

Aus dem Department Universitäts-Herzzentrum
Klinik für Kardiologie und Angiologie I
des Universitätsklinikums Freiburg im Breisgau

**Der Einfluss des Cholesterinexports über *ATP-binding cassette* Transporter auf das Makrophagenverhalten in
der atherosklerotischen Plaque**



INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

Vorgelegt 2022

von Alina Dorothea Jander
geboren in Düsseldorf

Dekan: Prof. Dr. med. Lutz Hein
1.Gutachter: PD Dr. med. Ingo Hilgendorf
2.Gutachter: PD Dr. med. Dominik Bettinger
Jahr der Promotion: 2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Grundlagen und Pathophysiologie der Atherosklerose	1
1.2. Mechanismen der Lipidaufnahme und -abgabe bei Makrophagen.....	4
1.3. Cholesterinabhängige Makrophagenproliferation in der fortgeschrittenen Atherosklerose	8
1.4. Mausmodell: Gemischte Knochenmarkschimären mit LDLR ^{-/-} -Hintergrund-Defizienz und myeloid-spezifischer Defizienz für ABCA1/G1 und <i>Liver-X</i> -Rezeptor	10
1.5. Fragestellung	12
2. Materialien.....	14
2.1. Versuchstiere	14
2.2. Versuchsfutter	14
2.3. Stimulanzen.....	14
2.4. Antikörper.....	15
2.4.1. Antikörper für Durchflusszytometrie	15
2.4.2. Antikörper für Western Blot.....	17
2.4.3. Antikörper für Fluoreszenzmikroskopie.....	17
2.5. TaqMan Sonden.....	17
2.6. SYBR-Green Primer.....	17
2.7. Chemikalien, Reagenzien, Enzyme	18
2.8. Puffer	21
2.9. Medium	22
2.10. Gele	22
2.11. Kits	23
2.12. Sonstige Materialien.....	23
2.13. Geräte	24

2.14. Software	26
3. Methoden	27
3.1. <i>In vivo</i> Studie.....	27
3.1.1. Mausmodell: Generierung gemischter Knochenmarkschimären.....	27
3.1.2. Atherosklerosestudie	28
3.1.3. Blutzellgewinnung.....	29
3.1.4. Peritoneallavage und Organentnahme	30
3.2. Durchflusszytometrie.....	31
3.2.1. Oberflächenfärbung	31
3.2.2. Intrazelluläre Färbung gegen Ki 67 und Caspase 3.....	31
3.2.3. Zellsortierung mittels FACS	32
3.2.4. Auswertung.....	32
3.3. RNA-Isolation, cDNA-Transkription und quantitative <i>Real-Time</i> Polymerasekettenreaktion.....	33
3.3.1. RNA-Isolation und cDNA-Transkription.....	33
3.3.2. iQ SYBR Green Real-Time-Polymerasekettenreaktion.....	33
3.3.3. TaqMan Real-Time Polymerasekettenreaktion	34
3.4. Western Blot.....	35
3.4.1. Proteinlyse und -isolation von Gewebe und Zellen	35
3.4.1.1. Lebergewebe.....	35
3.4.1.2. Zellen.....	35
3.4.2. Bradford Assay	36
3.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
3.4.4. Proteintransfer	37
3.4.5. Antikörperfärbung und Bildaufnahme.....	37
3.5. Zellkultur: BODIPY-Cholesterin-Stimulationsversuch.....	38
3.5.1. Herstellung der BODIPY-Cholesterin-Lösung	38
3.5.2. Fluorometrische Messung der Cholesterinabgabe	40

3.5.3. Fluoreszenzmikroskopische Messung des intrazellulären Cholesteringehaltes	41
3.6. Statistische Auswertung	41
4. Ergebnisse	42
4.1. Generierung von gemischten Knochenmarkschimären mit myeloid-spezifischem ABCA1- und ABCG1-Doppelknockout	42
4.2. Die Cholesterinexporter ABCA1 und ABCG1 verhindern die Schaumzellbildung von Makrophagen <i>in vitro</i> und vermitteln den Cholesterinexport an extrazelluläres HDL.....	44
4.3. Wirkung der ABC-Transporter auf Makrophagenanreicherung in atherosklerotischen Aorten	46
4.3.1. Rolle der Cholesterinexporter ABCA1 und ABCG1 für die Proliferation und Apoptose von Aortenmakrophagen in der frühen und etablierten Atherosklerose.....	49
4.4. Die Rolle des <i>Liver-X</i> -Rezeptor als Transkriptionsfaktor der ABCA1- und ABCG1-Transporter in der etablierten Atherosklerose.....	51
4.5. Zytokinexpression in myeloid-spezifisch ABCA1-ABCG1-defizienten gemischten Knochenmarkschimären	54
5. Diskussion	56
5.1. Überblick	56
5.2. Makrophagen-Apoptose, Inflammation, Inflammasom	60
5.3. Therapeutische Ansätze	63
6. Zusammenfassung	69
7. Literaturverzeichnis	70
8. Förderung.....	78
9. Publikationen und Auszeichnungen	79
10. Lebenslauf.....	80
11. Eidesstattliche Versicherung	83
12. Erklärung zum Eigenanteil.....	84
13. Danksagung	86

Abkürzungsverzeichnis

A	
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABCA1	<i>ATP-binding cassette</i> -Transporter A1
ABCG1	<i>ATP-binding cassette</i> -Transporter G1
ABC-DKO	ABCA1-ABCG1-Doppel-Knockout
ApoA1	Apolipoprotein A1
ApoE	Apolipoprotein E
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain (CARD)</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B	
BODIPY	23-(dipyrrromethene-boron difluoride) – 24 - norcholesterin
BSA	Bovines Serumalbumin
BrdU	Bromodesoxyuridin
Bzw.	beziehungsweise
C	
CCL2	CC-Chemokin Ligand Typ 2
CCL5	CC-Chemokin Ligand Typ 5
CCR	CC-Chemokin Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CX ₃ CR1	Chemokin-CX3-Rezeptor 1
D	
DAMPs	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol

DKO	Doppel- <i>Knockout</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E	
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
etc.	et cetera
F	
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal bovine serum</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
Fizz	<i>Found in Inflammatory Zone</i>
fl	<i>Floxed (flanked by LoxP)</i>
G	
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor</i>
H	
HCD	<i>High cholesterol diet</i>
HDL	<i>high-density-lipoprotein</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSPCs	hematopoetic stem and progenitor cells

I	
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN γ	Interferon γ
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
K	
KHK	Koronare Herzkrankheit
KM	Knochenmark
KO	<i>Knockout</i>
L	
LDL	<i>low-density-lipoprotein</i>
LDLR	LDL-Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharidsäure
Ly6C	Lymphozyten Antigen 6C
Ly6C ^{high}	Ly6C hoch exprimierend
Ly6C ^{low}	Ly6C niedrig exprimierend
Ly6G	Lymphozyten Antigen 6G
LysM	Lysozym M
LXRE	<i>Liver-X-response-element</i>
LXR α/β	<i>Liver-X-Rezeptorα/β</i>
M	
μ	Mikro
μ M	Mikromolar
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>

mg	Milligramm
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
Msr 1	<i>Macrophage Scavenger Receptor 1</i>
N	
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
NLR	<i>nucleotide-binding oligomerization domain and leucine-rich repeat-containing receptors</i>
NLRP3	<i>NLR Family Pyrin domain containing 3</i>
Nm	Nanometer
n.s.	Nicht signifikant
O	
oxLDL	<i>Oxidized low-density-lipoprotein</i>
P	
PacB	<i>Pacific Blue</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PECy7	Tandem-Fluorochrom, das Phycoerythrin und den Cyaninfarbstoff Cy7 verbindet
Per-CP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex
Per-CPCy5.5	Tandem-Fluorochrom, das Per-CP und den Cyaninfarbstoff Cy5.5 verbindet
PFA	Paraformaldehyd
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>

Q	
qRT-PCR	<i>Quantitative real time polymerase chain reaction</i>
R	
RBC	Red blood cell
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
S	
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SR-A1	<i>Scavenger receptor type 1 (auch Msr-1 genannt)</i>
T	
TGF- β	<i>Tissue growth factor beta</i>
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
u.a.	unter anderem
V	
VCAM-1	<i>vascular adhesion molecule 1</i>
VLDL	<i>very low-density-lipoprotein</i>

