7.5} = 6$; $n_{E10.5} = 7$; $p = 0,001$).

C, D: Konfokalmikroskopische Aufnahme der Aorta einer 2 Monate alten, an Tag E7.5 (C) bzw. Tag E10.5 (D) markierten $Tie2^{Mer-iCre-Mer/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}$ -Maus. Balken = 25 μm

dem vorherigen Versuch ($p = 0,95$; Abbildung 12 B).

Da ein biomolekulares Target, das spezifisch von EMPs abstammende Makrophagen markiert, bislang nicht bekannt ist, konsultierten wir für weitere Quantifizierungen sowie Charakterisierungen das Flt3-Modell.

4.1.3 Beitrag von HSCs zum Aortenmakrophagenpool der adulten Maus

Um die allgemeine Markierungseffizienz des Flt3-Modells zu ermitteln, bestimmten wir zunächst die Markierungsrate in Blutmonozyten, da Monozytenvorläuferzellen bekannter Weise Flt3 exprimieren [96]. In der durchflusszytometrischen Analyse des Blutes von 3 Monate alten Mäusen des Genotyps Flt3^{Cre/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT} waren $88,89 \pm 0,54$ % aller Monozyten YFP⁺ (Abbildung 13 B).

Zur Bestimmung des Beitrags von HSCs zum Aortenmakrophagenpool analysierten wir anschließend durchflusszytometrisch die Aorta von 3 Monate respektive 9 Monate alten Mäusen. Hierbei waren $49,11 \pm 2,93$ % respektive $45,50 \pm 4,06$ % der Aortenmakrophagen YFP⁺. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war nicht statistisch signifikant ($p = 0,49$).

Zur Überprüfung dieser Ergebnisse sowie der allgemeinen Validität der aortalen Durchflusszytometrie, die methodisch durch anspruchsvolle Präparation sowie geringe Zahlen analysierter Zellen gekennzeichnet ist, werteten wir zusätzlich die Aorta 9 Monate alter Mäuse immunfluoreszenzhistologisch aus. Abbildung 13 B zeigt, dass in der histologischen Aufarbeitung YFP⁺-Makrophagen $43,47 \pm 5,19$ % des Aortenmakrophagenpools begründen, was die Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie bestätigt.

Das Flt3-Modell ist jedoch nicht geeignet, Erkenntnisse über den dominierenden Mechanismus zum Erhalt einer konstanten Zahl an Aortenmakrophagen zu gewinnen. Aortenmakrophagen könnten sich einerseits durch lokale Proliferation erhalten, andererseits könnten sie kontinuierlich durch Einwanderung von Monozyten aus dem Knochenmark ersetzt werden.

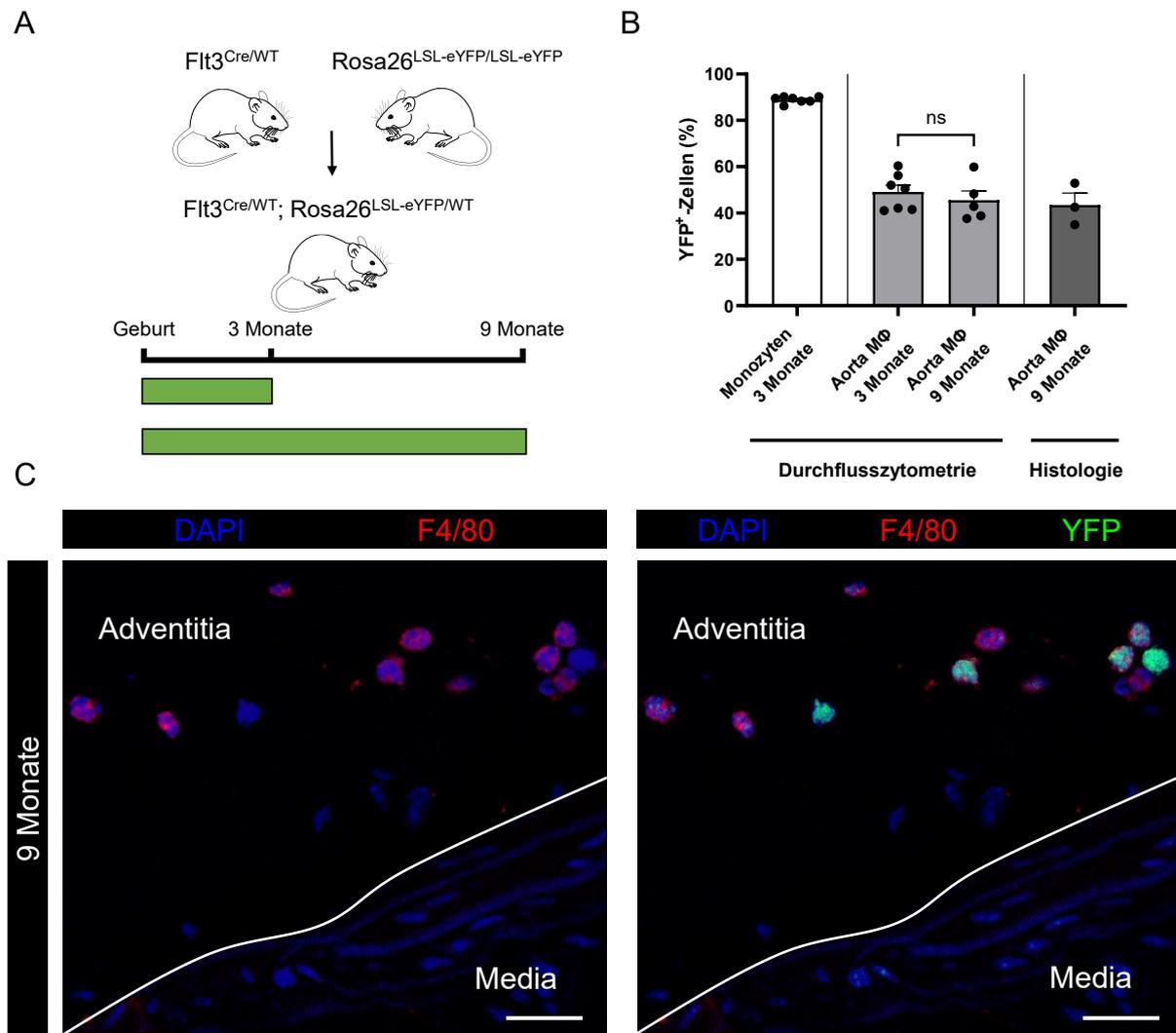


Abbildung 13: Beitrag von HSCs zum Aortenmakrophagenpool

A: Skizze vom Versuchsablauf

B: Unter den durchflusszytometrisch untersuchten Monozyten waren $88,89 \pm 0,54$ % YFP⁺ ($n = 7$). In 3 Monate ($n = 7$) bzw. 9 Monate ($n = 5$) alten Tieren waren $49,11 \pm 2,93$ % bzw. $45,50 \pm 4,06$ % der Aortenmakrophagen YFP⁺ (links). Der Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,49$). In histologisch analysierten Aorten von 9 Monate alten Tieren ($n = 3$) waren $43,47 \pm 5,19$ % der Makrophagen YFP⁺ (rechts).

C: Konfokalmikroskopische Aufnahme der Aorta einer 9 Monate alten Flt3^{Cre/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}-Maus (links ohne Darstellung von YFP). Balken = 20 μ m

4.1.4 Ersatz von Aortenmakrophagen durch Monozyten

Im nächsten Schritt untersuchten wir, in welchem Ausmaß Aortenmakrophagen in der adulten Maus unter physiologischen Bedingungen durch einwandernde Makrophagen-vorläufer wie Monozyten ersetzt werden.

Hierzu fütterten wir 6–8 Wochen alte Mäuse des Genotyps c-kit^{Mer-Cre-Mer/WT}; Rosa26^{LSL-eGFP/WT} für 28 Tage mit Tamoxifen-angereichertem Futter (Abschnitt 3.2.6).

In der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse des Blutes zeigten sich etwa $44,43 \pm 3,64$ % der Monozyten GFP⁺. Im Gegensatz dazu waren bei der histologischen Aufarbeitung der Aorta lediglich $4,30 \pm 0,73$ % der Makrophagen GFP⁺ (Abbildung 14 B). Da dieses Modell unter Monozyten des Blutes lediglich eine Markierungsrate von etwa 44% erreichte und es weiterhin Hinweise dafür gibt, dass in der Aorta selbst c-kit⁺ HSCs residieren [103], führten wir einen komplementären Versuch mit einem bestrahlungsunabhängigem Knochenmarkablationsmodell durch (Abschnitt 3.2.13).

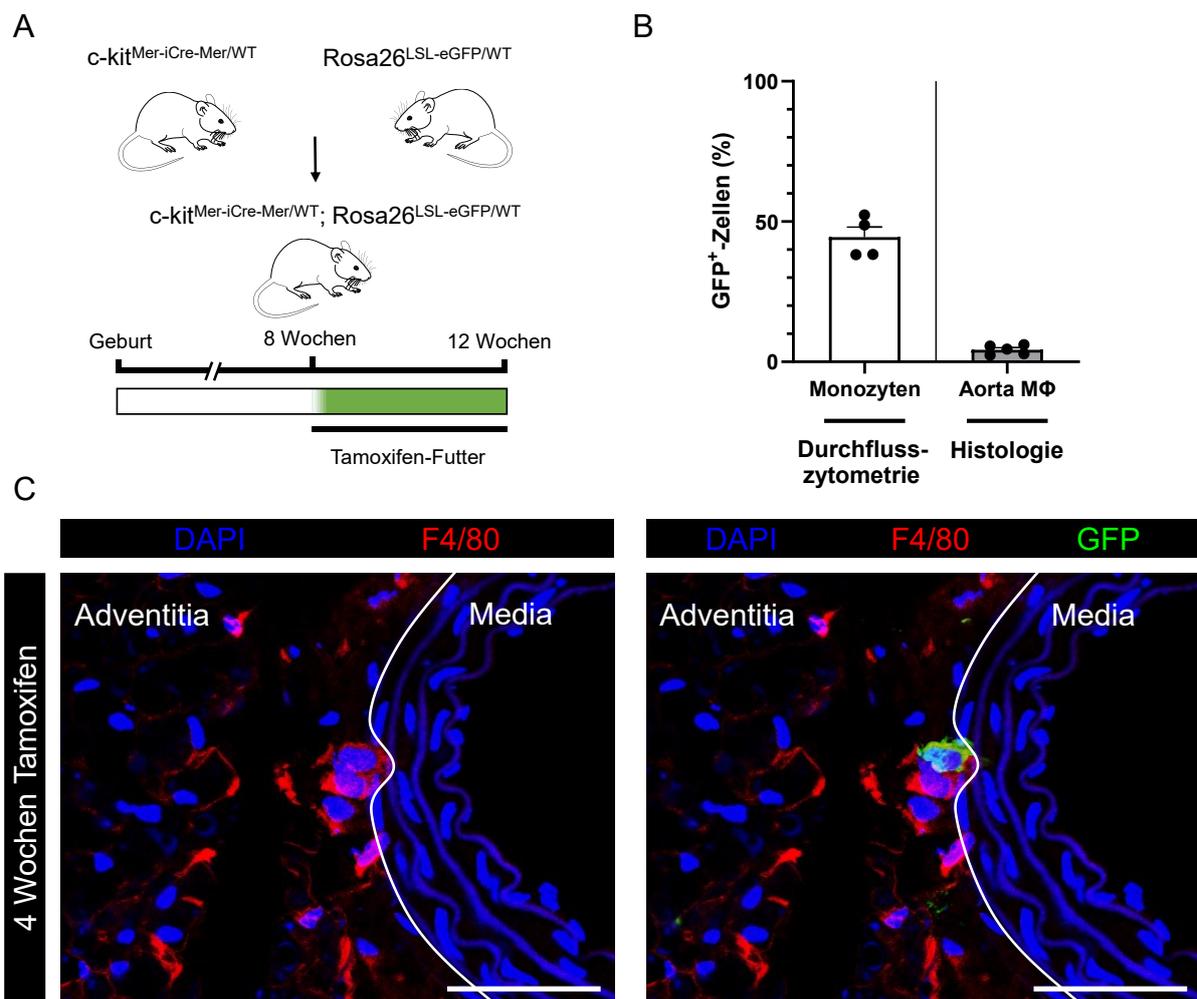


Abbildung 14: Ersatz von Aortenmakrophagen durch c-kit-abhängige Vorläuferzellen

A: Skizze vom Versuchsaufbau

B: In der durchflusszytometrischen Analyse waren $44,43 \pm 3,64$ % der Monozyten GFP⁺ (links; n = 4). In der immunfluoreszenzhistologischen Untersuchung waren $4,30 \pm 0,73$ % der Aortenmakrophagen GFP⁺ (rechts; n = 5).

C: Konfokalmikroskopische Aufnahme der Aorta einer 12 Wochen alten c-kit^{Mer-Cre-Mer/WT}; Rosa26^{LSL-eGFP/WT}-Maus, die zuvor für 28 Tage Tamoxifen-angereichertes Futter erhielt. Balken = 50 µm

Bei der 6 Wochen nach Knochenmarktransplantation durchgeführten durchflusszytometrischen Analyse des Blutes wiesen über $97,40 \pm 0,98$ % der Monozyten die Antigenvariante CD45^{1/1} auf. Als Einschlusskriterium für den weiteren Versuch wählten wir einen Monozytenchimärismus von über 90 %. 4 Wochen nach der Ermittlung des Chimärismus im Blut (folglich 10 Wochen nach Knochenmarkstransplantation) untersuchten wir immunfluoreszenzhistologisch die Aorta der Mäuse. Hierbei exprimierten etwa $7,52 \pm 2,52$ % der Aortenmakrophagen die CD45^{1/1}-Variante.