W	
WT	Wildtyp
Z	
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Der stadienhafte Verlauf der Atherogenese (6).....	2
Abb. 2	Mechanismus der Cholesterin- und Phospholipidabgabe über ABCA1 an ApoA1 (29)	6
Abb. 3	Mechanismus der transkriptionellen Regulation durch LXR (35)	7
Abb. 4	Mechanismen der Lipidaufnahme und -abgabe bei Makrophagen (20).....	8
Abb. 5	Prozentualer und absoluter Anteil BrdU ⁺ WT- und Msr1 ^{-/-} Plaquemakrophagen (36).....	9
Abb. 6	Modell der Atheroprogression (36).....	10
Abb. 7	Generierung der gemischten Knochenmarkschimären	28
Abb. 8	Versuchsablauf mit Zeitstrahl.....	29
Abb. 9	Struktur von BODIPY-Cholesterin (61).....	38
Abb. 10	Qualitative Analyse der Proteinexpression von ABCA1 in exemplarischen Lysaten aus Wildtyp- und ABC-defizienten Peritonealmakrophagen und Lebergewebe der MAC-ABC ^{DKO} -Spendermäuse	43
Abb. 11	ABCA1/ABCG1-mRNA-Expression in CD 45.1 ⁺ Wildtyp- und CD 45.2 ⁺ ABCA1-ABCG1-defizienten Makrophagen.....	44
Abb. 12	Cholesterinexport über die ABC-Transporter bei Makrophagen	45
Abb. 13	Schema der <i>in vivo</i> Analyse der gemischten Knochenmarkschimären mittels Durchflusszytometrie.....	47
Abb. 14	Chimärismus von Wildtyp- und ABCA1/G1-defizienten Monozyten aus dem Blut und der Aorta sowie in Plaquemakrophagen zum Zeitpunkt der frühen Atherosklerose	48
Abb. 15	Chimärismus von Wildtyp- und ABCA1/G1-defizienten Monozyten aus dem Blut und der Aorta sowie in Plaquemakrophagen zum Zeitpunkt der etablierten Atherosklerose	49
Abb. 16	Proliferations- und Apoptoserate von Wildtyp- und ABCA1/ABCG1-doppelt-defizienten Plaquemakrophagen in der frühen Atherosklerose	50
Abb. 17	Proliferations- und Apoptoserate von Wildtyp- und ABCA1/ABCG1-doppelt-defizienten Plaquemakrophagen in der fortgeschrittenen Atherosklerose.....	51
Abb. 18	Chimärismus von Wildtyp- und LXR-defizienten Monozyten aus dem Blut und der Aorta sowie in Plaquemakrophagen zum Zeitpunkt der etablierten Atherosklerose	53

Abb. 19	Proliferations- und Apoptoserate von Wildtyp- und LXR α / β -defizienten Plaquemakrophagen in der fortgeschrittenen Atherosklerose	54
Abb. 20	Myeloid-spezifische ABCA1-ABCG1-Defizienz hat geringe Effekte auf den inflammatorischen Phänotyp von Aortenmakrophagen	55
Abb. 21	Stadienabhängige Auswirkung der Apoptose von Makrophagen in der Atherosklerose (69)	61
Abb. 22	Die Aufnahme cholesterinreicher LDL-Partikel über die Scavenger-Rezeptoren Msr1 und CD36 fördert die Proliferation von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques (74)	66
Abb. 23	S-HDL inhibiert die Makrophagenproliferation (93)	67

1. Einleitung

1.1. Grundlagen und Pathophysiologie der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine chronisch inflammatorische Gefäßerkrankung, bei der es durch die Bildung atherosklerotischer Plaques zu einer fortschreitenden Gefäßstenosierung, Plaquedestabilisierung mit Ruptur und Ausbildung einer luminalen Thrombose kommt (1). Mit ihrer Manifestation an den Herzkranzgefäßen und den hirnversorgenden Arterien ist die Atherosklerose die Hauptursache für den Myokardinfarkt und den ischämischen Schlaganfall (2). Damit stellt sie global die häufigste Todesursache dar (3). Atherosklerose ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei der genetische Faktoren, Umwelteinflüsse und individuelle Risikofaktoren die Entstehung und die Dynamik des Fortschreitens der Erkrankung beeinflussen. Zu den stark genetisch determinierten Faktoren zählen erhöhte Plasmaspiegel von Lipoproteinen wie *low-density-lipoprotein* (LDL), *very low-density-lipoprotein* (VLDL) und Lipoprotein a, erniedrigte *high-density-lipoprotein* (HDL)-Spiegel, Übergewicht, Diabetes, arterielle Hypertonie und das männliche Geschlecht. Atherosklerose begünstigende Umwelteinflüsse umfassen insbesondere Lebensstil-abhängige Faktoren wie fettreiche Ernährung, Bewegungsmangel und das Rauchen (4,5).

Pathogenetisch spielen die Akkumulation von Lipoproteinen wie LDL und die Invasion von Entzündungszellen in die Intima von Gefäßwänden eine entscheidende Rolle bei der stadienhaft verlaufenden Plaqueinitiierung, -etablierung und -ruptur (4,6). Initial induzieren das Anfallen oxidativ modifizierten LDLs sowie Veränderungen im Blutfluss von laminarer zu turbulenter Strömung eine Dysfunktion des Endothels. Hierbei kommt es im Zuge einer inflammatorischen Aktivierung des Endothels, vor allem an typischen Prädilektionsstellen wie Gefäßabgängen und -krümmungen, zu einer erhöhten Permeabilität für LDL (4,7) sowie zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen für Immunzellen wie Monozyten, T-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Mastzellen (7), die deren Adhärenz, Migration und Akkumulation in die arterielle Intima bewirken (6,8).

Die frühesten Manifestationsformen, die bereits bei Kindern und Jugendlichen auftreten können und asymptomatisch sowie teilweise reversibel sind (2), werden als *fatty streaks* bezeichnet und bestehen als rein inflammatorische Läsionen aus Entzündungszellen wie lipidbeladenen Monozyten, von Monozyten abstammenden Makrophagen, T-Lymphozyten sowie subendothelialen Lipidablagerungen (6,8). Im

weiteren Verlauf migrieren glatte Muskelzellen in die Läsion und es kommt zur Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an der luminalen Oberfläche der Läsion. Das Fortschreiten zu einer komplexen Läsion beinhaltet die Formation des nekrotischen Kerns durch das Anfallen von nekrotischen und apoptotischen Zellen, freien Cholesterinkristallen und Zellschrott, und die Ausbildung einer fibrösen Kapsel, die aus einer kollagenreichen Matrix und glatten Muskelzellen besteht und den nekrotischen Kern bedeckt und zunächst stabilisiert (2). Im weiteren Progress entwickelt sich die komplexe Läsion im Zuge der Ausdünnung der fibrösen Kapsel durch die Aktivität proteolytischer Enzyme zu einer instabilen Plaque (Abb. 1).

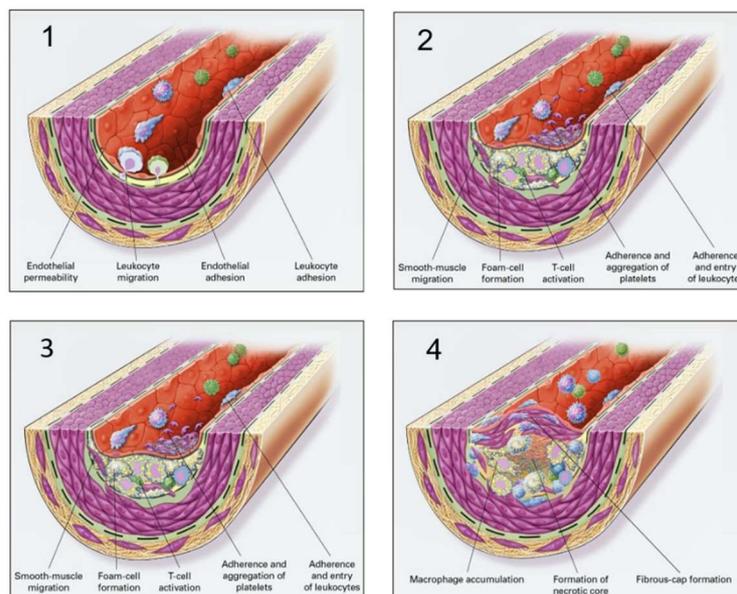


Abb. 1 Der stadienhafte Verlauf der Atherogenese (6)

1. Die initiale endotheliale Dysfunktion beinhaltet eine erhöhte endotheliale Permeabilität für Lipoproteine und andere Plasmabestandteile sowie die Expression von Leukozytenadhäsionsmolekülen an der Endotheloberfläche, was die Adhäsion und Transmigration von Entzündungszellen in die Intima ermöglicht.
2. Die sogenannten *fatty streaks* bestehen aus Lipid-beladenen Monozyten, Makrophagen-Schaumzellen und anderen Entzündungszellen. Im weiteren Verlauf migrieren glatte Muskelzellen in die Läsion und es kommt zur Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an der luminalen Oberfläche der Läsion.
3. Das Fortschreiten zu einer komplexeren Läsion beinhaltet die Ausbildung einer fibrösen Kapsel, die einen lipidreichen Kern mit apoptotischen und lebenden Entzündungszellen bedeckt.
4. Im weiteren Verlauf dünnen proteolytische Enzyme die fibröse Kappe aus und es entwickelt sich aus einer komplexen Läsion eine instabile Plaque. Dies resultiert schlussendlich in einer Plaqueruptur mit Ausbildung eines luminalen Thrombus.

Das Ausmaß der Inflammation des nekrotischen Kerns sowie die Beschaffenheit der fibrösen Kappe determinieren hierbei entscheidend das biologische Verhalten

der Plaque (4). Je dünner die fibröse Kapsel und je komplexer und lipidreicher der Plaquekern, desto eher droht eine Plaqueruptur, die wiederum thrombogenes Material aus dem Läsionskern freilegt und zu einer konsekutiven Plättchenaggregation und Thrombusbildung an der luminalen Oberfläche führt (9). Daraus resultiert entweder eine lokale Okklusion des Gefäßes, wie beispielsweise in den Herzkranzgefäßen beim Myokardinfarkt, oder eine Verschleppung des Thrombus als Embolie in nachgeschaltete Gefäßsysteme mit konsekutiver Ischämie, wie beim embolischen ischämischen Schlaganfall (8).

Ein entscheidender Schritt in der Atherogenese stellt also die hämatogene Invasion und Akkumulation von Entzündungszellen, insbesondere von Monozyten, in die Intima dar (10). Die der Atherosklerose mitursächlich zugrundeliegende Hypercholesterinämie induziert eine Proliferation von Monozyten: so ist der Anteil zirkulierender Monozyten in vermehrt Atherosklerose-suszeptiblen ApoE^{-/-}-Mäusen um 50% höher als in gesunden Wildtyp-Mäusen (11,12). Quellen zirkulierender Monozyten sind das Knochenmark sowie extramedulläre Organe wie die Milz (13). Im Knochenmark induziert die im Zuge der Hypercholesterinämie auftretende Cholesterinanreicherung in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (hematopoietic stem and progenitor cells = HSPCs) als Vorläufer von Monozyten und neutrophilen Granulozyten eine vermehrte Expression des Wachstumsfaktors *Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) und damit die Proliferation der HSPCs (14,15). Ebenfalls GM-CSF sowie IL-3 (Interleukin 3) abhängig wird in der Milz die Monozytopoese von dort ansässigen myeloiden Vorläuferzellen gefördert (13).

Die zirkulierenden Monozyten der Maus werden in zwei Untergruppen unterteilt: Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten (16–18). Ly6C^{high} Monozyten werden als pro-inflammatorisch beschrieben und dominieren die Monozytose bei Hypercholesterinämie. Ly6C^{high} Monozyten binden bevorzugt an das entzündlich aktivierte Endothel und akkumulieren in den Läsionen, wo sie anschließend zu Makrophagen differenzieren (19). Somit stammen die Plaquemakrophagen hauptsächlich von zirkulierenden Ly6C^{high} Monozyten ab (11). Sie entsprechen den CD14⁺ Monozyten beim Menschen (1). Ly6C^{low} Monozyten repräsentieren den anti-inflammatorischen Subtyp. Sie patrouillieren entlang der Gefäße, haben eine wichtige homöostatische Funktion und differenzieren in nicht entzündetem Gewebe

zu Makrophagen und myeloischen dendritischen Zellen (20). Beim Menschen entsprechen sie den CD16⁺ Monozyten (1).

Entscheidende Mechanismen bei der Leukozytenadhäsions- und migrationskaskade (21) stellen Interaktionen von Chemokinen und Chemokinrezeptoren wie CCL2/CCR2, CCL5/CCR5 und CX3CL1/CX3CR1 dar (20). So exprimieren Ly6C^{high} Monozyten vor allem den Chemokinrezeptor CCR2, aber wenig CX3CR1, können also als Ly6C^{high} CCR2⁺ CX3CR1^{low} charakterisiert werden, während Ly6C^{low} Monozyten vor allem den Chemokinrezeptor CX3CR1 exprimieren und als Ly6C^{low} CCR2⁻ CX3CR1^{high} charakterisiert werden. Die kombinierte Deletion von CCR2, CX3CR1 und CCR5 verhinderte in Mäusen mit bestehender Hypercholesterinämie die Monozytose und reduzierte die atherosklerotische Läsionsgröße um 90% (22).

1.2. Mechanismen der Lipidaufnahme und -abgabe bei Makrophagen

In der Phase der Plaqueinitiierung hängt somit die Makrophagenakkumulation wesentlich vom Ausmaß der Rekrutierung zirkulierender Monozyten ab (23). Diese differenzieren nach der Invasion in die entstehende Läsion unter dem Einfluss von *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) zu Makrophagen (23,24), die den Plaquekern formieren und die Schlüsselrolle für den weiteren Läsionsprogress spielen (2). Hierbei beeinflussen das jeweilige Mikromilieu mit unterschiedlichen extra- und intrazellulären Faktoren wie Lipiden, Cholesterinkristallen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren die Polarisierung der Plaquemakrophagen und bewirken somit eine dynamische Plastizität ihres Phänotyps. Die klassische Einteilung in pro-inflammatorische M1- und anti-inflammatorische M2-Makrophagen wurde inzwischen erweitert um viele verschiedene Phänotypen, die allesamt in einer atherosklerotischen Läsion vorkommen können (1). An einem Ende des Spektrums stehen die M1-Makrophagen, die durch Produkte von Typ 1 T-Helferzellen (Th1-Lymphozyten) wie z.B. Interferon- γ (IFN γ) oder durch pro-inflammatorische Zytokine wie dem Tumornekrosefaktor, Lipopolysaccharidsäure (LPS), aber auch oxidiertes LDL und Cholesterinkristalle klassisch aktiviert werden. M1-Makrophagen wiederum sezernieren nach ihrer Aktivierung ebenfalls pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-12 und TNF α und toxische Substanzen wie *reactive*

oxygen species (ROS) z.B. zur Eindämmung und Eradikation von bakteriellen Infektionen. Sie befinden sich vor allem im nekrotischen Lipidkern von Rupturgefährdeten Plaques. Auf der anderen Seite des Spektrums sind die alternativ, u.a. durch IL-4, aktivierten M2-Makrophagen angesiedelt, die vor allem für die Gewebereparatur zuständig sind, anti-inflammatorische Eigenschaften haben, anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF β sezernieren und in Plauebereichen mit vermehrter Angiogeneese angereichert sind (25).

Die Plaquemakrophagen nehmen die in der Läsion anfallenden Lipide auf und transformieren so zu den sogenannten Schaumzellen. Für ihr weiteres Verhalten ist die intrazelluläre Lipidhomöostase von entscheidender Bedeutung, die durch die gegenläufigen Prozesse der Lipidaufnahme und Lipidabgabe reguliert wird. Das in der Läsion akkumulierende LDL liegt durch die Einwirkung freier Radikale wie *reactive oxygen species* (ROS) oxidativ modifiziert vor und wird von Makrophagen vor allem über ihre *pattern recognition receptors* (PRRs) aufgenommen, zu denen der Scavenger Rezeptor Klasse A, auch *Macrophage Scavenger Receptor 1* (MsR 1) genannt, und der Scavenger Rezeptor Klasse B, auch CD36 genannt, gezählt werden (20,26). Nach Verdau im Lysosom wird das daraus frei gesetzte Cholesterin zum endoplasmatischen Retikulum transportiert und nach enzymatischer Veresterung in Lipidtröpfchen gespeichert, was den Makrophagen ihre typische Schaumzellmorphologie verleiht.