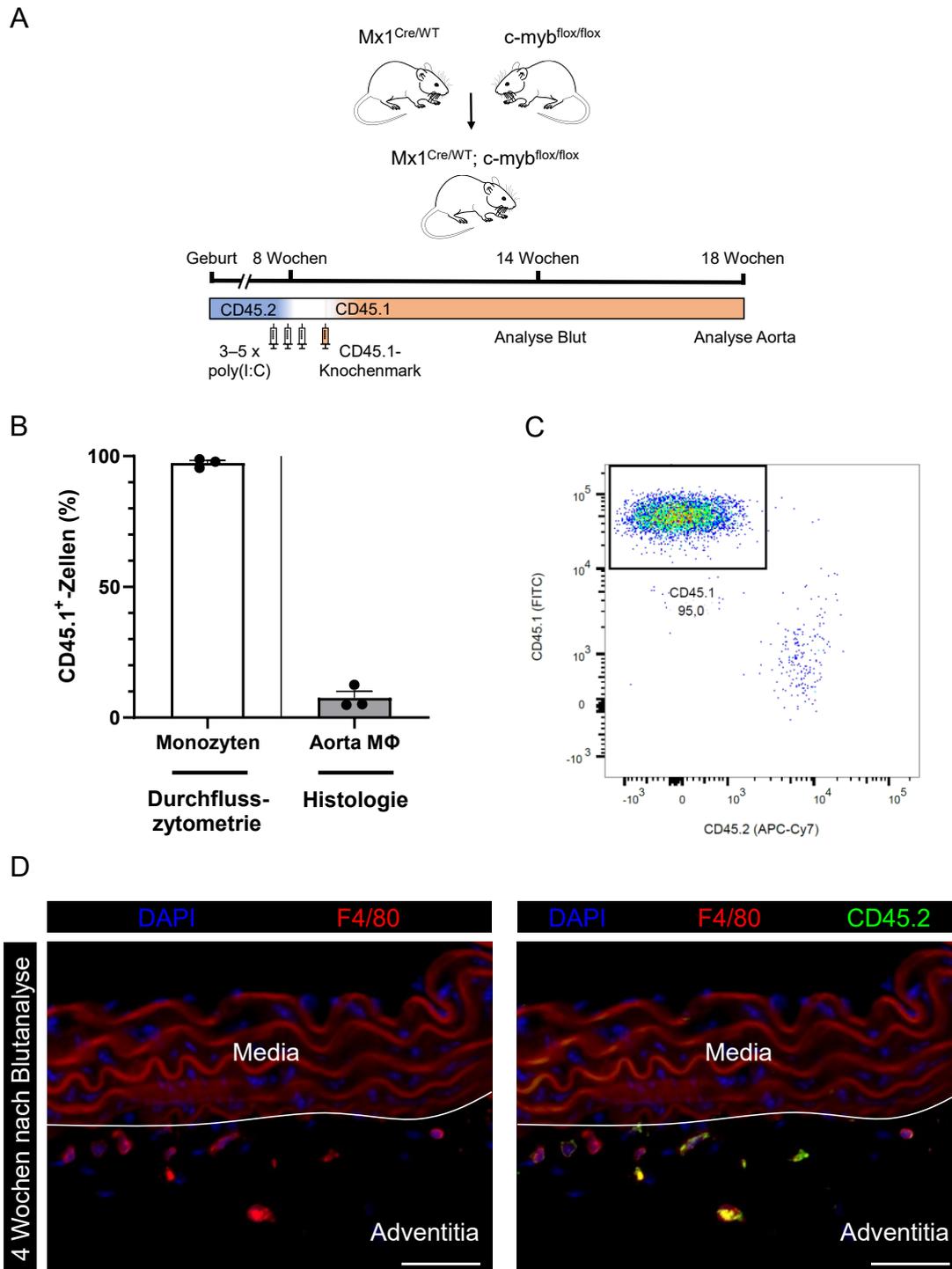


Abbildung 15: Ersatz von Aortenmakrophagen durch knochenmarkabhängige Zellen

A: Skizze vom Versuchsablauf

B: In der Durchflusszytometrie wiesen $97,40 \pm 0,98$ % der Monozyten des Blutes die CD45^{1/1}-Antigenvariante auf (links; $n = 3$). In der immunfluoreszenzhistologischen Untersuchung exponierten $7,52 \pm 2,52$ % der Makrophagen der Aorta das CD45^{1/1}-Antigen (rechts; $n = 3$).

C: Exemplarischer Durchflusszytometrie-Plot einer Blutanalyse (6 Wochen nach Knochenmarkstransplantation), in der CD45.1 gegen CD45.2 aufgetragen und ein Gate auf CD45.1-positive Monozyten gelegt wurde.

D: Konfokalmikroskopische Aufnahme der Aorta einer 18 Wochen alten Mx1Cre^{Cre/WT}; c-myb^{flox/flox}-Maus 10 Wochen nach Knochenmarkstransplantation (Cave: CD45.2 in Grün).

Balken = 50 μ m

4.1.5 Charakterisierung der zwei ontogenetisch unterschiedlichen Aortenmakrophagenpopulationen

Um die zwei distinkten Makrophagenpopulationen der Aorta weiter zu charakterisieren, untersuchten wir zum einen die Verteilung der Makrophagen entlang der Längsachse der Aorta sowie innerhalb der Gefäßwand, zum anderen die Lokalisation der Makrophagen in Relation zu den Makrophagen gleicher Herkunft im *Flt3^{Cre}/WT*; *Rosa26^{LSL-eYFP}/WT*-Modell.

Zunächst verglichen wir den Anteil *YFP⁺*-Makrophagen unterschiedlicher Abschnitte der Aorta. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abbildung 16).

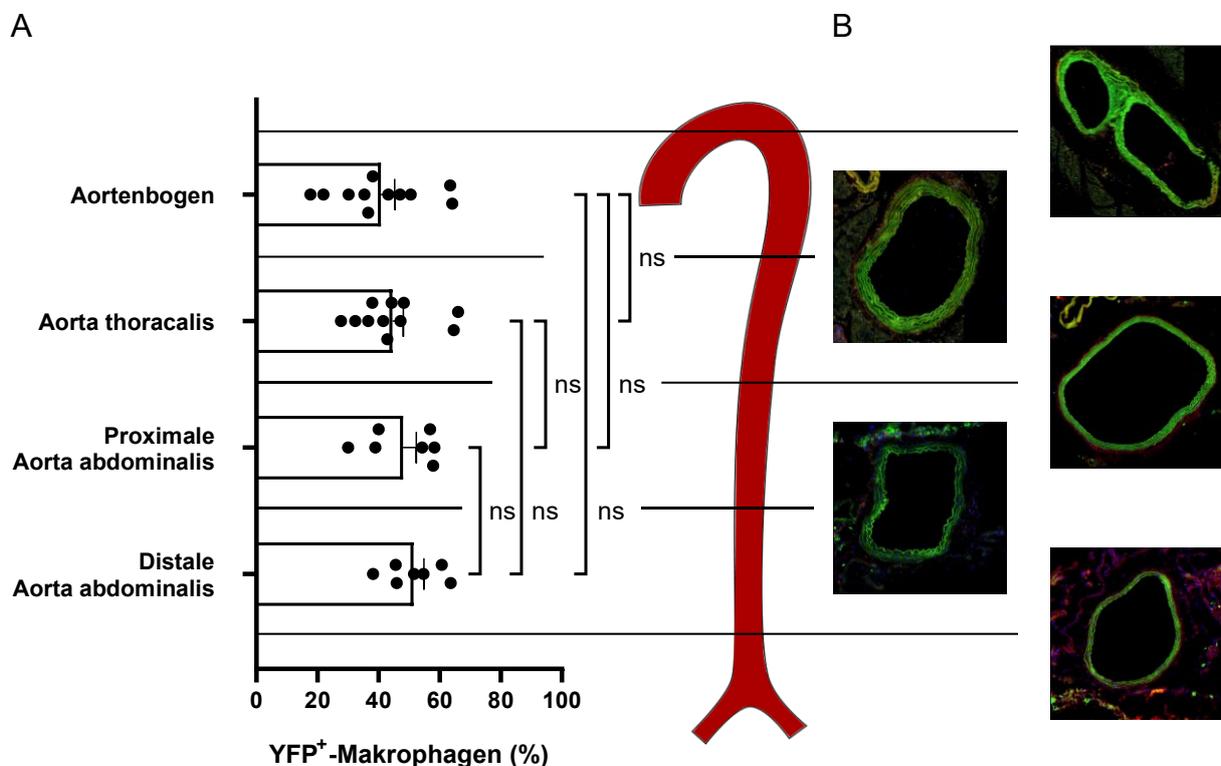


Abbildung 16: Verhältnisse der Makrophagenpopulationen entlang der Aorta im *Flt3^{Cre}/WT*; *Rosa26^{LSL-eYFP}/WT*-Modell

A: Zwischen den Anteilen *YFP⁺*-Makrophagen in Abhängigkeit von der Lokalisation entlang der Längsachse der Aorta besteht kein signifikanter Unterschied ($p = 0,29$; Ab: $40,77 \pm 4,52$ %; At: $44,51 \pm 3,61$ %; PAa: $48,05 \pm 4,34$ %; DAa: $51,49 \pm 3,40$ %; $p_{Ab \text{ vs. At}} = 0,99$; $p_{Ab \text{ vs. PAa}} = 0,81$; $p_{Ab \text{ vs. DAa}} = 0,35$; $p_{At \text{ vs. PAa}} = 0,99$; $p_{At \text{ vs. DAa}} = 0,66$; $p_{PAa \text{ vs. DAa}} = 0,99$).

B: Exemplarische epifluoreszenzmikroskopische Übersichtsbilder aus den entsprechenden Gefäßabschnitten. Rot: F4/80; Grün: YFP; Blau: DAPI. Man beachte die starke Autofluoreszenz der elastischen Fasern der Gefäßwand.

Ab = Aortenbogen, $n = 11$; At = Aorta thoracalis, $n = 11$; PAa = proximale Aorta abdominalis, $n = 7$; DAa = distale Aorta abdominalis, $n = 7$

Zur Beantwortung der Frage, ob sich im Flt3-Modell YFP⁻- bzw. YFP⁺-Makrophagen in ihrem Abstand zum Gefäßinneren unterscheiden, wurde der minimale Abstand jedes Makrophagen zur Media bestimmt (3.3.6, Abbildung 17 A). Mit $82,09 \pm 3,55 \mu\text{m}$ respektive $89,98 \pm 4,64 \mu\text{m}$ zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen ($p = 0,35$).

Abschließend untersuchten wir die Verteilung der Aortenmakrophagen zueinander, um potenzielles, von der Herkunft abhängiges Clustering entdecken zu können. Hierzu

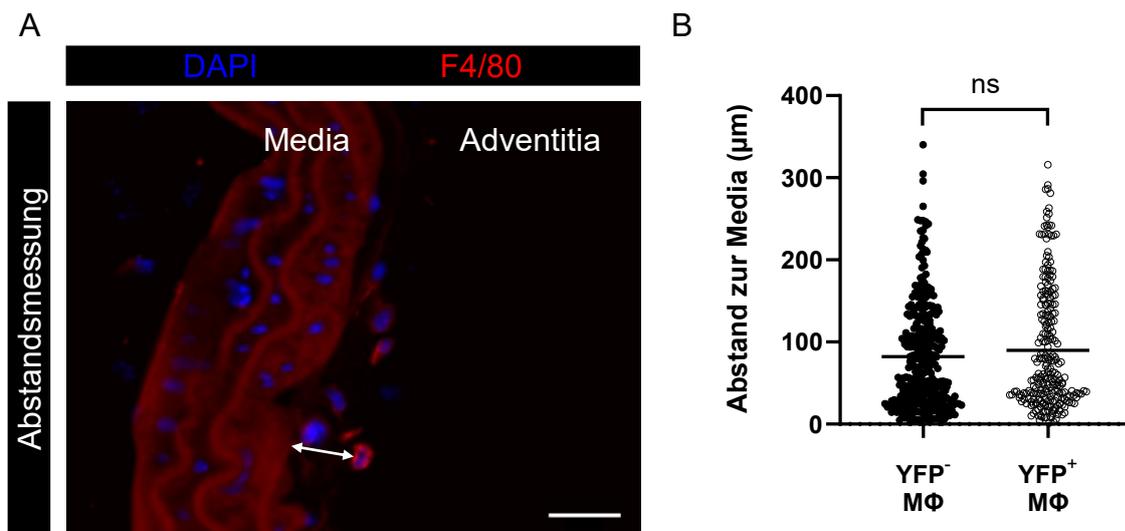


Abbildung 17: Lokalisation der Makrophagen in der Gefäßwand in Abhängigkeit der Herkunft im $Flt3^{Cre/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}$ -Modell

A: Exemplarische Messung des Abstands eines Makrophagen zur Media

B: YFP⁻-Makrophagen ($n = 330$) und YFP⁺-Makrophagen ($n = 251$) unterscheiden sich nicht statistisch signifikant im Abstand zur Gefäßmedia ($82,09 \pm 3,55 \mu\text{m}$ vs. $89,98 \pm 4,64 \mu\text{m}$; $p = 0,35$). Balken = $25 \mu\text{m}$

wurden die Positionen der Aortenmakrophagen in ein XY-Koordinatensystem übertragen, und die ontogenetische Zugehörigkeit wurde farblich codiert dargestellt. Wie in Abbildung 18 A zu sehen ist, zeigte sich kein offensichtliches Clustering.

Wir führten anschließend eine Quantifizierung durch, indem wir den minimalen Abstand zum jeweils nächsten ontogenetisch gleichartigen Makrophagen bestimmten und verglichen (Abschnitt 3.3.7). Hierbei bestand mit $125,5 \pm 14,08 \mu\text{m}$ respektive $121,8 \pm 16,82 \mu\text{m}$ kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen YFP⁺- und YFP⁻-Makrophagen ($p = 0,47$; Abbildung 18 B).