Das Cholesterin kann andererseits über verschiedene Mechanismen aus der Zelle ausgeschleust werden. Zum einen kann Cholesterin passiv aus der Zelle diffundieren. Dieser Vorgang, der in erster Linie relevant ist im Falle einer ausgeglichenen intrazellulären Lipidbelastung, hängt vom Cholesterinkonzentrationsgradienten ab und stellt einen eher ineffektiven Cholesterin-Auswärtstransport dar (27). Hingegen kommt im Falle einer intrazellulären Lipidüberladung der rezeptorabhängigen, aktiven Cholesterinabgabe eine entscheidende Rolle zu (28). 70% der rezeptorabhängigen Cholesterinabgabe bei Cholesterinüberladung werden über die beiden Mitglieder der *Adenosine-Triphosphate-(ATP)-binding cassette transporter 1* (ABC1) Familie *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1) und *ATP-binding cassette transporter G1* (ABCG1) vermittelt (28). ABCA1 gibt Cholesterin und Phospholipide an cholesterinarmes Apolipoprotein A1 (ApoA1) ab (29), welches ein Hauptbestandteil von HDL ist, während ABCG1 die Cholesterinabgabe an reife HDL-Partikel

vermittelt (Abb. 2). ABCG1 ist vor allem verantwortlich für den Auswärtstransport von 7-Ketocholesterin, das das am häufigsten vertretende Oxysterol in oxidiertem LDL und in menschlichen atherosklerotischen Plaques ist und dem aufgrund seiner Zytotoxizität eine entscheidende Rolle für die Plaqueinstabilität zugeschrieben wird (30). Mit der Abgabe an HDL beginnt der reverse Cholesterintransport vom peripheren Gewebe zurück zur Leber, dem aufgrund des peripheren Cholesterinentzugs demnach atheroprotektive Eigenschaften zukommen.

Die ABC-Proteine stellen die größte Familie von Transmembranproteinen dar mit insgesamt 48 ABC-Transportern, unterteilt in 7 Subgruppen (ABCA bis ABCG) (31). Die Proteine binden und hydrolysieren ATP (32) und verwenden die daraus frei werdende Energie für den Transport unterschiedlichster Moleküle über Membranen. ABC-Transporter pumpen vor allem hydrophobe Moleküle in unidirektionaler Ausrichtung innerhalb intrazellulärer Kompartimente oder nach extrazellulär im Rahmen metabolischer Prozesse, wie beispielsweise dem Lipidmetabolismus (33). Die Proteine werden aufgrund ihrer Sequenz und der Organisation ihrer ATP-Bindestelle klassifiziert: ein ABC-Transporter besteht typischerweise aus zwei Nukleotid-Bindestellen (NBDs) und zwei Transmembran-Domänen mit der Ligandenbindestelle, die somit entscheidend ist für die Spezifität des zu bindenden Substrates (Abb. 2). Die Nukleotidbindestellen sind im Zytoplasma lokalisiert und liefern die für den Transport notwendige Energie. Sie werden in die katalytische Kernuntereinheit und in die α -Helix-Domäne unterteilt. Die katalytische Domäne interagiert mit dem Phosphat des Adenosintriphosphats, die α -Helix-Domäne bindet das ATP (32).

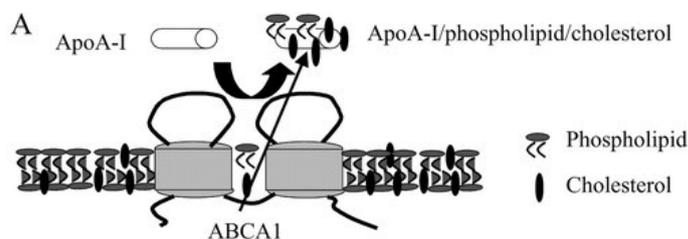


Abb. 2 Mechanismus der Cholesterin- und Phospholipidabgabe über ABCA1 an ApoA1 (29)
 Der aus zwei Transmembrandomänen bestehende ABCA1-Transporter pumpt ATP-abhängig Cholesterin und Phospholipide an ApoA-1, dem Hauptbestandteil von HDL, nach extrazellulär, um es im Zuge des reversen Cholesterintransportes zurück zur Leber zu führen.

Die Genexpression von ABCA1 und ABCG1 wird durch deren Transkriptionsfaktoren, den *Liver-X-Rezeptoren* (LXR), reguliert. Sie fungieren als sogenannte Cholesterinsensoren, indem sie ligandenabhängig durch endogene Liganden wie z.B. oxidierte Cholesterinderivate bei intrazellulärer Cholesterinanhäufung aktiviert werden (20,34). Die beiden Isoformen LXR α , der vor allem in der Leber, im Darm, in der Niere, in der Milz und im Fettgewebe vorkommt, und LXR β , der ubiquitär exprimiert ist, agieren als Heterodimere gemeinsam mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR), der als Bindungspartner für nukleäre Rezeptoren fungiert. Das in Makrophagen akkumulierende Cholesterin induziert die Aktivierung des LXR/RXR-Komplexes, der an das entsprechende *Liver-X-response-element* (LXRE) in der Promotorregion der Zielgene ABCA1 und ABCG1 bindet und deren Expression hochreguliert (35) (Abb. 3).

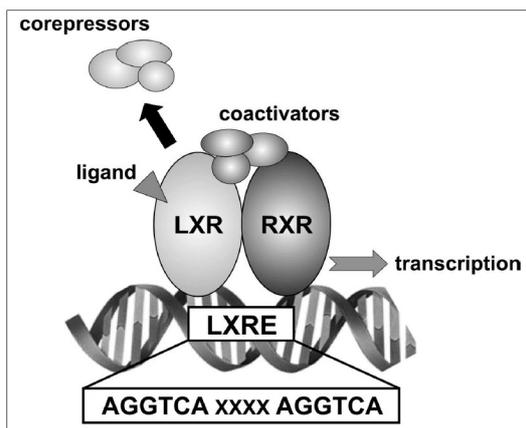


Abb. 3 Mechanismus der transkriptionellen Regulation durch LXR (35)

Ligandenabhängige Bindung des Heterodimers LXR-RXR an das LXR-responsible Element (LXRE) in der Promoterregion des Zielgenes. Die Aktivität des Heterodimers wird reguliert durch Co-Aktivatoren und Co-Repressoren. In der Abwesenheit von Liganden binden Co-Repressoren an LXR-Heterodimer, die bei Rezeptoraktivierung durch Liganden mit Co-Aktivatoren ausgetauscht werden. Das LXRE besteht aus zwei Hexanukleotidsequenzen (AGGTCA), die durch vier Basen voneinander getrennt sind („xxxx“ in der Abbildung).

Die zentrale Rolle der Cholesterinimporter Msr1 und CD36 einerseits und der Cholesterinexporter ABCA1 und ABCG1 in Zusammenspiel mit ihrem Transkriptionsfaktor *Liver-X-Rezeptor* andererseits in der Regulation der intrazellulären Lipidhomöostase in Makrophagen fasst Abbildung 4 noch einmal zusammen.

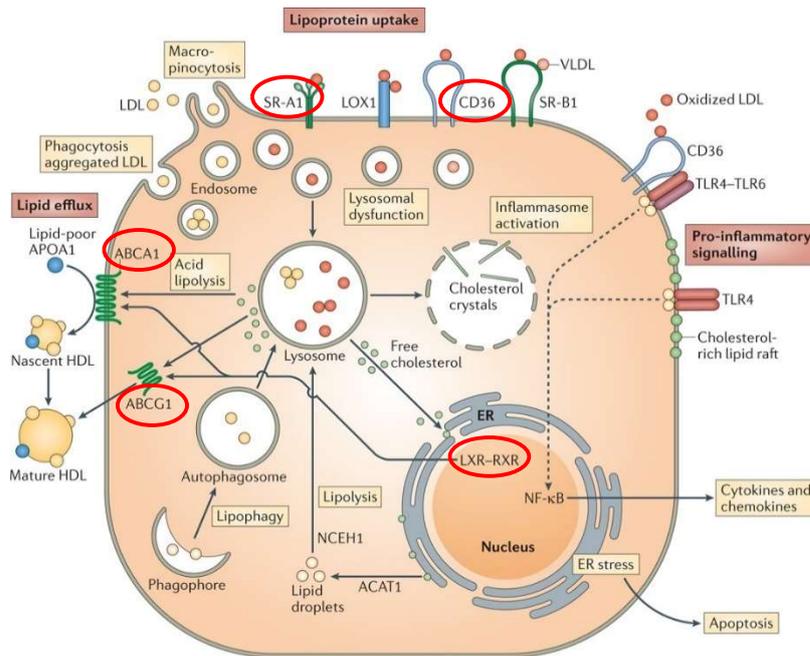


Abb. 4 Mechanismen der Lipidaufnahme und -abgabe bei Makrophagen (20)

Makrophagen nehmen natives und modifiziertes LDL unter anderem rezeptorvermittelt über die Scavenger Rezeptoren Typ A (Msr1/SR-A1) und Typ B (CD36) auf. Das aufgenommene LDL wird im Lysosom verdaut. Das daraus frei gesetzte Cholesterin wird zum endoplasmatischen Retikulum transportiert und nach enzymatischer Veresterung in Lipidtröpfchen gespeichert. Die intrazelluläre Akkumulation von Cholesterin aktiviert den Transkriptionsfaktor *Liver-X-Rezeptor* (LXR), der zusammen mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) als Heterodimer die Expression der ABC-Transporter ABCA1 und ABCG1 hochreguliert. ABCA1 und ABCG1 geben Cholesterin an lipidarmes apoA1 und HDL ab im Zuge des reversen Cholesterintransportes zur Leber. Bei Ausschöpfung der Kompensationsmöglichkeiten fallen toxische Cholesterinkristalle aus, die das NLRP3-Inflammasom aktivieren sowie andere pro-inflammatorische Signalwege, die in ER-Stress und schlussendlich im Zelltod resultieren. Eingezeichnet sind die hier relevanten Moleküle (ABCA1, ABCG1, LXR, SR-A1 sowie CD 36).