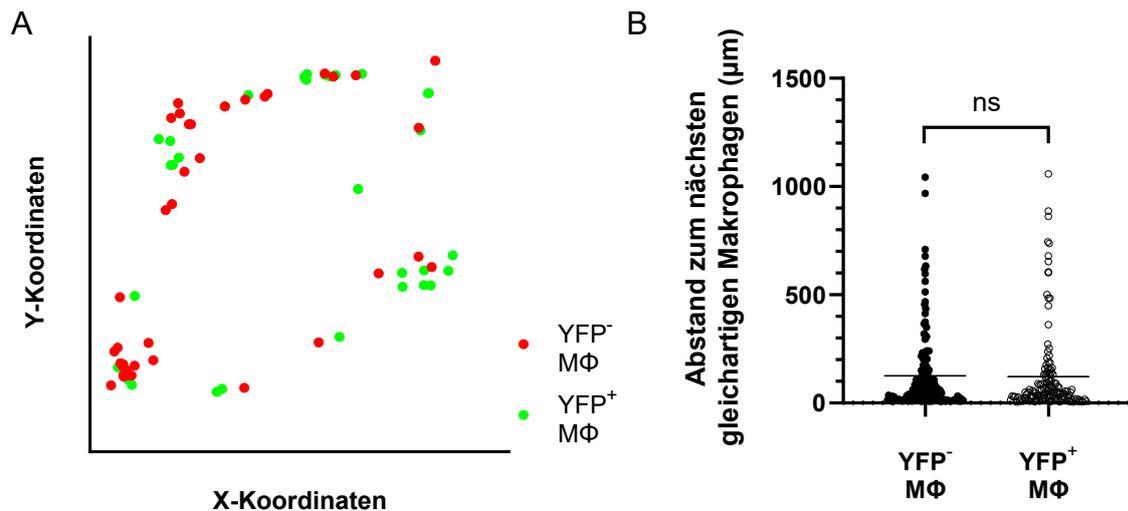


Abbildung 18: Verteilung der Aortenmakrophagen in Relation zu Makrophagen gleichartiger Herkunft im $Flt3^{Cre/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}$ -Modell

A: Exemplarische Darstellung des XY-Koordinatensystems, in das die Positionen der Makrophagen im Querschnitt der Aorta eingetragen wurden.

B: Im geringsten Abstand eines Aortenmakrophagen zum nächsten, im YFP-Expressionsmuster gleichartigen, Makrophagen bestand mit $125,5 \pm 14,08 \mu\text{m}$ ($n = 160$) bzw. $121,8 \pm 16,82 \mu\text{m}$ ($n = 137$) kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,47$).

4.2 Ergebnisse II: Reaktion der zwei Aortenmakrophagenpopulationen auf Angiotensin-induzierte Inflammation

4.2.1 Vasculäre Fibrose und erhöhte Aortenmakrophagenanzahl im Angiotensin II-Modell

Zunächst untersuchten wir, ob das Angiotensin II-Modell in den Versuchstieren zu den zu erwartenden inflammatorisch-fibrotischen Veränderungen führte.

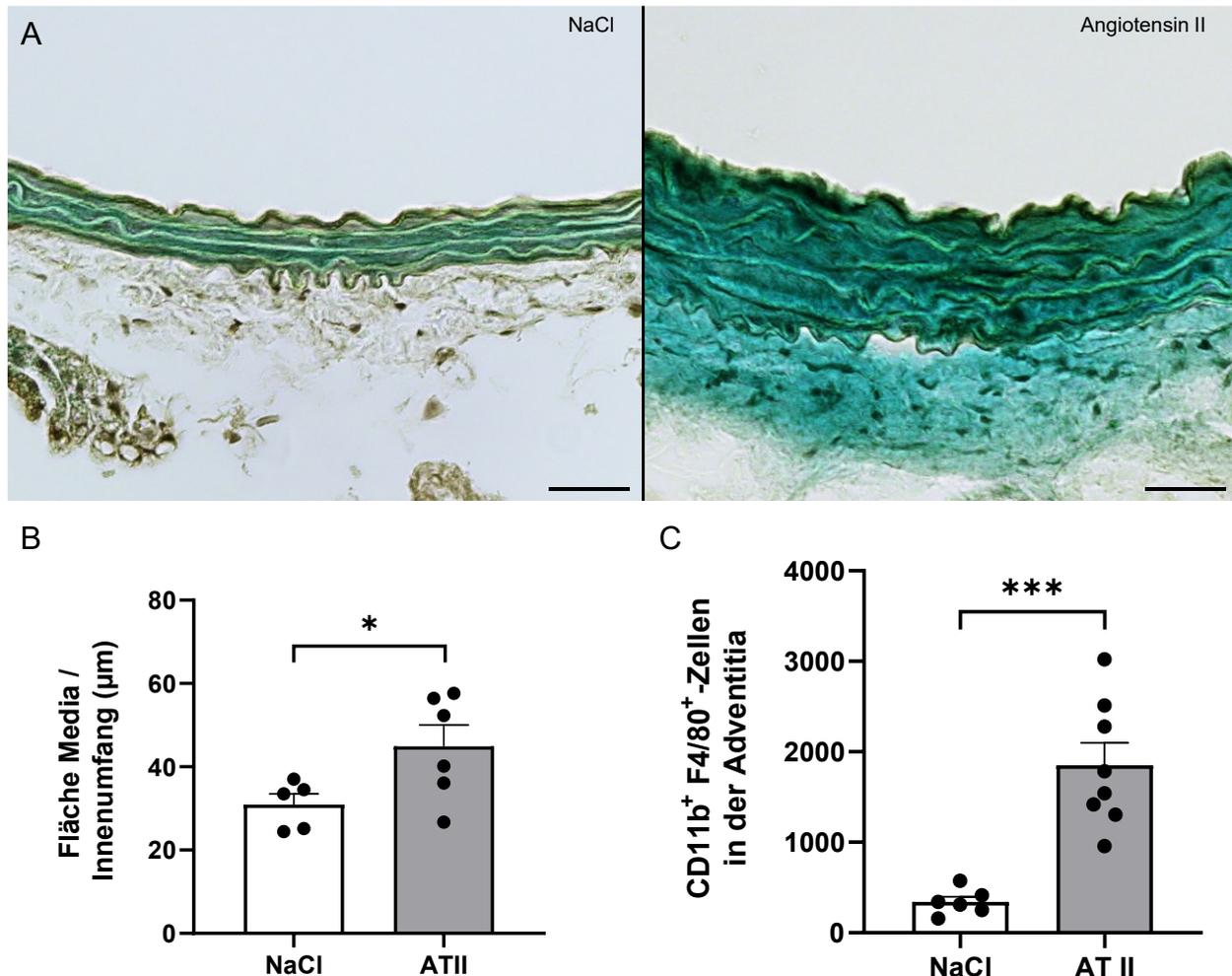


Abbildung 19: Fibrose und Inflammation im Angiotensin II-Modell

A: Auflichtmikroskopischer Vergleich von Masson-Trichrom gefärbten Schnitten der Aorta. In der Aorta der mit Angiotensin II behandelten Maus (rechts) erkennt man eine verdickte Media sowie vermehrt kollagenes Bindegewebe in der Adventitia. Balken = 35 µm

B: Der Quotient aus Fläche der Media in µm² geteilt durch den Innenumfang des Gefäßes in µm ist in mit Angiotensin II behandelten Mäusen mit 44,90 ± 5,11 µm (n = 6) signifikant größer als in mit NaCl behandelten Mäusen (30,92 ± 2,56 µm; n = 5; p = 0,04).

C: In der Aortenwand von mit Angiotensin II behandelten Mäusen zeigte sich mit 1852,00 ± 245,30 Makrophagen (n = 8) eine signifikant erhöhte Anzahl an Aortenmakrophagen im Vergleich zu mit NaCl behandelten Mäusen (341,50 ± 58,25 Makrophagen, n = 6, p = 0,0004).

Abbildung 19 A zeigt vergleichend die Masson-Trichrom-gefärbte Aorta von Mäusen 28 Tage nach Implantation von Angiotensin II- respektive NaCl-gefüllten Pumpen. Man erkennt, dass es in der Angiotensin II-Gruppe zu einer Vermehrung kollagener Fasern sowohl in der Media als auch der Adventitia kommt. Die gemäß Abschnitt 3.3.3 durchgeführte quantitative Analyse belegt, dass sich die Quotienten Media-Fläche/Innenumfang mit $30,92 \pm 2,56 \mu\text{m}$ (NaCl) und $44,90 \pm 5,11 \mu\text{m}$ (Angiotensin II) statistisch signifikant unterscheiden ($p = 0,04$, Abbildung 19 B).

Weiterhin konnten wir bei mit Angiotensin II behandelten Mäusen durchflusszytometrisch mit $1852,00 \pm 245,30$ (Angiotensin II) im Vergleich zu $341,50 \pm 58,25$ (NaCl) Makrophagen eine Akkumulation von Makrophagen in der aortalen Gefäßwand feststellen ($p = 0,0004$, Abbildung 19 C).

Ferner beobachteten wir die vereinzelte Entstehung von Bauchaortenaneurysmen bei mit Angiotensin II behandelten Tieren, nicht jedoch in Tieren der Kontrollgruppe (Abbildung 20).

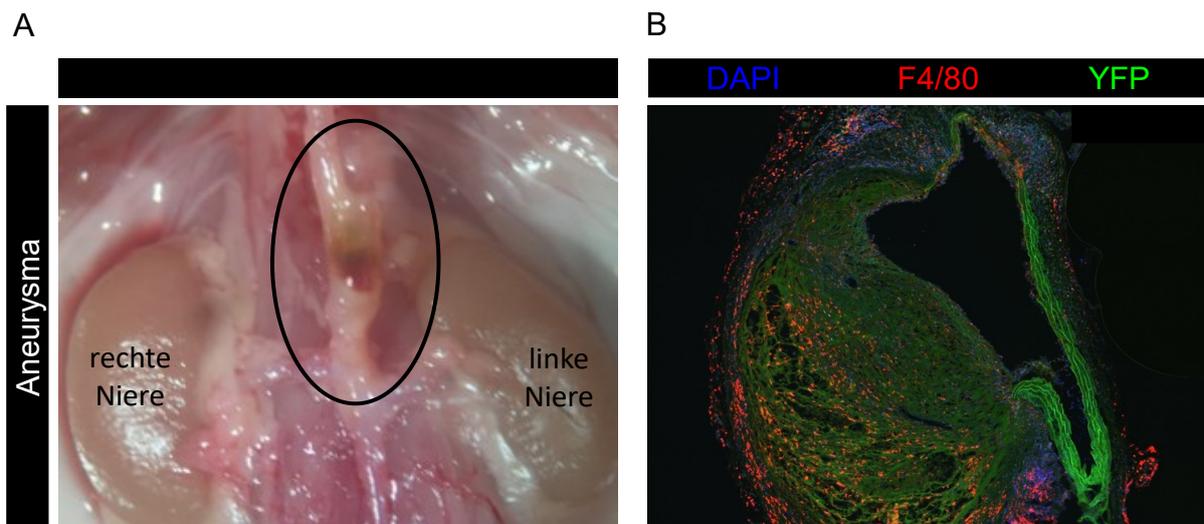


Abbildung 20: Ausbildung von Aneurysmen im Angiotensin II-Modell

A: Makroskopische Aufnahme eines in der Angiotensin II-Gruppe entstandenen suprarenalen Bauchaortenaneurysmas.

B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme desselben Aneurysmas. Aufgrund starker Autofluoreszenz waren die Aneurysmen immunfluoreszenzhistologisch nicht weiter auswertbar.

4.2.2 Akute Reaktion der Aortenmakrophagen auf Inflammation und Fibrose

Im nächsten Schritt untersuchten wir die Akutreaktion der Aortenmakrophagen auf die durch kontinuierliche Angiotensin II-Applikation ausgelösten Veränderungen.

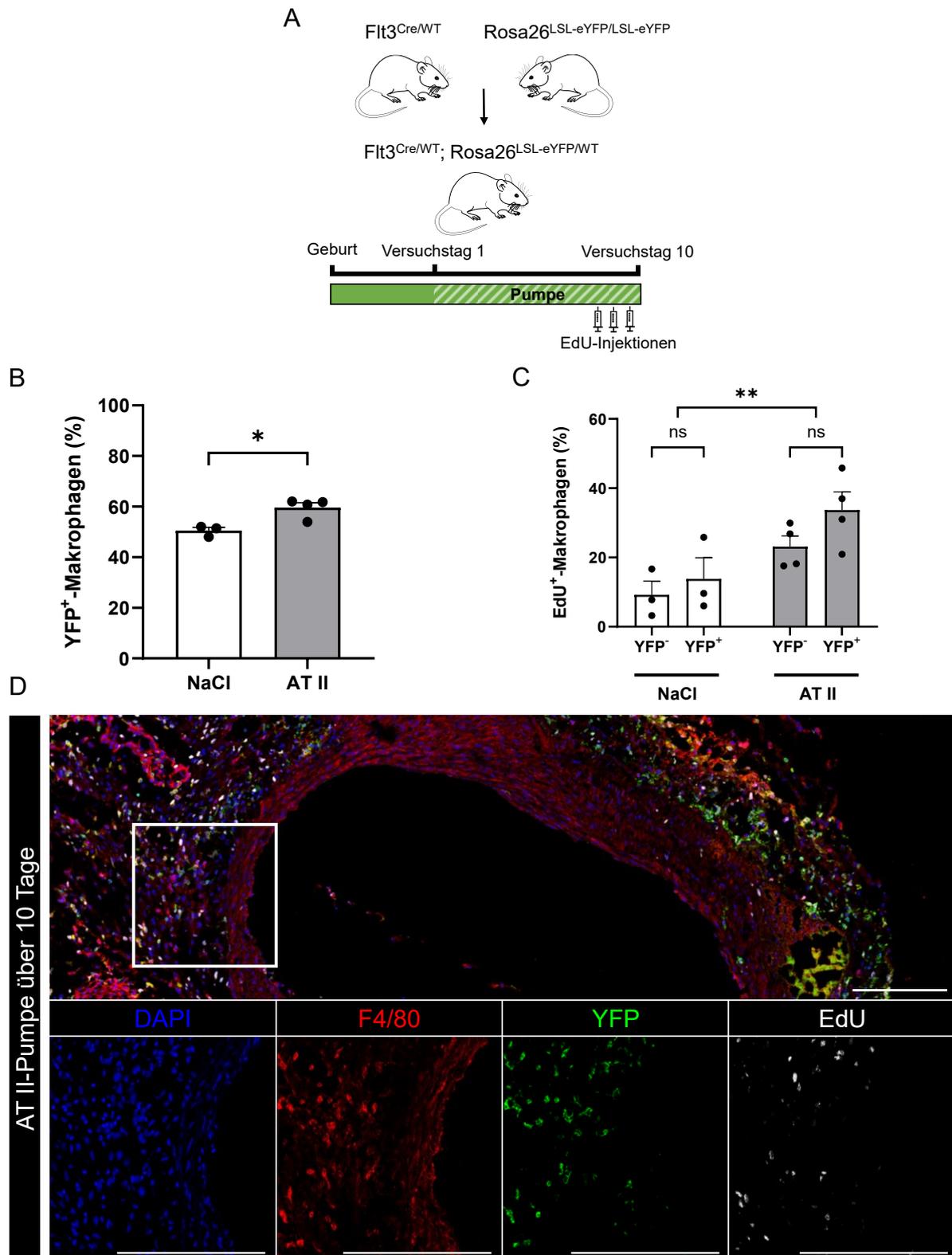


Abbildung 21: Akute Reaktion auf Inflammation und Fibrose I

A: Skizze vom Versuchsablauf

B: Mit $50,50 \pm 1,25$ % (NaCl; $n = 3$) respektive $59,64 \pm 1,92$ % (AT II; $n = 4$) ist in der Angiotensin II-Gruppe ein signifikant größerer Anteil der Aortenmakrophagen YFP⁺ ($p = 0,01$).