1.3. Cholesterinabhängige Makrophagenproliferation in der fortgeschrittenen Atherosklerose

Der Lipidmetabolismus in Plaquemakrophagen spielt nicht nur in der Frühphase der Atherosklerose eine bedeutende Rolle für inflammatorische und apoptotische zelluläre Signalwege. Vielmehr stellt er auch in der etablierten Plaque einen zentralen Mechanismus für den Progress der atherosklerotischen Läsion dar. Während jedoch in der Frühphase die hämatogene Monozyteneinwanderung entscheidend ist für die Makrophagenakkumulation in der Plaque, spielt dieser Mechanismus in der etablierten Plaque eine untergeordnete Rolle. Stattdessen hängt das Ausmaß der Makrophagenakkumulation im fortgeschrittenen Atherosklerosestadium maßgeblich von deren lokalen Proliferation ab (36).

Während in der frühen Atherosklerose die Makrophagenakkumulation zu 70% durch Monozytenrekrutierung gespeist wird, entstehen in der fortgeschrittenen Atherosklerose 87% der Makrophagenakkumulation durch lokale Proliferation. *Hilgendorf et al.* identifizierten die Lipidaufnahme über den *Macrophage Scavenger Receptor 1* (Msr 1) als Trigger für die lokale Proliferation der Aortenmakrophagen in der etablierten Plaque. Experimente mit gemischten Knochenmarkschimären, die nach einer Bestrahlung mit 50% Wildtyp- und 50% Msr1-defizienten Knochenmarkszellen rekonstituiert wurden, zeigten eine verminderte Proliferation von Plaquemakrophagen mit einer Gendefizienz für Msr1 im Vergleich zu Msr1-kompetenten Plaquemakrophagen, gemessen an dem Anteil BrdU-positiver Zellen, einem Thymidinanalogon, das in die DNA proliferierender Zellen interkaliert (36) (Abb. 5).

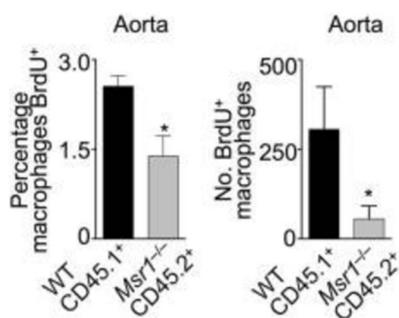


Abb. 5 Prozentualer und absoluter Anteil BrdU⁺ WT- und Msr1^{-/-}-Plaquemakrophagen (36)
 Dargestellt ist im linken Diagramm der prozentuale Anteil von WT- und Msr1-defizienten Plaquemakrophagen, die BrdU positiv sind. Msr1-defiziente Plaquemakrophagen sind signifikant weniger BrdU positiv und proliferieren demnach weniger. Das rechte Diagramm erfasst den Zusammenhang in absoluten Zahlen. (Mittelwert ± SEM, n = 5, *P < 0,05)

Die dem stadienhaften Verlauf der Atheroprogression unterschiedlichen zugrundeliegenden Mechanismen stellen ein zentrales Paradigma für dieses Promotionsprojekt dar. Die Abbildung 6 fasst dieses noch einmal zusammen.

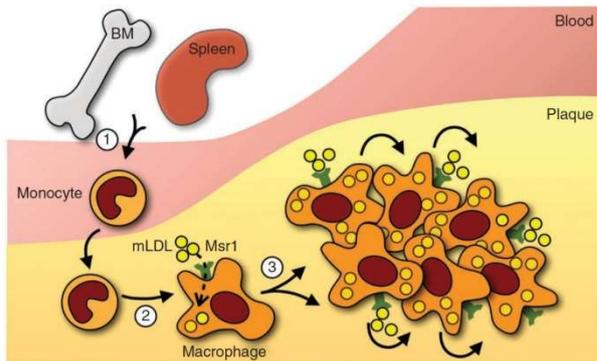


Abb. 6 Modell der Atheroproliferation (36)

In der entstehenden Plaque trägt die hämatogene Rekrutierung von Monozyten hauptsächlich zur Zellakkumulation bei, während in der etablierten Plaque die lokale, Cholesterin-getriggerte Makrophagenproliferation die Zellakkumulation dominiert. Monozyten von medullären und extramedullären Quellen wie der Milz infiltrieren die entstehende intimale Läsion (1) und differenzieren zu Makrophagen (2). Makrophagen nehmen modifiziertes LDL (mLDL) u.a. über den *Macrophage Scavenger Receptor 1* (Msrl) auf und werden zu Schaumzellen, die lokal proliferieren (3).

Da der Cholesterinauswärtstransport aus Makrophagen einen wichtigen Kompensationsmechanismus bei Lipidüberladung darstellt, werden für die Cholesterinexporter ABCA1 und ABCG1 sowie für den *Liver-X-Rezeptor* (37) antiatherogene und antiinflammatorische Eigenschaften angenommen (38,39). Inwieweit dieser Effekt über die Beeinflussung der lokalen, lipidabhängigen Makrophagenproliferation in der Plaque vermittelt wird, ist unbekannt. Die Hypothese dieser Studie war, dass die Lipidaufnahme über die Scavenger-Rezeptoren die Schaumzellbildung fördert, was wiederum die lokale Proliferationsrate steigert, während die ABC-Transporter und *Liver-X-Rezeptoren* antiproliferative und damit atheroprotektive Effekte vermitteln.

1.4. Mausmodell: Gemischte Knochenmarkschimären mit LDLR^{-/-}-Hintergrund-Defizienz und myeloid-spezifischer Defizienz für ABCA1/G1 und *Liver-X-Rezeptor*

Es wurde die vergleichende Betrachtung des Phänotyps und der Funktion von ABC-Transporter- und LXR-kompetenten und defizienten Plaquemakrophagen zum Zeitpunkt der frühen und fortgeschrittenen Atherosklerose in murinen atherosklerotischen gemischten Knochenmarkschimären durchgeführt. Hierfür wurden LDL-Rezeptor-(LDLR) -defiziente Mäuse nach Bestrahlung mit Knochenmark transplantiert, das zu 50% aus Gen-defizienten und zu 50% aus Wildtyp-Knochenmarkszellen bestand. Gendefizienz bestand entweder für die

ABCA1- und ABCG1-Transporter oder für den *Liver-X*-Rezeptor. Da eine ubiquitäre Deletion in allen Zellen bereits von ABCA1 allein mit einer schlechteren Überlebenschance der Mäuse assoziiert wird und als belasteter Phänotyp beschrieben wurde (40), wurde eine myeloid-spezifische Deletion der beiden ABC-Transporter gewählt.

Das Modell des gemischten Chimärismus ermöglichte den direkten Vergleich von Wildtyp- und gendefizienten Zellpopulationen im selben atherosklerotischen Plaquemikromilieu. Unterschiede zwischen den Genotypen waren daher zellintrinsisch und unbeeinflusst von systemischen Störeinflüssen, wie sie bei einheitlichen *Knockouts* auftreten können.