C: Mit $11,52 \pm 2,31$ % (NaCl; $n = 3$) respektive $28,41 \pm 5,29$ % (AT II; $n = 4$) sind in der Angiotensin II-Gruppe signifikant mehr Aortenmakrophagen EdU⁺ ($p = 0,005$).

D: Konfokalmikroskopische Aufnahme der Aorta einer Flt3^{Cre/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}-Maus, die 10 Tage nach Implantation einer Angiotensin II-gefüllten Pumpe analysiert wurde. Balken = 200 μ m

Hierfür werteten wir 10 Tage nach Implantation von Angiotensin II- bzw. NaCl-gefüllten Pumpen die Aorta von Mäusen des Genotyps $Flt3^{Cre/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}$, die zusätzlich 5 Tage, 3 Tage sowie einen Tag vor Analyse intraperitoneal applizierte EdU-Injektionen zur Markierung proliferierender Zellen erhalten hatten (Abschnitt 3.2.12), immunfluoreszenzhistologisch aus. Es zeigte sich ein mit $59,64 \pm 1,92 \%$ (Angiotensin II) statistisch signifikant erhöhter Anteil von YFP⁺-Makrophagen in der Angiotensin II-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($50,50 \pm 1,25 \%$, $p = 0,01$, Abbildung 21 B). Zudem konnten wir in Tieren der Angiotensin II-Gruppe gegenüber jenen der NaCl-Gruppe eine statistisch signifikant vermehrte Anreicherung von EdU in den Zellkernen der Makrophagen nachweisen ($p = 0,005$). In der Subgruppenanalyse der NaCl- respektive Angiotensin II-Gruppe zeigte sich ein Trend zu vermehrter Einlagerung von EdU in YFP⁺-Makrophagen gegenüber YFP⁻-Makrophagen. Dieser Trend war jedoch in beiden Gruppen nicht statistisch signifikant (NaCl: $p = 0,78$; Angiotensin II: $p = 0,22$; Abbildung 21 C). Die Frage, ob die Einlagerung in die DNA der $Flt3^+$ -Makrophagen bereits im Knochenmark in proliferierenden Monozyten bzw. anderen Makrophagen-vorläufern oder aber in sich in loco vermehrenden Aortenmakrophagen selbst stattgefunden hat, kann in diesem Modell nicht abschließend beantwortet werden. Um zwischen Einstrom von Monozyten und lokaler Proliferation der Makrophagen differenzieren zu können, führten wir den gleichen Versuch mit knochenmarkschimären

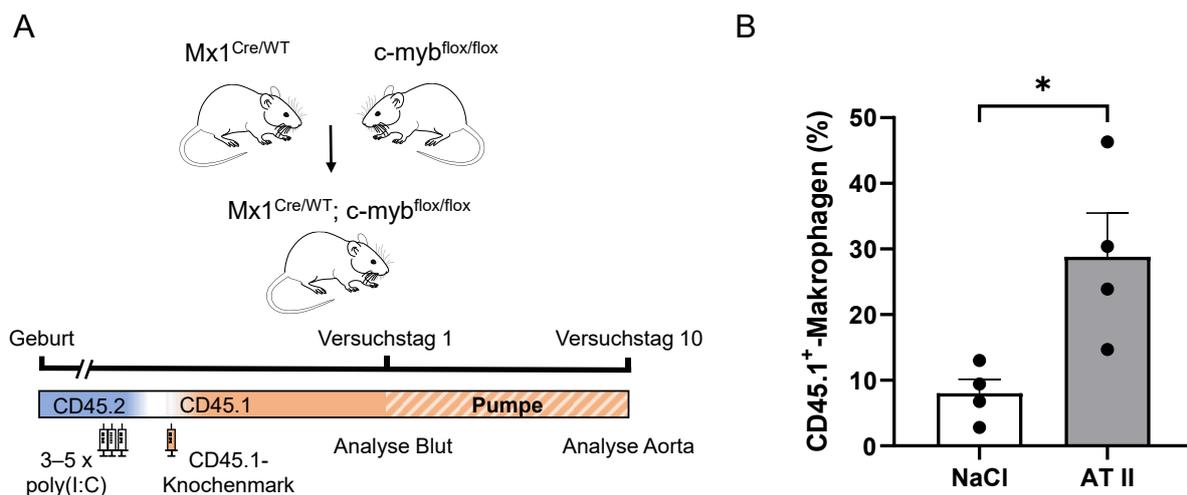


Abbildung 22: Akute Reaktion auf Inflammation und Fibrose II

A: Skizze vom Versuchsablauf

B: Mit $8,01 \pm 2,15 \%$ (NaCl; $n = 4$) respektive $28,83 \pm 6,66 \%$ (AT II; $n = 4$) CD45.1⁺-Aortenmakrophagen fanden wir in mit Angiotensin II behandelten Mäusen einen signifikant erhöhten Anteil CD45.1-positiver Makrophagen im Vergleich zur Kontrollgruppe vor ($p = 0,046$).

Mx1^{Cre/WT}; Myb^{flox/flox}-Mäusen durch. 10 Tage nach Pumpenimplantation wiesen in der NaCl-Kontrollgruppe $8,01 \pm 2,15$ % der Makrophagen die CD45^{1/1}-Variante auf, was etwa den Ergebnissen aus den Steady-state-Versuchen entspricht (Abschnitt 4.1.4). In der Angiotensin II-behandelten Versuchsgruppe hingegen stieg der Anteil von CD45^{1/1}-exprimierenden Makrophagen statistisch signifikant auf $28,83 \pm 6,66$ % an ($p = 0,046$, Abbildung 22).

4.2.3 Chronische Reaktion der Aortenmakrophagen auf Inflammation und Fibrose

Um die chronische Reaktion der Aortenmakrophagenpopulationen zu untersuchen, verwendeten wir abermals das Pumpenimplantationsmodell. Die Versuchsdauer verlängerten wir jedoch von 10 auf 28 Tage.

In der Aorta von Mäusen des Genotyps Flt3^{Cre/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT} bestand mit $36,16 \pm 5,36$ % (NaCl) respektive $33,20 \pm 1,63$ % kein statistisch signifikanter Unterschied im Anteil von YFP⁺-Makrophagen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe ($p = 0,63$, Abbildung 23 B). Auch die Inkorporation von EdU in die Zellkerne der Makrophagen von Mäusen der Angiotensin II-Gruppe entsprach den Werten der Kontrollgruppe ($p = 0,82$, Abbildung 23 C).

Zur Überprüfung, ob auch der Einstrom von Monozyten wieder abgenommen hatte, führten wir den 28-Tage-Versuch im Mx1^{Cre/WT}; Myb^{flox/flox}-Modell durch, wobei die Rahmenbedingung abgesehen von der Versuchsdauer jenen des 10 Tage Versuchs entsprachen. Der Anteil von CD45.1⁺-Makrophagen unterschied sich zwischen beiden Gruppen mit $12,06 \pm 2,47$ % (Angiotensin II) bzw. $7,30 \pm 1,33$ % (NaCl) nicht signifikant ($p = 0,40$, Abbildung 24 B) und war etwa gleich hoch wie unter Steady-state-Bedingungen (Abschnitt 4.1.4).

Abschließend führten wir selbigen Versuch mit c-kit^{Mer-Cre-Mer/WT}; Rosa26^{LSL-eGFP/WT}-Mäusen durch. Diese Tiere erhielten zusätzlich zur Implantation der Pumpen für 28 Tage Tamoxifen-angereichertes Futter. Auch in diesem Modell bestand zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied im Anteil von GFP⁺-Makrophagen an der Gesamtheit der Aortenmakrophagen ($p = 0,54$). Die Anteile entsprachen mit $2,66 \pm 1,04$ % (Angiotensin II) bzw. $1,28 \pm 0,25$ % (NaCl) etwa den Verhältnissen unter Steady-state-Bedingungen (Abschnitt 4.1.4).

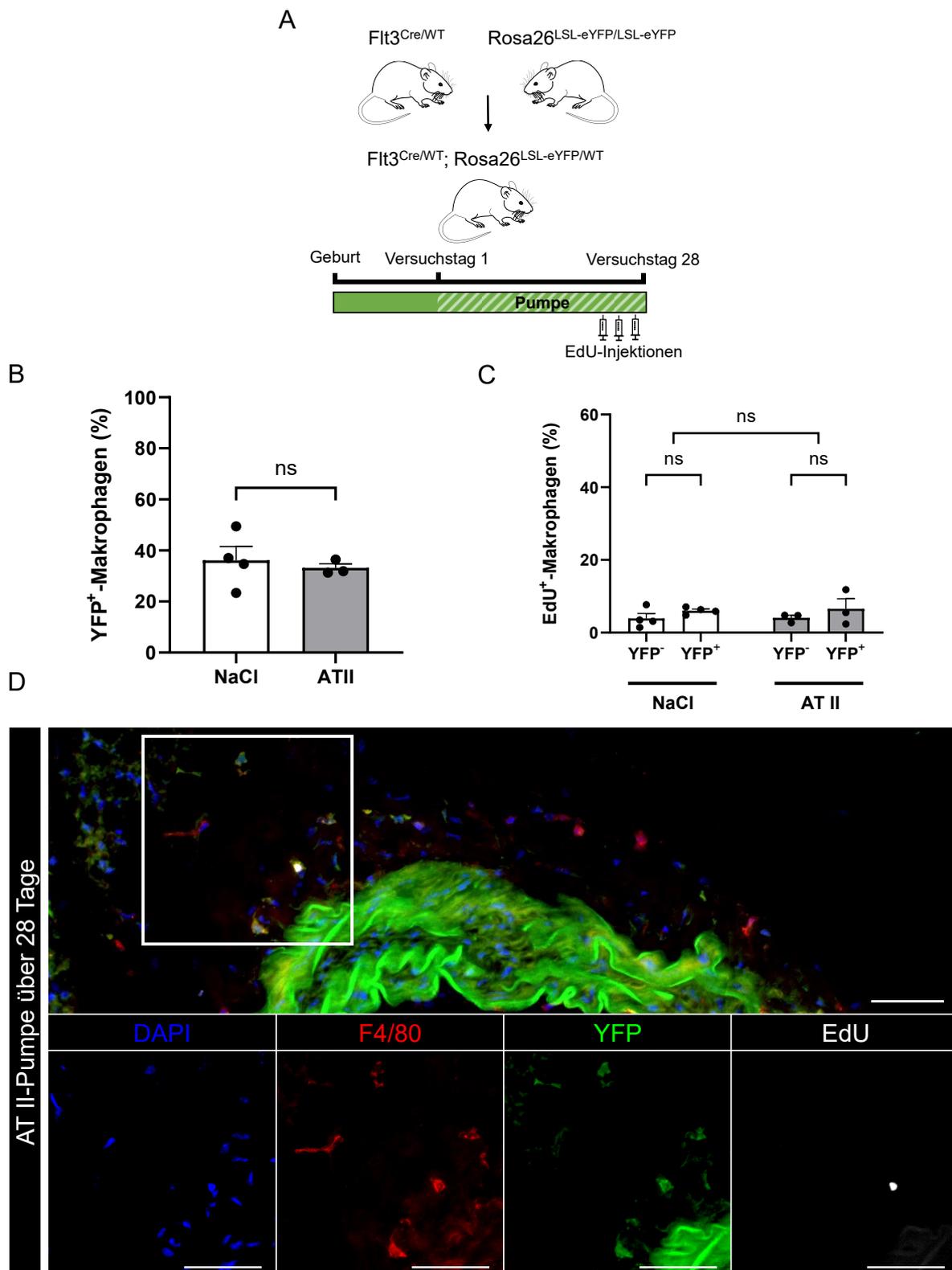


Abbildung 23: Chronische Reaktion auf Inflammation und Fibrose I

A: Skizze vom Versuchsablauf

B: Mit $33,16 \pm 5,36$ % (NaCl; $n = 4$) respektive $33,20 \pm 1,63$ % (AT II; $n = 3$) YFP⁺-Aortenmakrophagen besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p = 0,63$).

C: Mit $4,97 \pm 1,04$ % (NaCl; $n = 4$) respektive $5,32 \pm 1,25$ % (AT II; $n = 3$) EdU⁺-Aortenmakrophagen besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p = 0,82$).

D: Konfokalmikroskopische Aufnahme der Aorta einer Flt3^{Cre/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}-Maus, die 28 Tage nach Implantation einer AT II-gefüllten Pumpe analysiert wurde. Balken = 50 μ m

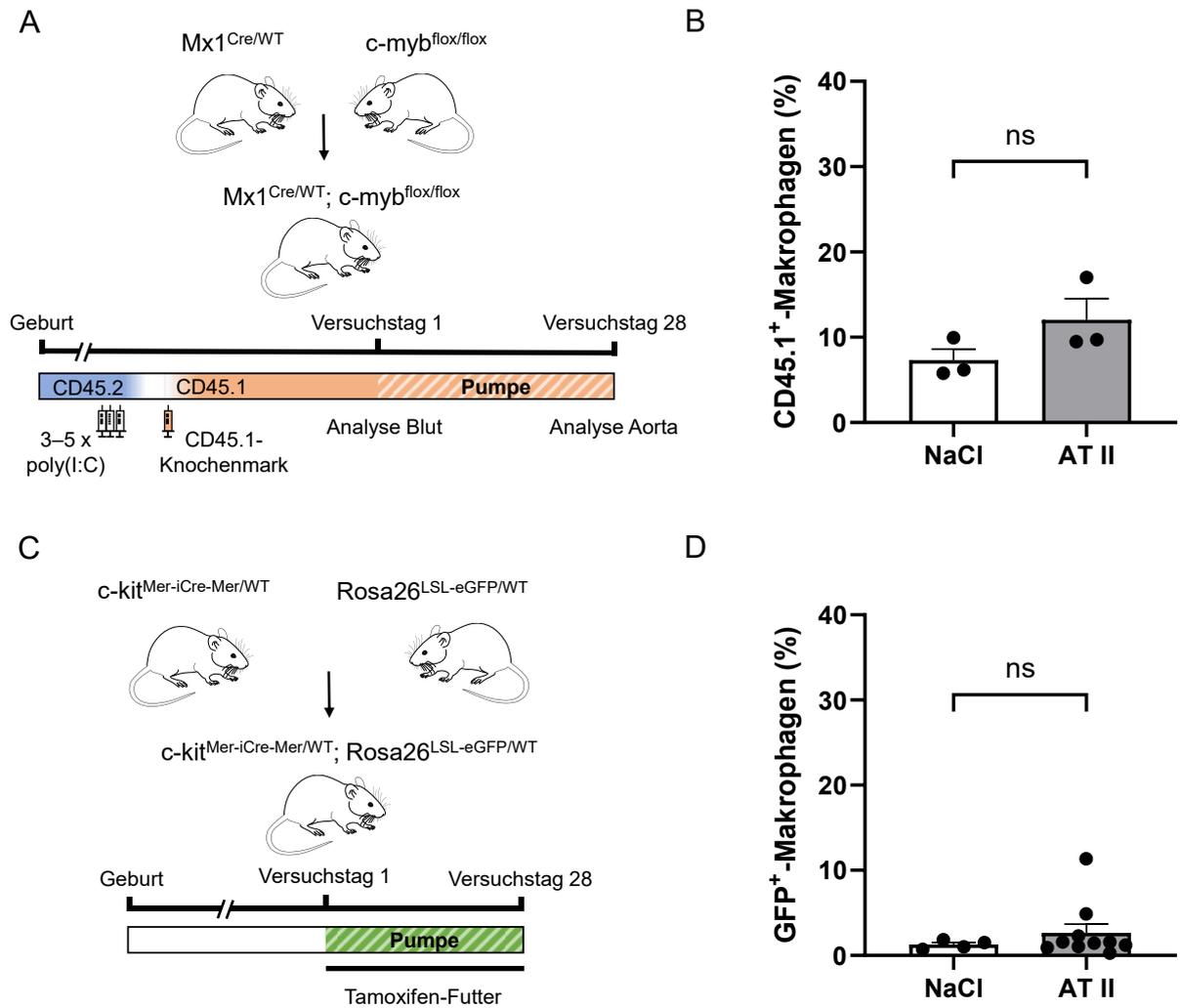


Abbildung 24: Chronische Reaktion auf Inflammation und Fibrose II

A: Skizze vom Versuchsablauf

B: Mit $7,30 \pm 1,33$ % (NaCl; n = 3) respektive $12,06 \pm 2,47$ % (AT II; n = 3) CD45.1⁺- Aortenmakrophagen besteht kein signifikanter Unterschied im Anteil CD45.1-positiver Makrophagen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe (p = 0,40).

C: Skizze vom Versuchsablauf

D: Mit $1,28 \pm 0,25$ % (NaCl; n = 4) respektive $2,66 \pm 1,04$ % (AT II; n = 10) GFP⁺-Aortenmakrophagen besteht kein signifikanter Unterschied im Anteil GFP-positiver Makrophagen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe (p = 0,54).

5 Diskussion

Neue Erkenntnisse über die Herkunft von Aortenmakrophagen und deren Reaktionsmuster auf Angiotensin-induzierte Inflammation könnten perspektivisch neue Therapiemöglichkeiten in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen eröffnen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutiert und daraus Antworten auf die in Abschnitt 2 formulierten Fragen abgeleitet.

5.1 Äquivalenter Beitrag von HSCs und EMPs zum Aortenmakrophagenpool

Die ersten Makrophagenvorläufer der Maus entstehen im Dottersack [42]. Im adulten Tier lassen sich die Gewebe im Hinblick auf die Herkunft der ortsständigen Makrophagen in drei Gruppen einteilen [37, 39, 40]:

- Gewebe, in denen ausschließlich vom Dottersack abstammende Makrophagen vorkommen,
- Gewebe, in denen sowohl EMP-abhängige als auch HSC-abhängige Makrophagen vorkommen sowie
- Gewebe, in denen – sofern vorhanden – EMP-abhängige Makrophagen mit zunehmendem Alter des Tieres größtenteils durch HSC-abhängige Makrophagen ersetzt werden.

Über die Herkunft der Gewebemakrophagen in der Aortenwand existiert bisher nur rudimentäres Wissen. Ensan et al. postulierten im Jahr 2016, dass der Aortenmakrophagenpool in Embryonen durch EMP-abhängige Makrophagen dominiert, in der adulten Maus jedoch zum Großteil aus HSC-abhängigen Makrophagen gebildet wird. Entsprechend wäre die Aorta der letzten der drei Gruppen zuzuordnen. Ihre Aussagen begründeten die Autoren insbesondere auf Daten aus CX3CR1-abhängigen Fate-mapping-Versuchen mit Tamoxifen-Injektionen zum Zeitpunkt E8.5 sowie aus Versuchen mit $Flt3^{Cre/WT}; Rosa26^{(mT/mG)/WT}$ -Mäusen [134].

Wir konnten durch unsere Versuche mit $Csf1r^{Mer-iCre-Mer/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/LSL-eYFP}$ -Embryonen zum Zeitpunkt E16.5 bestätigen, dass der Aortenmakrophagenpool muriner Embryonen von zwei ontogenetisch unterschiedlichen Makrophagenpopulationen gebildet wird. Weiterhin zeigten wir – ebenfalls im $Csf1r$ -Modell – durch direkten histologischen Nachweis, dass EMP-abhängige Makrophagen auch in der Aorta 12 Monate

alter Mäuse noch nachweisbar sind. Wir konnten im Gegensatz zu Ensan et al. nicht feststellen, dass EMP-abhängige Makrophagen in adulten Tieren größtenteils durch HSC-abhängige Makrophagen ersetzt würden. Unsere Fate-mapping-Versuche mit Tieren der Genotypen $Tie2^{Mer-iCre-Mer/WT}$; $Rosa26^{LSL-eYFP/WT}$ sowie $Flt3^{Cre/WT}$; $Rosa26^{LSL-eYFP/WT}$ demonstrieren, dass EMPs und HSCs auch in der Aorta adulter Mäuse zu jeweils etwa 50 % und damit gleichwertig zum Makrophagenpool beitragen. Die Aorta zählt folglich zu den Geweben, in denen sowohl EMP-abhängige als auch HSC-abhängige Makrophagen vorkommen.

5.2 Lokale Proliferation als dominierender Mechanismus für den Erhalt der Aortenmakrophagenanzahl

Ursprünglich wurde angenommen, dass Makrophagen ab dem Zeitpunkt ihrer Ausdifferenzierung nicht mehr in den Zellzyklus eintreten. Man nahm deswegen an, dass Makrophagen durch einwandernde Monozyten ersetzt würden [14]. In einer Reihe neuerer Arbeiten wurde jedoch gezeigt, dass Makrophagen durchaus das Potenzial zur Proliferation bewahren [135-138]. Daraufhin stellte man unter anderem im Gehirn [28] sowie der Haut [139] und Lunge [28, 140] fest, dass die regelmäßige Proliferation der Gewebemakrophagen ein wichtiger Mechanismus für deren Homöostase zu sein scheint. Der Beitrag von einwandernden Monozyten zum Erhalt der Gewebemakrophagenpopulationen unterscheidet sich dabei maßgeblich von Gewebe zu Gewebe (Abschnitt 1.1.3).

Durch die Versuche mit Mäusen der Genotypen $Mx1^{Cre/WT}$; $Myb^{flox/flox}$ sowie $c-Kit^{Mer-Cre-Mer/WT}$; $Rosa26^{LSL-eGFP/WT}$ konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Einwanderung von Monozyten in die aortale Gefäßwand unter Steady-state-Bedingungen eine untergeordnete Rolle für den Erhalt der Aortenmakrophagenanzahl spielt. Des Weiteren konnten wir durch EdU-Injektionsversuche demonstrieren, dass Aortenmakrophagen beider ontogenetischer Herkünfte auch in Abwesenheit inflammatorisch-fibrotischer Reize lokal proliferieren. Wir schlussfolgerten daraus, dass die lokale Proliferation der Makrophagen der dominierende Mechanismus für den Erhalt der Aortenmakrophagenanzahl ist. Der Vergleich von der gemessenen Proliferationsrate der Aortenmakrophagen mit der Proliferationsrate in anderen Geweben wäre erkenntnisreich. Dieser Vergleich wird allerdings durch die Verwendung einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellproliferationsmarkern sowie Injektionsregime erschwert.

Die Ergebnisse aus unserem auf genetischer Modifikation basierendem Knochenmarktransplantationsmodell sind besonders aussagekräftig, da das Modell unabhängig von Röntgenbestrahlung funktioniert und mit > 90 % sehr hohe Chimärismus-Raten im Blut erreicht. Ein bestrahlungsabhängiges Modell war aus zwei Gründen nicht geeignet zur Beantwortung von Fragen zur lokalen Proliferation von Makrophagen:

- Röntgenstrahlung beeinflusst die Funktion von Endothelzellen sowie Fibroblasten der Adventitia und damit auch das lokale Milieu der Makrophagen [141, 142].
- Röntgenstrahlung beeinträchtigt die Proliferation von Makrophagen [137].

Ensan et al. untersuchten ebenfalls die Proliferation von Aortenmakrophagen sowie den Beitrag von monozytärer Einwanderung [134]. Die Ergebnisse sind jedoch aufgrund methodischer Mängel zu kritisieren: Das Chimärismus-Modell der Autoren beruht zwar auf der ebenfalls bestrahlungsunabhängigen Parabiose, erreicht jedoch einen mit 30–50 % vergleichsweise niedrigen Monozyten-Chimärismus. Weiterhin erfolgte die Detektion von proliferierenden Makrophagen mithilfe von 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU). Die Detektion von BrdU erfolgt antikörperbasiert und nicht wie bei dem von uns verwendeten EdU durch Zykoadditionsreaktion. Der dadurch methodisch notwendige DNA-Denaturierungsschritt im BrdU-abhängigen Verfahren, der die Detektion des BrdU durch einen Fluorochrom-gekoppelten Antikörper erst möglich macht, beeinträchtigt die Validität der ebenfalls auf der Antigen-Antikörper-Reaktion basierenden Detektion der Aortenmakrophagen. Der mit 25 % deutlich höhere Anteil von BrdU⁺-Makrophagen in den Versuchen von Ensan et al. kann allerdings teilweise auch auf das unterschiedliche Injektionsregime mit täglichen Injektionen über einen Zeitraum von 9 Tagen zurückgeführt werden.

5.3 Kein Unterschied zwischen EMP- und HSC-abhängigen Makrophagen in Lokalisation oder Tendenz zur Clusterbildung

Die Frage nach der Relevanz der ontogenetischen Herkunft für die spätere Funktion der Makrophagen ist von großem Interesse und im aktuellen wissenschaftlichen Diskurs mit der Frage „Does origin matter?“ prägnant auf den Punkt gebracht worden. Mehrere Arbeitsgruppen konnten demonstrieren, dass die Funktion der Makrophagen maßgeblich durch Umgebungsfaktoren der Gewebe, in denen sie residieren, geprägt wird. So lieferten Gautier et al. durch Microarray-Analysen Evidenz dafür, dass sich

die RNA-Expressionsprofile von Makrophagen unterschiedlicher Gewebe stark unterscheiden [143]. Gosselin et al. sowie Lavin et al. demonstrierten diesen gewebeabhängigen Unterschied zusätzlich auf epigenetischer Ebene durch Chromatinanalysen [144, 145]. Auch Ensan et al. konnten – ebenfalls durch Microarray-Analysen – zeigen, dass Aortenmakrophagen erwartungsgemäß eine Makrophagenpopulation darstellen, die sich in ihren RNA-Expressionsprofilen von denen anderer Gewebe unterscheidet [134].