An dieser Stelle soll auf die verschiedenen Mausmodelle in der Atherosklerose-Forschung eingegangen werden. Da Wildtyp-Mäuse aufgrund von hohen HDL-Spiegeln und niedrigen LDL-Werten weitgehend resistent gegen Atherosklerose sind (41), werden in der Regel Mäuse mit dem Atherosklerose-anfälligen genetischen Hintergrund C57Bl/6J (BL6) verwendet (42–45). Da diese Mäuse aber selbst unter langer, cholesterinreicher Fütterung nur sehr kleine atherosklerotische Läsionen entwickeln, die einem frühen Stadium entsprechen, werden transgene Mäuse entwickelt mit unterschiedlichen Gendefizienzen im Lipidmetabolismus und konsekutiver Dyslipidämie (44). Die beiden gängigsten Mausmodelle sind Mäuse mit einer LDL-Rezeptor-Defizienz und Mäuse mit einer Apolipoprotein E (ApoE)-Defizienz. Die in dieser Arbeit verwendete Defizienz im LDL-Rezeptor beeinträchtigt die Lipoproteinaufnahme und -beseitigung aus der Zirkulation mit einer konsekutiven LDL-Hyperlipoproteinämie (46). Das LDLR^{-/-}-Modell wurde in dieser Studie aus verschiedenen Gründen anstelle eines ApoE^{-/-}-Modells verwendet. ApoE wird hauptsächlich von aus dem Knochenmark stammenden Makrophagen gebildet und sezerniert und hat einen systemischen anti-atherosklerotischen Effekt, indem es unter anderem als ein Ligand des auf der hepatischen Oberfläche befindlichen LDL-Rezeptors die hepatische Aufnahme von zirkulierenden Lipoproteinen vermittelt (41). Bei einer, wie in dieser Promotionsarbeit durchgeführten, Knochenmarkstransplantation mit Knochenmarkszellen von ApoE-kompetenten Spendermäusen würde der Effekt einer ApoE-Empfänger-Defizienz zunichte gemacht werden und somit die Atherogenese verringert werden (45). LDLR^{-/-}-Mäuse entwickeln jedoch auch nach Bestrahlung und Knochenmarkstransplantation Atherosklerose (47). Ein weiterer Vorteil des LDLR^{-/-}

-Modells gegenüber dem ApoE^{-/-}-Modells stellt die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen dar: während ApoE^{-/-}-Mäuse auch unter normaler Fütterung (*chow diet*) bereits Hyperlipidämien (45) sowie spontane atherosklerotische Läsionen entwickeln (41,46), entstehen diese in LDLR^{-/-}-Mäusen erst unter einer cholesterinreichen Fütterung. Somit war in dieser Studie unter Verwendung des LDLR^{-/-}-Modells der Erkrankungsbeginn vom Untersucher willkürlich steuerbar und für alle Mäuse eines Versuchs synchronisierbar, was eine bessere Vergleichbarkeit innerhalb der Versuchspopulation ermöglichte. Das LDLR^{-/-}-Modell ist außerdem ein moderateres Atherosklerosemodell im Vergleich zum ApoE-Modell, da die Mäuse nicht solche extremen Hyperlipidämien wie das ApoE^{-/-}-Modell aufweisen (41). Außerdem ist die Lipoproteinverteilung dem von Menschen mit familiärer Hypercholesterinämie sehr ähnlich (45).

Da außerdem für das Ausmaß der Atherosklerose geschlechtsspezifische Unterschiede beschrieben wurden, wurden für diese Studie nur weibliche Mäuse verwendet, die im Vergleich zu männlichen Mäusen unter einer cholesterinreichen Fütterung weniger HDL aufweisen und folglich verstärkt atherosklerotische Läsionen ausbilden (48).

1.5. Fragestellung

Gegenstand dieses Promotionsprojektes ist die intrazelluläre Lipidhomöostase in Makrophagen als Schlüsselmechanismus für das Verhalten von Makrophagen in der etablierten atherosklerotischen Plaque. Arbeitshypothese war unter anderem, dass die gegenläufigen Prozesse von Lipidaufnahme über die Scavenger-Rezeptoren und die Lipidabgabe über die ABCA1- und ABCG1-Transporter zentrale Mechanismen für die Regulation inflammatorischer Pathomechanismen darstellen. Diese Arbeit beleuchtet die pathophysiologische Funktion der Cholesterinabgabe über die ABC-Transporter an der Zelloberfläche von Makrophagen, sowie auf transkriptioneller Ebene den Einfluss des *Liver-X*-Rezeptors, der die Expression der ABC-Transporter reguliert, in Bezug auf das Verhalten von Makrophagen in der etablierten Atherosklerose. Als entscheidender Treiber für das Fortschreiten der etablierten Atherosklerose konnte in Vorarbeiten von *Hilgendorf et al.* die lokale Proliferation der von Monozyten abstammenden Makrophagen in der Plaque herausgestellt werden (36). *Westerterp et al.* zeigten, dass die Cholesterinexporter ABCA1 und ABCG1 in Makrophagen anti-inflammatorische und anti-atherogene

Effekte vermitteln und die Monozytose im Prozess der Atherosklerose verringern (38). Inwieweit dieser anti-atherogene Effekt über die Beeinflussung der lokalen Makrophagenproliferation in der Plaque vermittelt wird, ist unbekannt. Folgende Punkte sollten unter anderem beleuchtet werden:

1. Sicherstellung einer myeloid-spezifischen Doppeldefizienz der ABCA1- und ABCG1-Transporter unter Verwendung des LysM/Cre-Prinzips auf RNA- und Proteinebene
2. Untersuchung der Schaumzellbildung und des Cholesterinauswärtstransportes über ABCA1 und ABCG1 an HDL von Makrophagen *in vitro*
3. Analyse des *in vivo* Verhaltens von Aortenmakrophagen mit Doppeldefizienz für ABCA1 und ABCG1 in der frühen bzw. späten Atherosklerose.
4. Analyse des *in vivo* Verhaltens von Aortenmakrophagen mit Defizienz für den *Liver-X*-Rezeptor als Transkriptionsfaktor für die ABC-Transporter in der fortgeschrittenen Atherosklerose
5. Zytokinexpressionsanalyse von Aortenmakrophagen zum Zeitpunkt der etablierten Atherosklerose mit einer myeloid-spezifischen Doppeldefizienz für ABCA1 und ABCG1

2. Materialien

2.1. Versuchstiere

Kurzbezeichnung	Internationale Nomenklatur
Spendermaus CD45.2 ⁺ LysM ^{Cre/WT} :ABCA1 ^{fl/fl} ABCG1 ^{fl/fl} (MAC-ABC ^{DKO})	B6.129P2-Lyz2 ^{tm1(cre)lfo} /J:B6.Cg-Abca1 ^{tm1Jp} Abcg1 ^{tm1all} /J
Spendermaus CD45.1 ⁺ WT	B6.SJL-Ptprc ^a Pepc ^b /BoyJ
LDLR ^{-/-} Empfängermaus	B6.129S7-Ldlr ^{tm1Her} /J
Zuchttier ABCA1 ^{fl/fl} ABCG1 ^{fl/fl}	B6.Cg-Abca1 ^{tm1Jp} Abcg1 ^{tm1all} /J
Zuchttier LysM ^{Cre/Cre}	B6.129P2-Lyz2 ^{tm1(cre)lfo} /J
Spendermaus CD45.2 ⁺ LXRαβ ^{-/-}	129-Nr1h3 ^{tm1Djm} /J, B6;129S-Nr1h2 ^{tm1Djm} /J

Alle Versuchstiere mit Ausnahme der CD45.2⁺ LXRαβ^{-/-} (F. Swirski, Boston) wurden von Jackson Laboratory bezogen und hatten den genetischen Hintergrund *C57Bl/6J* (*Bl6*).

2.2. Versuchsfutter

Haltungsfutter, <i>Chow diet</i>	Kliba Nafag Experimentalfutter
Cholesterinreiche Diät, <i>High cholesterol diet</i> (HCD)	1,25 % Cholesterinanteil, 21% Butterfett, 1% Maisöl, D12079 mod. ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland

2.3. Stimulanzen

BODIPY-Cholesterin (TopFluor Cholesterol)	Avanti Polar Lipids, Inc., AL, USA
GM-CSF	Pepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA
HDL: <i>Human High Density Lipoprotein</i> (10mg/ml)	Kalen Biomedical, MD, USA
LXR-Agonist T0901317	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA

5 mg gelöst in 1 ml DMSO, c=10,38 mM	
--------------------------------------	--

2.4. Antikörper

2.4.1. Antikörper für Durchflusszytometrie

<i>Anti-mouse/rat</i> Ki67-FITC	<i>clone</i> SolA15, eBioscience, San Diego, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> CD3-FITC	<i>clone</i> 17A2, eBioscience, San Diego, CA, USA
BB515 <i>Rat Anti-mouse</i> CD11b-FITC	<i>clone</i> M1/70, BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> Ly6C-FITC	<i>clone</i> HK1.4, Biolegend, San Diego, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> CD45.1-PE	<i>clone</i> A20, Biolegend, San Diego, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> CD11b-PE	<i>clone</i> M1/70, eBioscience, San Diego, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> CD19-PE	<i>clone</i> eBio1D3, eBioscience, San Diego, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> NK1.1-PE	<i>clone</i> PK136, BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> F4/80 PE	<i>clone</i> BM8, eBioscience, San Diego, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> CD3e-PE	<i>clone</i> 145-2C11, eBioscience, San Diego, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> Ly6C-PerCPCy5.5	<i>clone</i> HK1.4, Biolegend, San Diego, CA, USA
<i>Anti-mouse/I</i> -Ab MHCII-PerCP	<i>clone</i> AF6-120.1, Biolegend, San Diego, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> CD3e-PerCP	<i>clone</i> 145-2C11, Biolegend, San Diego, CA, USA

<i>Anti-mouse/human</i> CD45R/B220-PerCP	clone RA3-6B2, Biolegend, San Diego, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> CD19-PECy7	clone eBio1D3, eBioscience, San Diego, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> F4/80-PECy7	clone BM8, Biolegend, San Diego, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> CD45.1-PECy7	clone A20, eBioscience, San Diego, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> CD3e-PECy7	clone 145-2C11, eBioscience, San Diego, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> Ly6C-PECy7	clone HK1.4, Biolegend, San Diego, CA, USA
<i>AlexaFluor647Rabbit Anti-Active Casp-3</i>	clone C92-605, BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> CD115 (CSF-1R)-APC	clone AFS98, Biolegend, San Diego, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> NK1.1-APC	clone PK136, Biolegend, San Diego, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> CD3e-APC	clone 145-2C11, Biolegend, San Diego, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> CD19-APC	clone eBio1D3, eBioscience, San Diego, CA, USA
<i>Rat Anti-mouse</i> Cd11b-APCCy7	clone M1/70, BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<i>Rat Anti-mouse</i> CD19-APCCy7	clone 1D3, BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<i>Anti-mouse</i> CD45.2-eFluor450	clone 104, eBioscience, San Diego, CA, USA
<i>Brilliant Violet 502 Anti-mouse</i> CD45.2-PacBlue	clone 104, Biolegend, San Diego, CA, USA

2.4.2. Antikörper für Western Blot

pAb-anti-ABCA1 (1mg/ml)	Novus Biologicals, Centennial, CO, USA
GAPDH (14C10) Rabbit mAb (HRP Conjugate)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-rabbit IgG, HRP linked, 7074S	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

2.4.3. Antikörper für Fluoreszenzmikroskopie

Roti-Mount FluorCare DAPI	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
---------------------------	-----------------------------------

2.5. TaqMan Sonden

Für die quantitative real-time Polymerasekettenreaktion zur Untersuchung des Zytokinprofils wurden folgende TaqMan Sonden von Thermo Fisher Scientific aus Waltham (MA, USA) verwendet:

β -Actin	4351315E
IL-1 β	Mm01336189_m1
IL-6	Mm00446190_m1
IL-10	Mm00439614_m1
TGF β	Mm01178820_m1
TNF α	Mm00443258_m1

2.6. SYBR-Green Primer

ABCA1 (Exon 45)	forward	5'-
	GAGGATGAGGATGTGAGGCG-3',	
	reverse	5'-

	GCAGTAGCCCATGTTCTGGT-3'; Produktlänge 303 bp, Eurofin Genomics, Ebersberg, Deutschland
ABCG1(Exon 3)	forward 5'- CAACAGTGGAGAGCTGGTGG-3', reverse 5'- AACATGACAGGCGGGTTGTT-3'; Produktlänge 393 bp, Eurofin Genomics, Ebersberg, Deutschland
GAPDH (Referenzgen)	Forward 5'- TGCACCACCAACTGCTTAG-3', reverse 5'-GATGCAGGGATGATGTTC- 3', Eurofin Genomics, Ebersberg, Deutschland

2.7. Chemikalien, Reagenzien, Enzyme

Acrylamid: Rotiphorese Gel 30 (37,5:1), 30% Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Amphotericin B 250µg/ml	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA 20mg/ml	New England BioLabs
Bovines Serumalbumin (BSA)	Albumin Fraction V, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Collagenase I	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Collagenase XI	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Destilliertes Wasser	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNase I	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
EGTA	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA

70% bzw. 80% Ethanol	Ethanol verdünnt mit destilliertem Wasser
Flüssiger Stickstoff	Air Liquide, Krefeld, Deutschland
Fötales Bovines Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Heparin-Natrium 25.000 I.E. / 5 ml	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
HEPES <i>buffer solution</i> , 1M	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Hyaluronidase	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Isofluran	AbbVie, North Chicago, Illinois, USA
Laemmli <i>SDS-sample buffer, reducing</i> 6X	Alfa Aesar by Thermo Fisher Scientific, Heysham, UK
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich MO, USA
Methanol	Honeywell, Riedel-de-Haen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Methyl- β -Cyclodextrin powder	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaAzid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl 0,9 %	B.Braun, Melsungen, Deutschland
NaCl	AnalaR Normapur, Avantor, PA, USA
NaF	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
NEAA (<i>Non-Essential Amino Acid Solution</i> , 100x)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pen + Strep (10.0000U Penicillin/ ml, 10.000U Streptomycin/ ml)	Lonza, Basel, Schweiz
Phosphate Buffered Saline (PBS ^{-/-}) \emptyset Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Lonza, Basel, Schweiz

Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Halt Protease Inhibitor Cocktail (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bradford Stock)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
RBC Lyse Puffer	Biolegend, San Diego, CA, USA
RIPA (Radioimmunoprecipitation)	Lysis Buffer System, Santa Cruz Biotechnology
RPMI 1640 (mit L-Glutamin) (phenolrot)	Lonza, Basel, Schweiz
RPMI Medium 1640 (mit L-Glutamin) (ohne Phenolrot)	gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SDS, Natriumdodecylsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
10x SDS-Page running buffer Rotiphorese (0,25 M Tris, 1,92 M Glycin und 1 % (g/v) SDS in destilliertem, deionisiertem Wasser)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X 100	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tribase	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Western Lightning Plus ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate for western blotting	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA

2.8. Puffer

10 %ige APS-Lösung	1 g APS in 10 ml destilliertem Wasser
FACS-Puffer	PBS mit 1% sterilem FBS, und 0,5% BSA (DPBS w/o Calcium and w/o Magnesium, 0.5% BSA)
Organ-Proteinlysepuffer	50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 % Glycerol, 1 % Triton X-100, 1,5 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, 100 mM NaF, gelöst in destilliertem H ₂ O, mit 1 % 100x Proteaseinhibitor, 1 % Phosphataseinhibitor 2 und 1 % Phosphataseinhibitor 3
Zell-Proteinlysepuffer	pro Milliliter RIPA-Lysis-Buffer-System 1 % PMSF als Proteaseinhibitor, 1 % Na ₃ VO ₄ sowie 2 % Proteinase-Inhibitor
1x RBC-Lysepuffer	10x RBC-Lysepuffer 1:10 verdünnt mit destilliertem H ₂ O
RLT-β-Mercaptoethanol 1:100	10 µl β-Mercaptoethanol, 1ml RLT-Puffer
10 % SDS-Puffer	100 g SDS gelöst in 1 l MilliQ H ₂ O
1x SDS-Running-Puffer	10x SDS-Running-Puffer 1:10 verdünnt mit destilliertem H ₂ O
10x TBS-Puffer	200 mM Tris, 1,38 M NaCl, pH 7,6 in H ₂ O
TBS-T-Puffer	10 % 10x TBS-Puffer, 0,1 % 20x Tween in autosterilem H ₂ O
10x Transferpuffer	0,25 M Tribase (30,25 g von 121,14 g/mol Tribase: Sigma), 1,92 M Glycin (144,25 g von 75,07 g/mol Glycine: Sigma) gelöst in 1 l MilliQ H ₂ O

1x Transfer-Puffer	10 % 10X Transfer-Puffer, 20 % Methanol gelöst in MilliQ H ₂ O (1 l Endvolumen)
Verdauungspuffer	450 U/ml Collagenase I, 125 U/ml Collagenase XI, 60 U/ml Hyaluronidase, 74 U/ml DNase I, 20 mM HEPES in PBS ^{-/-}