In dieser Arbeit wurden erstmalig Aortenmakrophagen in Bezug auf ihre ontogenetisch unterschiedliche Herkunft charakterisiert. Schon lange ist bekannt, dass Läsionen bei vaskulären Erkrankungen nicht in zufälliger Verteilung entlang der Aorta entstehen [146-148]. Weiterhin wird zunehmend klar, dass nicht nur die Gefäßintima, sondern auch die Adventitia eine wichtige Rolle in der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen spielt [149-152]. Es scheint, als würden besonders relevante strategische Positionen von Makrophagen bei pathologischen Prozessen der Gefäßwand existieren. Aus diesen Gründen führten wir Lokalisationsanalysen durch. Wir konnten durch histologische Untersuchungen zeigen, dass es keinen Unterschied zwischen den ontogenetisch unterschiedlichen Aortenmakrophagenpopulationen in ihrer Lokalisation entlang der Aorta sowie innerhalb der Adventitia gibt. Auch konnten wir keinen Unterschied der beiden Populationen in der Tendenz zur Ausbildung von Clustern feststellen. Methodisch sei hierbei angemerkt, dass die quantitative Untersuchung von Clustering bei einer Verteilung der zu untersuchenden Messpunkte (d. h. Makrophagen) um eine manchmal zirkuläre, manchmal ovale Struktur (d. h. Aorta im Querschnitt) mathematisch problematisch ist. Voraussetzungen, die etwa zur Berechnung von Ripley's K erfüllt sein müssten, sind nicht gegeben. Der von uns deswegen angewandte Vergleich des minimalen Abstands zum nächsten gleichartigen Makrophagen besäße die höchste Aussagekraft, wenn die Anteile der beiden Makrophagenpopulationen exakt 50 % entsprächen.

Die Charakterisierung der Makrophagen erfolgte in dieser Arbeit primär deskriptiv und es wurden keine Untersuchungen auf molekularer Ebene durchgeführt. Insbesondere ein Vergleich zwischen EMP- und HSC-abhängigen Makrophagen durch Single-cell-RNA-Sequenzierung wäre aufschlussreich. Diese Methode eignet sich dafür, auch bei geringen Zellzahlen – wie es bei der Zellsortierung von Aortenmakrophagen der Fall ist – Unterschiede in der Genexpression zu untersuchen. Hierdurch könnte letztlich auf

mögliche Unterschiede in der Funktion der Makrophagen in Abhängigkeit von ihrer Herkunft rückgeschlossen werden.

5.4 Vorübergehend erhöhter Einstrom von Monozyten in akuter Inflammation und Fibrose

Bei Arbeiten zur Erforschung der Herkunft von Gewebemakrophagen standen neben den Verhältnissen unter Steady-State-Bedingungen häufig auch mögliche Veränderungen in Krankheitsmodellen im Mittelpunkt. Die Wahl eines Krankheitsmodells, welches für das zu untersuchende Organ oder Gewebe etabliert ist, gewährleistet dabei die externe Validität der Ergebnisse. Erste Daten von Ensan et al. zeigten, dass ein Großteil der Aortenmakrophagen bei bakterieller Sepsis durch einwandernde Monozyten ersetzt wird. Die Wiederherstellung der Steady-State-Verhältnisse erfolge im Anschluss durch lokale Proliferation [134]. Das Herbeiführen einer bakteriellen Sepsis durch intraperitoneale Injektion von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien sowie durch chirurgische Punktion des Zökums ist allerdings ein untypisches Modell für vaskuläre Krankheitsgeschehen. Die Aussagekraft der Ergebnisse kann deshalb hinterfragt werden.

In dieser Arbeit verwendeten wir das als Modell für vaskuläre Inflammation und Fibrose etablierte Angiotensin II-Pumpenimplantationsmodell [120-127]. Zunächst reevaluierten wir die Eignung des Modells als vaskuläres Krankheitsmodell und konnten diese Eignung durch den Nachweis von Makrophagen-Akkumulation in der aortalen Gefäßwand, aortaler Fibrosierung sowie vermehrter Ausbildung von Bauchortenaneurysmen bestätigen.

Zur Untersuchung der Akutreaktion der Aortenmakrophagen wählten wir eine Versuchsdauer von 10 Tagen. Anhand unserer Ergebnisse aus Pumpenimplantationsversuchen mit Mäusen der Genotypen $Flt3^{Cre/WT}$; $Rosa26^{LSL-eYFP/WT}$ sowie $Mx1^{Cre/WT}$; $Myb^{flox/flox}$ konnten wir zeigen, dass es im akuten inflammatorischen Krankheitsgeschehen zu einem vermehrten Einstrom knochenmarkabhängiger Monozyten in die aortale Gefäßwand kommt. Hierdurch verschieben sich die Verhältnisse von EMP- und HSC-abhängigen Makrophagen zugunsten letzterer. Weiterhin konnten wir nachweisen, dass es zu einer Zunahme der Proliferationsaktivität der Makrophagen innerhalb beider ontogenetisch unterschiedlichen Populationen kommt. Signifikante Unterschiede in der Proliferationsaktivität zwischen beiden Makrophagenpopulationen stellten wir dabei nicht fest. Hierbei muss angemerkt werden, dass wahrscheinlich auch

einwandernde Monozyten während ihrer Expansion und Differenzierung im Knochenmark durch Inkorporation des insgesamt über 6 Tage injizierten EdU markiert wurden. Dies könnte die Aussagekraft des Versuches über Unterschiede in der Proliferationsaktivität beider Makrophagenpopulationen beeinträchtigt haben.

Zusammengefasst deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass es im akuten Krankheitsgeschehen einerseits zu einer beträchtlichen Einwanderung von Monozyten in die Gefäßwand kommt, andererseits aber auch ortsständige Makrophagenpopulationen einen Beitrag zur lokalen Entzündungsreaktion durch vermehrte Proliferation leisten.

Epelman et al. zeigten – ebenfalls unter Verwendung des Angiotensin II-Pumpenmodells –, dass es auch im Herzen durch inflammatorische Stimuli zunächst zu einer kurz andauernden, stark vermehrten Einwanderung von Monozyten kommt, der sich eine Phase starker proliferativer Aktivität gewebeständiger Makrophagen anschließt [27]. Davies et al. wiesen nach, dass es in peritonealem Fettgewebe nach Zymosan-induzierter Peritonitis ebenso zu dieser stark vermehrten Einwanderung von Monozyten kommt. Auch hier schloss sich eine Phase verstärkter proliferativer Aktivität der Gewebemakrophagen an [153]. Dasselbe Reaktionsmuster beobachteten Jenkins et al. in Makrophagen der Pleurahöhle nach intrathorakaler Injektion von Thioglycollat [135]. Das Verhalten, das wir in den aortalen Makrophagenpopulationen beobachteten, scheint folglich einem gewebeübergreifenden Reaktionsschema zu folgen.

5.5 Partielle Rekonstitution von Steady-state-Verhältnissen in chronischer Inflammation und Fibrose

Die aus epidemiologischer Sicht bedeutendsten kardiovaskulären Erkrankungen sind chronischer Natur (Abschnitt 1.2). Die Reaktion von Aortenmakrophagen auf anhaltende Veränderungen in Abhängigkeit ihrer ontogenetischen Herkunft ist noch nicht ausreichend verstanden. In dieser Arbeit wurde erstmalig die Reaktion der Aortenmakrophagenpopulationen auf chronische Angiotensin-induzierte Inflammation untersucht.

Hierfür verwendeten wir abermals das Angiotensin II-Pumpenimplantationsmodell, wählten allerdings eine Versuchsdauer von 28 Tagen. In $Flt3^{Cre/WT}; Rosa26^{LSL-eYFP/WT}$ -Mäusen konnten wir so zeigen, dass sich die relativen Anteile EMP- und HSC-abhängiger Makrophagen wieder jenen, die wir unter Steady-state-Verhältnissen vorfanden, angleichen. Durch 28-Tage-Pumpenimplantationsversuche in $c-Kit^{Mer-Cre-Mer/WT}$;

Rosa26^{LSL-eGFP/WT}- sowie Mx1^{Cre/WT}; Myb^{flox/flox}-Mäusen lieferten wir Evidenz dafür, dass diese Angleichung durch den Rückgang der monozytären Einwanderung im Vergleich zu jener im Akutversuch verursacht sein könnte. Darüber hinaus stellten wir eine Abnahme des Anteils proliferierender Zellen in beiden aortalen Makrophagenpopulationen fest. Dies weist darauf hin, dass die als Teil der Akutreaktion auftretende, stark vermehrte Proliferationsaktivität der gewebeständigen Makrophagen zeitlich begrenzt stattfindet. Basierend auf diesen Ergebnissen schlussfolgerten wir, dass es unter chronisch-pathologischen Veränderungen der Gefäßwand wohl zu einer partiellen Rekonstitution von Steady-state-Verhältnissen kommt.

Ergänzend zu unseren Erkenntnissen wären insbesondere Versuche mit Mäusen, die einerseits die Möglichkeit zur Unterscheidung EMP- und HSC-abhängiger Makrophagen erlauben, andererseits zusätzlich einen genetischen LDLR^{-/-} oder ApoE^{-/-} Hintergrund aufweisen, von wissenschaftlichem Interesse. Sowohl beim LDLR^{-/-} als auch beim ApoE^{-/-}-Modell handelt es sich um etablierte Modelle für aCVDs [154-157]. So ließen sich unter anderem Erkenntnisse über die potenziell von der ontogenetischen Herkunft abhängige Reaktion der in diesen Modellen vermehrt in der Gefäßintima auftretenden Makrophagen gewinnen.

5.6 Ausblick

Die zunehmende Verfügbarkeit biochemischer Methoden, die zur Erforschung des Transkriptoms (z. B. Single-cell-RNA-Sequenzierung) respektive Proteoms (z. B. Massenspektrometrie) benötigt werden, wird ermöglichen, detailliertere Charakterisierungen der Gewebemakrophagen auf molekularer Ebene durchzuführen. Hierdurch können eventuelle herkunftsabhängige Unterschiede in der biomolekularen Ausstattung der Makrophagen untersucht werden. Als Ausblick seien passend hierzu einige Fragestellungen, die es perspektivisch zu beantworten gilt, aufgeführt:

- Existieren Gene, die spezifisch nur in einer der beiden Makrophagenpopulationen dauerhaft exprimiert werden?
- Prädestiniert die ontogenetische Herkunft der Makrophagen – beispielsweise durch pro- oder antiinflammatorische Polarisierungen – für die Übernahme bestimmter Funktionen?
- Existieren biomolekulare Targets, durch die sich spezifisch Einfluss auf die ontogenetisch unterschiedlichen Populationen nehmen lässt?

Neue therapeutische Konzepte, die durch Fortschritte auf dem Gebiet der kardiovaskulären Immunologie ermöglicht werden, stehen noch am Anfang. Dass allerdings erstmals eine groß angelegte klinische Studie mit einer antiinflammatorischen Therapie, deren Plausibilität letztlich auf Erkenntnissen aus der Immunologie gründet, maßgebliche Erfolge in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen gezeigt hat [158], lässt mit Spannung in die Zukunft blicken.

6 Zusammenfassung

In zahlreichen wegweisenden Arbeiten wurde demonstriert, dass sich ein Großteil der gewebeständigen Makrophagen aus embryonalen, zuallererst im Dottersack auftretenden Vorläuferzellen entwickelt. Hierdurch wurde die lange bestehende Annahme widerlegt, dass sich Makrophagen ausschließlich aus Monozyten des Knochenmarks entwickeln würden. Dieser Anteil an Makrophagen, der gewebeabhängig unterschiedlich groß ist, erhält sich dauerhaft durch lokale Proliferation und ist folglich vom Knochenmark unabhängig.

Ziel dieser Arbeit war es, die Anteile der vom Dottersack und der vom Knochenmark abstammenden Makrophagen in der murinen Aorta zu erforschen. Des Weiteren sollte eine erste Charakterisierung dieser beiden Populationen erfolgen.

Da kardiovaskuläre Erkrankungen von epidemiologisch herausragender Bedeutung sind, sollte zudem die Reaktion der beiden ontogenetisch unterschiedlichen Makrophagenpopulationen auf Angiotensin-induzierte Inflammation untersucht werden.

Für unsere Versuche verwendeten wir eine Vielzahl genetischer Tiermodelle und führten mit ihnen verschiedene Fate-mapping-Experimente und Knochenmarktransplantationsversuche durch. Wir konnten durch immunfluoreszenzhistologische und durchflusszytometrische Analysen zeigen, dass in der Aortenwand sowohl von Embryonen als auch von adulten Tieren Makrophagen existieren, die von Vorläuferzellen aus dem Dottersack abstammen. Der Beitrag dottersack- bzw. knochenmarkabhängiger Makrophagen zum Aortenmakrophagenpool beträgt dabei jeweils etwa 50 %. Der Einstrom von Monozyten ist unter Steady-state-Bedingungen niedrig, während lokale Proliferation ein wichtiger Mechanismus für den Erhalt der Makrophagenanzahl zu sein scheint. Die beiden Makrophagenpopulationen unterscheiden sich nicht in ihrer Lokalisation entlang verschiedener Abschnitte der Aorta und auch nicht innerhalb der aortalen Adventitia.

Durch die Verwendung eines Angiotensin II-Pumpenimplantationsmodells als Modell für Inflammation und Fibrose der Gefäßwand konnten wir zeigen, dass die Akutreaktion auf inflammatorisch-fibrotische Reize von einer stark vermehrten Einwanderung von Monozyten in die aortale Gefäßwand sowie einer gesteigerten Proliferationsaktivität unter den ortsständigen Makrophagen geprägt ist. Dabei verschiebt sich das

Verhältnis zwischen dottersack- und knochenmarkabhängigen Makrophagen zugunsten letzterer.

Unter 28 Tage anhaltenden inflammatorisch-fibrotischen Einflüssen nähern sich sowohl der Umfang an einwandernden Monozyten sowie das Ausmaß lokaler Proliferation als auch die Anteile dottersack- und knochenmarkabhängiger Makrophagen wieder Steady-state-Verhältnissen an.

In Zukunft könnten charakterisierende Untersuchungen auf molekularer Ebene mögliche funktionale Unterschiede zwischen beiden Makrophagenpopulationen aufdecken und perspektivisch neue therapeutische Optionen eröffnen.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Porträt von Ilya Metschnikow, Erstbeschreiber der Makrophagen	2
Abbildung 2: Hämatopoetische Wellen des murinen Embryos	4
Abbildung 3: Vom Dottersack ausgehende hämatopoetische Wellen	6
Abbildung 4: Ontogenetische Herkunft der Gewebemakrophagen unterschiedlicher Organe in der adulten Maus	8
Abbildung 5: Beispiel eines Score-Sheets	18
Abbildung 6: Funktionsweise von fate mapping am Beispiel des Csf1r-Modells	22
Abbildung 7: Etablierung knochenmarkschimärer Mäuse	24
Abbildung 8: Gating-Strategie Blut	32
Abbildung 9: Gating-Strategie Aorta	33
Abbildung 10: Nachweis von aus frühen Csf1r-abhängigen Vorläufern hervorgehenden Makrophagen in der Aorta von Embryonen	35
Abbildung 11: Csf1r-abhängige embryonale Vorläuferzellen etablieren Makrophagenpopulationen in der Aorta adulter Mäuse.	36
Abbildung 12: Beitrag von EMPs zum Aortenmakrophagenpool	38
Abbildung 13: Beitrag von HSCs zum Aortenmakrophagenpool	40
Abbildung 14: Ersatz von Aortenmakrophagen durch c-kit-abhängige Vorläuferzellen.....	41
Abbildung 15: Ersatz von Aortenmakrophagen durch knochenmarkabhängige Zellen.....	43
Abbildung 16: Verhältnisse der Makrophagenpopulationen entlang der Aorta im Flt3 ^{Cre/WT} ; Rosa26 ^{LSL-eYFP/WT} -Modell	44
Abbildung 17: Lokalisation der Makrophagen in der Gefäßwand in Abhängigkeit der Herkunft im Flt3 ^{Cre/WT} ; Rosa26 ^{LSL-eYFP/WT} -Modell.....	45
Abbildung 18: Verteilung der Aortenmakrophagen in Relation zu Makrophagen gleichartiger Herkunft im Flt3 ^{Cre/WT} ; Rosa26 ^{LSL-eYFP/WT} -Modell	46
Abbildung 19: Fibrose und Inflammation im Angiotensin II-Modell	47
Abbildung 20: Ausbildung von Aneurysmen im Angiotensin II-Modell	48
Abbildung 21: Akute Reaktion auf Inflammation und Fibrose I	49
Abbildung 22: Akute Reaktion auf Inflammation und Fibrose II	50
Abbildung 23: Chronische Reaktion auf Inflammation und Fibrose I	52
Abbildung 24: Chronische Reaktion auf Inflammation und Fibrose II	53

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Reagenzien	12
Tabelle 2: Auflistung der Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer	13
Tabelle 3: Auflistung verwendeter Hersteller-Kits	13
Tabelle 4: Auflistung verwendeter Primärantikörper für Immunfluoreszenzhistologie	13
Tabelle 5: Auflistung verwendeter Isotypen-Kontroll-Antikörper	13
Tabelle 6: Auflistung verwendeter Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzhistologie	14
Tabelle 7: Auflistung verwendeter Antikörper für Durchflusszytometrie.....	14
Tabelle 8: Auflistung verwendeter Pharmaka	15
Tabelle 9: Auflistung verwendeter Geräte.....	15
Tabelle 10: Auflistung verwendeter Software	16
Tabelle 11: Auflistung verwendeter Mausmodelle	17
Tabelle 12: Graphische Kennzeichnung statistischer Signifikanzniveaus	34

9 Abkürzungsverzeichnis

μ

μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

A

ACS	Akutes Koronarsyndrom
aCVDs	atherosklerotisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen
AGM-Region	Aorto-Gonado-Mesonephros-Region

B

BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	Bovines Serum-Albumin

C

c-kit	Tyrosine-protein kinase KIT
Csf1r	Colony-stimulating factor-1
CVDs	Kardiovaskuläre Erkrankungen

D

DALYs	Disability-adjusted life-years
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser

E

EdU	5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin
EMPs	Erythromyeloische Progenitorzellen
EX.X	Tag X.X der Embryonalentwicklung
eYFP	enhanced yellow fluorescent protein

F

Flt3	Receptor tyrosine kinase Flt3
------------	-------------------------------

G

G Gauge

H

HSCs Hämatopoetische Stammzellen

I

iCre improved Cre

K

kg Kilogramm

KG Körpergewicht

M

Mer murine estrogen receptor

mg Milligramm

MPS Mononukleäres Phagozytensystem

N

NaCl Natriumchlorid

P

pAVK periphere arterielle Verschlusskrankheit

PBS phosphate buffered saline

PCR Polymerase-Kettenreaktion

PFA Paraformaldehyd

poly(I:C) Polyinosin-Polycytidyl-Säure

S

SPF Specific-Pathogen-Free

T

Tie2 Tyrosine-protein kinase receptor Tie2

V

Vol. % Volumenprozent

W

WHO World Health Organization

Y

YLDs years lived with disability

YLLs years of life lost

Z

ZNS Zentrales Nervensystem

10 Literaturverzeichnis

1. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 593-623.
2. Desjardins, M., M. Houde, and E. Gagnon, *Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity*. Immunol Rev, 2005. **207**: p. 158-65.
3. Gordon, S., *Elie Metchnikoff, the Man and the Myth*. J Innate Immun, 2016. **8**(3): p. 223-7.
4. McJunkin, F., *The Origin of the phagocytic mononuclear cells of the peripheral blood*. The American Journal of Pathology, 1919. **25**: p. 27-45.
5. Marchand, E., *Ueber die Beziehungen, der pathologischen Anatomie zur Entwicklungsgeschichte, besonders der Keimblattlehre*. Verh. d. deutsch. patholog. Gesellsch. München, Jahrg, 1899. **2**.
6. Ebert, R.H. and H.W. Florey, *The Extravascular Development of the Monocyte Observed In vivo*. British Journal of Experimental Pathology, 1939. **20**(4): p. 342-356.
7. Kolouch, F., *The lymphocyte in acute inflammation*. The American Journal of Pathology, 1939. **15**(4): p. 413-428.5.
8. Maximow, A.A., *Development of Non-granular Leucocytes (Lymphocytes and Monocytes) into Polyblasts (Macrophages) and Fibroblasts in Vitro*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1927. **24**(6): p. 570-572.
9. Bennett, W.E. and Z.A. Cohn, *The isolation and selected properties of blood monocytes*. J Exp Med, 1966. **123**(1): p. 145-60.
10. Clark, E.R. and E.L. Clark, *Observations on the macrophages of living amphibian larvae*. American Journal of Anatomy, 1930. **46**(1): p. 91-147.
11. Spector, W.G., M.N. Walters, and D.A. Willoughby, *The origin of the mononuclear cells in inflammatory exudates induced by fibrinogen*. J Pathol Bacteriol, 1965. **90**(1): p. 181-92.
12. Volkman, A. and J.L. Gowans, *The Origin of Macrophages from Bone Marrow in the Rat*. Br J Exp Pathol, 1965. **46**: p. 62-70.
13. Volkman, A., *The origin and turnover of mononuclear cells in peritoneal exudates in rats*. J Exp Med, 1966. **124**(2): p. 241-54.
14. van Furth, R. and Z.A. Cohn, *The origin and kinetics of mononuclear phagocytes*. J Exp Med, 1968. **128**(3): p. 415-35.

15. Cline, M.J. and M.A. Moore, *Embryonic origin of the mouse macrophage*. Blood, 1972. **39**(6): p. 842-9.
16. Deimann, W. and H.D. Fahimi, *Peroxidase cytochemistry and ultrastructure of resident macrophages in fetal rat liver. A developmental study*. Dev Biol, 1978. **66**(1): p. 43-56.
17. Medlock, E.S. and J.L. Haar, *The liver hemopoietic environment: II. Peroxidase reactive mouse fetal liver hemopoietic cells*. Anat Rec, 1983. **207**(1): p. 43-53.
18. Enzan, H., *Electron microscopic studies of macrophages in early human yolk sacs*. Acta Pathol Jpn, 1986. **36**(1): p. 49-64.
19. Takahashi, K., F. Yamamura, and M. Naito, *Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study*. J Leukoc Biol, 1989. **45**(2): p. 87-96.
20. Naito, M., K. Takahashi, and S. Nishikawa, *Development, differentiation, and maturation of macrophages in the fetal mouse liver*. J Leukoc Biol, 1990. **48**(1): p. 27-37.
21. Naito, M., et al., *Development, differentiation, and maturation of fetal mouse yolk sac macrophages in cultures*. J Leukoc Biol, 1989. **46**(1): p. 1-10.
22. Cuadros, M.A., et al., *First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system*. J Comp Neurol, 1993. **330**(1): p. 113-29.
23. Kurz, H. and B. Christ, *Embryonic CNS macrophages and microglia do not stem from circulating, but from extravascular precursors*. Glia, 1998. **22**(1): p. 98-102.
24. Alliot, F., I. Godin, and B. Pessac, *Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain*. Brain Res Dev Brain Res, 1999. **117**(2): p. 145-52.
25. Schulz, C., et al., *A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells*. Science, 2012. **336**(6077): p. 86-90.
26. Yona, S., et al., *Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis*. Immunity, 2013. **38**(1): p. 79-91.
27. Epelman, S., et al., *Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation*. Immunity, 2014. **40**(1): p. 91-104.

28. Hashimoto, D., et al., *Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes*. *Immunity*, 2013. **38**(4): p. 792-804.
29. Tamoutounour, S., et al., *Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin*. *Immunity*, 2013. **39**(5): p. 925-38.
30. Bain, C.C., et al., *Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(10): p. 929-937.
31. Gomez Perdiguero, E., et al., *Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors*. *Nature*, 2015. **518**(7540): p. 547-51.
32. Epelman, S., K.J. Lavine, and G.J. Randolph, *Origin and functions of tissue macrophages*. *Immunity*, 2014. **41**(1): p. 21-35.
33. Haldar, M. and K.M. Murphy, *Origin, development, and homeostasis of tissue-resident macrophages*. *Immunol Rev*, 2014. **262**(1): p. 25-35.
34. Lavin, Y., et al., *Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(12): p. 731-44.
35. Varol, C., A. Mildner, and S. Jung, *Macrophages: development and tissue specialization*. *Annu Rev Immunol*, 2015. **33**: p. 643-75.
36. Ginhoux, F. and M. Guilliams, *Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis*. *Immunity*, 2016. **44**(3): p. 439-449.
37. Perdiguero, E.G. and F. Geissmann, *The development and maintenance of resident macrophages*. *Nat Immunol*, 2016. **17**(1): p. 2-8.
38. Gordon, S. and A. Pluddemann, *Tissue macrophages: heterogeneity and functions*. *BMC Biol*, 2017. **15**(1): p. 53.
39. Hoeffel, G. and F. Ginhoux, *Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages*. *Cell Immunol*, 2018.
40. Hoeffel, G. and F. Ginhoux, *Ontogeny of tissue-resident macrophages*. *Frontiers in immunology*, 2015. **6**: p. 486.
41. Kierdorf, K., et al. *Development and function of tissue resident macrophages in mice*. in *Seminars in immunology*. 2015. Elsevier.
42. Bertrand, J.Y., et al., *Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac*. *Blood*, 2005. **106**(9): p. 3004-11.

43. Palis, J., et al., *Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse*. Development, 1999. **126**(22): p. 5073-84.
44. Ueno, H. and I.L. Weissman, *Clonal analysis of mouse development reveals a polyclonal origin for yolk sac blood islands*. Dev Cell, 2006. **11**(4): p. 519-33.
45. Tober, J., et al., *The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1433-41.
46. McGrath, K.E., et al., *Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo*. Blood, 2003. **101**(5): p. 1669-76.
47. Kierdorf, K., et al., *Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways*. Nat Neurosci, 2013. **16**(3): p. 273-80.
48. Ginhoux, F., et al., *Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages*. Science, 2010. **330**(6005): p. 841-5.
49. Sheng, J., C. Ruedl, and K. Karjalainen, *Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells*. Immunity, 2015. **43**(2): p. 382-93.
50. McGrath, K.E., et al., *Distinct Sources of Hematopoietic Progenitors Emerge before HSCs and Provide Functional Blood Cells in the Mammalian Embryo*. Cell Rep, 2015. **11**(12): p. 1892-904.
51. Palis, J., et al., *Spatial and temporal emergence of high proliferative potential hematopoietic precursors during murine embryogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(8): p. 4528-33.
52. McGrath, K.E., et al., *A transient definitive erythroid lineage with unique regulation of the beta-globin locus in the mammalian embryo*. Blood, 2011. **117**(17): p. 4600-8.
53. Lin, Y., M.C. Yoder, and M. Yoshimoto, *Lymphoid progenitor emergence in the murine embryo and yolk sac precedes stem cell detection*. Stem Cells Dev, 2014. **23**(11): p. 1168-77.
54. Hoeffel, G., et al., *C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages*. Immunity, 2015. **42**(4): p. 665-78.
55. Sanchez, M.J., et al., *Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo*. Immunity, 1996. **5**(6): p. 513-25.

56. Ma, X., et al., *The Ly-6A (Sca-1) GFP transgene is expressed in all adult mouse hematopoietic stem cells*. Stem Cells, 2002. **20**(6): p. 514-21.
57. de Bruijn, M.F., et al., *Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta*. Immunity, 2002. **16**(5): p. 673-83.
58. Mikkola, H.K., et al., *Expression of CD41 marks the initiation of definitive hematopoiesis in the mouse embryo*. Blood, 2003. **101**(2): p. 508-16.
59. Lemischka, I.R., *Clonal, in vivo behavior of the totipotent hematopoietic stem cell*. Semin Immunol, 1991. **3**(6): p. 349-55.
60. Spangrude, G.J., et al., *Mouse hematopoietic stem cells*. Blood, 1991. **78**(6): p. 1395-402.
61. Muller, A.M., et al., *Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo*. Immunity, 1994. **1**(4): p. 291-301.
62. Kissa, K. and P. Herbomel, *Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 112-5.
63. Boisset, J.C., et al., *In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 116-20.
64. Bertrand, J.Y., et al., *Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 108-11.
65. Mikkola, H.K., et al., *Placenta as a site for hematopoietic stem cell development*. Exp Hematol, 2005. **33**(9): p. 1048-54.
66. Moore, M.A. and D. Metcalf, *Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo*. Br J Haematol, 1970. **18**(3): p. 279-96.
67. Godin, I., et al., *Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites*. J Exp Med, 1999. **190**(1): p. 43-52.
68. Medvinsky, A. and E. Dzierzak, *Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region*. Cell, 1996. **86**(6): p. 897-906.
69. Morrison, S.J., et al., *The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(22): p. 10302-6.
70. Christensen, J.L., et al., *Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells*. PLoS Biol, 2004. **2**(3): p. E75.
71. Scott, C.L., et al., *Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 10321.

72. Mossadegh-Keller, N., et al., *Developmental origin and maintenance of distinct testicular macrophage populations*. J Exp Med, 2017. **214**(10): p. 2829-2841.
73. Molawi, K., et al., *Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age*. J Exp Med, 2014. **211**(11): p. 2151-8.
74. Calderon, B., et al., *The pancreas anatomy conditions the origin and properties of resident macrophages*. J Exp Med, 2015. **212**(10): p. 1497-512.
75. Ajami, B., et al., *Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life*. Nat Neurosci, 2007. **10**(12): p. 1538-43.
76. Guilliams, M., et al., *Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF*. J Exp Med, 2013. **210**(10): p. 1977-92.
77. Glass, C.K. and J.L. Witztum, *Atherosclerosis. the road ahead*. Cell, 2001. **104**(4): p. 503-16.
78. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
79. Hansson, G.K., A.K. Robertson, and C. Soderberg-Naucler, *Inflammation and atherosclerosis*. Annu Rev Pathol, 2006. **1**: p. 297-329.
80. Witztum, J.L. and A.H. Lichtman, *The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 73-102.
81. WHO. *Global Hearts Initiative. Working together to beat cardiovascular disease*. 2017 [16.05.2018]; Available from: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/global-hearts/HEARTS_Infographic_rev1.pdf?ua=1.
82. GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators, *Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. Lancet, 2016. **388**(10053): p. 1459-1544.
83. Mendis, S., P. Puska, and B. Norrving, *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*. 2011, World Health Organization: Geneva.
84. Piepoli, M.F., et al., *2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European*

- Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR)*. Eur Heart J, 2016. **37**(29): p. 2315-2381.
85. Lou, O., *World Development Report 1993: Investing in Health*. The World Bank, Oxford University Press, Oxford, 1993. No. of pages: 329. ISBN 0-19-520890-0. Health Economics, 1994. **3**(2): p. 127-128.
86. GBD 2015 DALYs and HALE Collaborators, *Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. Lancet, 2016. **388**(10053): p. 1603-1658.
87. Janowska-Wieczorek, A., et al., *Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment*. Blood, 2001. **98**(10): p. 3143-9.
88. van Berlo, J.H., et al., *c-kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart*. Nature, 2014. **509**(7500): p. 337-41.
89. Qian, B.Z., et al., *CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis*. Nature, 2011. **475**(7355): p. 222-5.
90. Benz, C., et al., *The stream of precursors that colonizes the thymus proceeds selectively through the early T lineage precursor stage of T cell development*. J Exp Med, 2008. **205**(5): p. 1187-99.
91. Kuhn, R., et al., *Inducible gene targeting in mice*. Science, 1995. **269**(5229): p. 1427-9.
92. Lieu, Y.K., et al., *Requirement of c-myb in T cell development and in mature T cell function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(41): p. 14853-8.
93. Lieu, Y.K. and E.P. Reddy, *Conditional c-myb knockout in adult hematopoietic stem cells leads to loss of self-renewal due to impaired proliferation and accelerated differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(51): p. 21689-94.
94. Mao, X., et al., *Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain*. Blood, 2001. **97**(1): p. 324-6.
95. Srinivas, S., et al., *Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus*. BMC Dev Biol, 2001. **1**: p. 4.
96. Christensen, J.L. and I.L. Weissman, *Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(25): p. 14541-14546.

97. Sherr, C.J., et al., *The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF 1*. 1985. **41**(3): p. 665-676.
98. Lichanska, A.M., et al., *Differentiation of the mononuclear phagocyte system during mouse embryogenesis: the role of transcription factor PU.1*. *Blood*, 1999. **94**(1): p. 127-38.
99. Nakamura, E., M.T. Nguyen, and S. Mackem, *Kinetics of tamoxifen-regulated Cre activity in mice using a cartilage-specific CreER(T) to assay temporal activity windows along the proximodistal limb skeleton*. *Dev Dyn*, 2006. **235**(9): p. 2603-12.
100. Iwama, A., et al., *Molecular cloning and characterization of mouse TIE and TEK receptor tyrosine kinase genes and their expression in hematopoietic stem cells*. *Biochemical and biophysical research communications*, 1993. **195**(1): p. 301-309.
101. Cumano, A. and I. Godin, *Ontogeny of the hematopoietic system*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 745-85.
102. Ivanova, N.B., et al., *A stem cell molecular signature*. *Science*, 2002. **298**(5593): p. 601-4.
103. Psaltis, P.J., et al., *Identification of a monocyte-predisposed hierarchy of hematopoietic progenitor cells in the adventitia of postnatal murine aorta*. *Circulation*, 2012. **125**(4): p. 592-603.
104. Behringer, C., et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Fourth Edition*. 2014.
105. Sternberg, N. and D. Hamilton, *Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites*. *J Mol Biol*, 1981. **150**(4): p. 467-86.
106. Hamilton, D.L. and K. Abremski, *Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system: Cre-mediated synapsis of two lox sites*. *Journal of molecular biology*, 1984. **178**(2): p. 481-486.
107. Abremski, K. and R. Hoess, *Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein*. *Journal of Biological Chemistry*, 1984. **259**(3): p. 1509-1514.
108. Rossant, J. and A. Nagy, *Genome engineering: the new mouse genetics*. *Nat Med*, 1995. **1**(6): p. 592-4.
109. Lewandoski, M., *Conditional control of gene expression in the mouse*. *Nature Reviews Genetics*, 2001. **2**(10): p. 743-755.

110. Nagy, A., *Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring*. *genesis*, 2000. **26**(2): p. 99-109.
111. Shimshek, D.R., et al., *Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse*. *genesis*, 2002. **32**(1): p. 19-26.
112. Danielian, P.S., et al., *Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase*. *Current biology*, 1998. **8**(24): p. 1323-S2.
113. Sauer, B. and N. Henderson, *Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(14): p. 5166-70.
114. Salic, A. and T.J. Mitchison, *A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(7): p. 2415-20.
115. Wang, Q., et al., *Bioconjugation by copper (I)-catalyzed azide-alkyne [3+ 2] cycloaddition*. *Journal of the american chemical society*, 2003. **125**(11): p. 3192-3193.
116. Hug, H., et al., *Organization of the murine Mx gene and characterization of its interferon- and virus-inducible promoter*. *Mol Cell Biol*, 1988. **8**(8): p. 3065-79.
117. Arnheiter, H., et al., *Transgenic mice with intracellular immunity to influenza virus*. *Cell*, 1990. **62**(1): p. 51-61.
118. Mucenski, M.L., et al., *A functional c-myc gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis*. *Cell*, 1991. **65**(4): p. 677-89.
119. Stremmel, C., et al., *Inducible disruption of the c-myc gene allows allogeneic bone marrow transplantation without irradiation*. *J Immunol Methods*, 2018. **457**: p. 66-72.
120. Weiss, D., J.J. Kools, and W.R. Taylor, *Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice*. *Circulation*, 2001. **103**(3): p. 448-54.
121. Daugherty, A. and L. Cassis, *Chronic angiotensin II infusion promotes atherogenesis in low density lipoprotein receptor -/- mice*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **892**: p. 108-18.
122. Moore, J.P., et al., *M2 macrophage accumulation in the aortic wall during angiotensin II infusion in mice is associated with fibrosis, elastin loss, and elevated blood pressure*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2015. **309**(5): p. H906-H917.

123. Bush, E., et al., *CC chemokine receptor 2 is required for macrophage infiltration and vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension*. Hypertension, 2000. **36**(3): p. 360-3.
124. Wenzel, P., et al., *Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin II-induced arterial hypertension and vascular dysfunction*. Circulation, 2011. **124**(12): p. 1370-1381.
125. Daugherty, A., M.W. Manning, and L.A. Cassis, *Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice*. J Clin Invest, 2000. **105**(11): p. 1605-12.
126. Lu, H., et al., *Subcutaneous Angiotensin II Infusion using Osmotic Pumps Induces Aortic Aneurysms in Mice*. J Vis Exp, 2015(103).
127. Tieu, B.C., et al., *An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3637-51.
128. Menon, P. and E.A. Fisher, *Immunostaining of macrophages, endothelial cells, and smooth muscle cells in the atherosclerotic mouse aorta*, in *Methods in Mouse Atherosclerosis*. 2015, Springer. p. 131-148.
129. Latt, S.A., et al., *Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1975. **23**(7): p. 493-505.
130. Austyn, J.M. and S. Gordon, *F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage*. European journal of immunology, 1981. **11**(10): p. 805-815.
131. Lee, S.-H., P.M. Starkey, and S. Gordon, *Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80*. The Journal of experimental medicine, 1985. **161**(3): p. 475-489.
132. Morris, L., C.F. Graham, and S. Gordon, *Macrophages in haemopoietic and other tissues of the developing mouse detected by the monoclonal antibody F4/80*. Development, 1991. **112**(2): p. 517-526.
133. Butcher, M.J., et al., *Flow cytometry analysis of immune cells within murine aortas*. 2011(53): p. e2848.

134. Ensan, S., et al., *Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1(+) precursors and circulating monocytes immediately after birth*. Nat Immunol, 2016. **17**(2): p. 159-68.
135. Jenkins, S.J., et al., *Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation*. Science, 2011. **332**(6035): p. 1284-8.
136. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 669-92.
137. Sieweke, M.H. and J.E. Allen, *Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages*. Science, 2013. **342**(6161): p. 1242974.
138. Aziz, A., et al., *MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages*. Science, 2009. **326**(5954): p. 867-871.
139. Merad, M., et al., *Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions*. Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1135-41.
140. Murphy, J., et al., *The prolonged life-span of alveolar macrophages*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2008. **38**(4): p. 380-385.
141. Paris, F., et al., *Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice*. Science, 2001. **293**(5528): p. 293-7.
142. Soucy, K.G., et al., *Single exposure to radiation produces early anti-angiogenic effects in mouse aorta*. Radiat Environ Biophys, 2010. **49**(3): p. 397-404.
143. Gautier, E.L., et al., *Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages*. Nature immunology, 2012. **13**(11): p. 1118.
144. Gosselin, D., et al., *Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities*. Cell, 2014. **159**(6): p. 1327-1340.
145. Lavin, Y., et al., *Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment*. Cell, 2014. **159**(6): p. 1312-1326.
146. Pedersen, E.M., et al., *Distribution of early atherosclerotic lesions in the human abdominal aorta correlates with wall shear stresses measured in vivo*. European journal of vascular and endovascular surgery, 1999. **18**(4): p. 328-333.

147. Tobler, H.G. and J.E. Edwards, *Frequency and location of atherosclerotic plaques in the ascending aorta*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 1988. **96**(2): p. 304-306.
148. Kojima, K., et al., *Aortic plaque distribution, and association between aortic plaque and atherosclerotic risk factors: an aortic angiography study*. Journal of atherosclerosis and thrombosis, 2019: p. 48181.
149. Stenmark, K.R., et al., *The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function*. Annu Rev Physiol, 2013. **75**: p. 23-47.
150. Majesky, M.W., et al., *The adventitia: a dynamic interface containing resident progenitor cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(7): p. 1530-9.
151. Zhou, J., et al., *CXCR3-dependent accumulation and activation of perivascular macrophages is necessary for homeostatic arterial remodeling to hemodynamic stresses*. J Exp Med, 2010. **207**(9): p. 1951-66.
152. Maiellaro, K. and W.R. Taylor, *The role of the adventitia in vascular inflammation*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(4): p. 640-8.
153. Davies, L.C., et al., *A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation*. European journal of immunology, 2011. **41**(8): p. 2155-2164.
154. Nakashima, Y., et al., *ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree*. Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology, 1994. **14**(1): p. 133-140.
155. Zhang, S.H., et al., *Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E*. Science, 1992. **258**(5081): p. 468-471.
156. Plump, A.S., et al., *Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells*. Cell, 1992. **71**(2): p. 343-353.
157. Ishibashi, S., et al., *Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery*. The Journal of clinical investigation, 1993. **92**(2): p. 883-893.
158. Ridker, P.M., et al., *Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease*. New England journal of medicine, 2017. **377**(12): p. 1119-1131.

11 Eidesstattliche Versicherung

Schleifer, Christian

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Ontogenetische Herkunft von Makrophagen der Aorta und deren Reaktion auf Angiotensin-induzierte Inflammation

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 23.05.2021

Christian Schleifer

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand bzw. Doktorandin

12 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. med. Christian Schulz für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe diese Promotion anfertigen zu können, herzlich bedanken. Ich habe ihn als hervorragenden Mentor wahrgenommen, unter dem ich eine sehr gute wissenschaftliche Ausbildung genossen habe. Insbesondere danke ich ihm für die stets faire Behandlung sowie die Bereitschaft, auf Augenhöhe mit Doktoranden zu diskutieren.

Dem *Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung e.V.* danke ich für die großzügige Unterstützung meiner Promotion durch ein Forschungsstipendium.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Anna Titova bedanken, die nicht nur als fachlich ausgezeichnete Mitarbeiterin im Labor zu jeder Zeit äußerst hilfsbereit war, sondern darüber hinaus auch durch ihre offene und gutherzige Art meine Zeit im Labor bereichert hat. Michael Lorenz möchte ich für seine stetige, sehr fundierte fachliche Beratung in allen labortechnischen Angelegenheiten danken.

Dem gesamten Team des *Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin* danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit. Besonders bei Dr. med. vet. Vanessa Schneider und Dr. med. vet. Denise Messerer möchte ich mich herzlich für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft bedanken.

Meiner Schwester Sophia sowie meinem guten Freund Lukas Leipfinger danke ich von ganzem Herzen für die sorgfältige Korrektur dieser Promotion und die vielen motivierenden Worte.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Gabriela und Wolfgang, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit keinesfalls möglich gewesen wäre. Euer bedingungsloser, keine Grenzen kennender Einsatz für eure Kinder sucht seinesgleichen. Vielen Dank für eure außergewöhnliche Unterstützung!