2.9. Medium

Vollmedium	RPMI1640 (mit L-Glutamin), 10 % FCS, 1 % NEAA, 1 % P/S, 0,1 % Amphotericin
Hungermedium	RPMI1640 (mit L-Glutamin), 1 % NEAA, 1 % P/S, 0,1 % Amphotericin

2.10. Gele

5%iges SDS-Polyacrylamid-Sammelgel	5 % einer 30 %igen Acrylamidlösung, 0,125 M einer 1,0 M Trislösung mit einem pH-Wert von 6,8, 0,1 % einer 10%igen SDS-Lösung, 0,1 % einer 10%igen Ammoniumpersulfatlösung sowie 0,1 % TEMED, gelöst in MilliQ H ₂ O
8%iges SDS-Polyacrylamid-Trenngel	8 % einer 30 % Acrylamidlösung, 0,375 M einer 1,5 M Trislösung mit einem pH-Wert von 8,8, 0,1 % einer 10%igen SDS-Lösung, 0,1 % einer 10%igen Ammoniumpersulfatlösung (APS), 0,06 % TEMED, gelöst in MilliQ H ₂ O

2.11. Kits

<i>Fixation/Permeabilization Solution Kit</i> Cytotfix/Cytoperm Kit	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<i>High-capacity</i> cDNA-Reverse- Transkriptions-Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, USA
<i>Ovation PicoSL WTA System V2</i> , NuGen	Tecan Genomics, Redwood City, CA, USA
<i>RNeasy Micro Kit</i>	Qiagen, Germantown, MD, USA

2.12. Sonstige Materialien

Chirurgisches Besteck (Pinzette, Schere, Skalpell)	Fine Science Tools Heidelberg, Deutschland
Einmalspritzen (1 ml, 5 ml)	B.Braun, Melsungen, Deutschland
FACS-Röhrchen mit Rundboden, 12x75 mm	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Falcon™ Cell Strainer (40 µm; Nylon)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Falcon® Tube (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Heparinisierte Kapillaren, Mikrohämatokrit-Kapillaren	BRAND, Wertheim, Deutschland
Halb-Mikro-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Insektenpins (0,1 mm Durchmesser)	Austerlitz Insect Pins, Tschechische Republik
Kanülen (20G, 21G, 23G)	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Parafilm M (Laboratory Film)	Bemis, Neenah, WI, USA
Petrischalen	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
ErgoOne Ein- und Mehrkanalpipetten (1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl)	Starlab, Hamburg, Deutschland

Pipettenspitzen mit und ohne Filter (1000 µl, 100 µl, 10 µl)	Starlab, Hamburg, Deutschland
QIAshredder	Qiagen, Germantown, MD, USA
1,5 ml <i>Reaction Tubes</i>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
1,5 ml Reaction Tubes (braun)	Brand, Wertheim, Deutschland
2,0 ml Reaction Tubes (braun)	Eppendorf, Starlab, Hamburg, Deutschland
2 ml Microcentrifuge Tube	StarLab, Hamburg, Deutschland
Sterile Stabpipetten: 1ml	Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Sterile Stabpipetten: (5 ml, 10 ml, 25 ml) Serological Pipette	Falcon, Durham, NC, USA
<i>Gel Saver II Tip 1-200µl</i>	Star Lab, Hamburg, Deutschland
<i>Whatman</i> Chromatographie Papier	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nunc Zellkultur-Multischalen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Falcon Chambered Cell Culture Slides</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Microplatte 96 Well, schwarz	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber für Zellkultur	Corning Incorporated, NY, USA

2.13. Geräte

<i>Bio Rad CFX96 Touch Real-Time PCR System</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Dispergierer T10 basic, <i>homogenizer workcenter</i> , Ultra-Turrax	IKA, Staufen, Deutschland
ELISA- und Fluoreszenz <i>Reader</i> SpectraMax Plus, P02918	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA

FACS Aria III <i>cell sorter</i>	BD Biosciences, San Diego, CA, USA
FACS Canto II	BD Biosciences, San Diego, CA, USA
Licht- und Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 <i>Imaging</i> mit AxioCam Kamera	Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Göttingen, Deutschland
Mini Protean 3 cell Handcast Systems	Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, USA
Mini Trans Blot Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, USA
Pipettierhilfe Ergo One Fast	Starlab, Hamburg, Deutschland
Schüttler/Schwenkinkubator für WesternBlot Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Schüttelinkubator, IKA-Schüttler MTS4	Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Deutschland
Sterile Werkbank/Zellkulturarbeitsplatz Clean Air®	Thermoscientific, Waltham, MA, USA
Stromquelle: BioRad, Power Pac Universal, 500 V, 2,5 A, 500 W PowerPac Universal Power Supply	BioRad, Inc, Hercules, CA, USA
Thermo HeraCell 150 CO2 Inkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Ultraschallwasserbad	Allpax, Papenburg, Deutschland
Vakuum Exsikkator	Duran, Wertheim, Deutschland
Vortexer	Starlab, Hamburg, Deutschland
<i>Western Imager</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, USA

Zentrifuge 5417R	Eppendorf Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge (Megafuge)	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.14. Software

FlowJo	Treestar, Ashland, OR, USA
Image Lab 5.2.1	Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, USA
ImagePro-Plus 5.1	Media Cybernetics, Silver Springs, USA
Prism 5.0, Graphpad Software	La Jolla, USA

3. Methoden

3.1. *In vivo* Studie

3.1.1. Mausmodell: Generierung gemischter Knochenmarkschimären

Die *in vivo* Untersuchungen zur Rolle der Cholesterinexporter sowie des *Liver-X*-Rezeptors erfolgten in verschiedenen murinen gemischten Knochenmarkschimären: myeloid-spezifisch ABCA1-ABCG1-doppeltdefiziente Chimären (MAC-ABC-DKO) sowie *Liver-X*-Rezeptor defiziente (LXR-KO) Chimären.

Alle Tierversuche wurden durch die Freiburger Ethikkommission bewilligt und durch das Freiburger Veterinäramt geprüft (Tierversuchsnummer G15001). Die Spender- und Empfängermause wurden von „*The Jackson Laboratory*“ (Maine, USA) gekauft. Die Tierhaltung und Versuchsdurchführung erfolgte im CEMT Neurozentrum der Universitätsklinik Freiburg und im Labor der Arbeitsgruppe in Freiburg.

Die Generierung der murinen gemischten *Liver-X*-Rezeptor defizienten Knochenmarkschimären sowie die anschließende Atherosklerosestudie erfolgte in der Arbeitsgruppe von Filip Swirski im *Center for Systems Biology and Department of Radiology* am *Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School* in Boston (49–51). Die Daten der dreimonatigen Atherosklerosestudie wurden uns freundlicherweise zur Auswertung zur Verfügung gestellt.

Zur Generierung der MAC-ABC-DKO-defizienten Spendermäuse wurden initial Mäuse gezüchtet, deren Gene ABCA1 und ABCG1 von LoxP-Stellen umrahmt waren (ABCA1^{fl/fl} ABCG1^{fl/fl}). Diese Mäuse wurden wiederum mit einer Maus gekreuzt, die die Cre-Rekombinase unter dem myeloiden Lysozym M (LysM)-Promotor exprimiert (LysM^{Cre/Cre}). Die Cre-Rekombinase erkennt die „gefloxten“ mit LoxP-flankierten Sequenzen und schneidet diese heraus (52). Durch Kreuzung der heterozygoten F1-Generation entstanden die gewünschten LysM^{Cre/WT}:ABCA1^{fl/fl}ABCG1^{fl/fl} Mäuse (MAC-ABC^{DKO}) (38).

In Anlehnung an Vorarbeiten von *Hilgendorf und Swirski et al.* (36) wurden 8 Wochen alte weibliche LDLR^{-/-}-Empfängermause mit 950 cGy letal bestrahlt und unmittelbar anschließend mit einer 1:1 Mischung aus Wildtyp- und *Knockout*-Knochenmarkszellen rekonstituiert. Diese wurden aus den Femurknochen einer CD45.1⁺-Wildtyp-Spendermaus bzw. einer CD45.2⁺ gendefizienten Spendermaus

mit entweder myeloid-spezifischer Doppeldefizienz der ABC1-Transporter ABCA1 und ABCG1 oder einer Gendefizienz des *Liver-X*-Rezeptors (F. Swirski, Boston) gewonnen (Abb. 7). Die jeweilige Mischung von 3×10^6 CD45.1⁺ Wildtyp- und 3×10^6 CD45.2⁺ gendefizienten Knochenmarkszellen wurde den Empfänger-mäusen über die Schwanzvene injiziert.

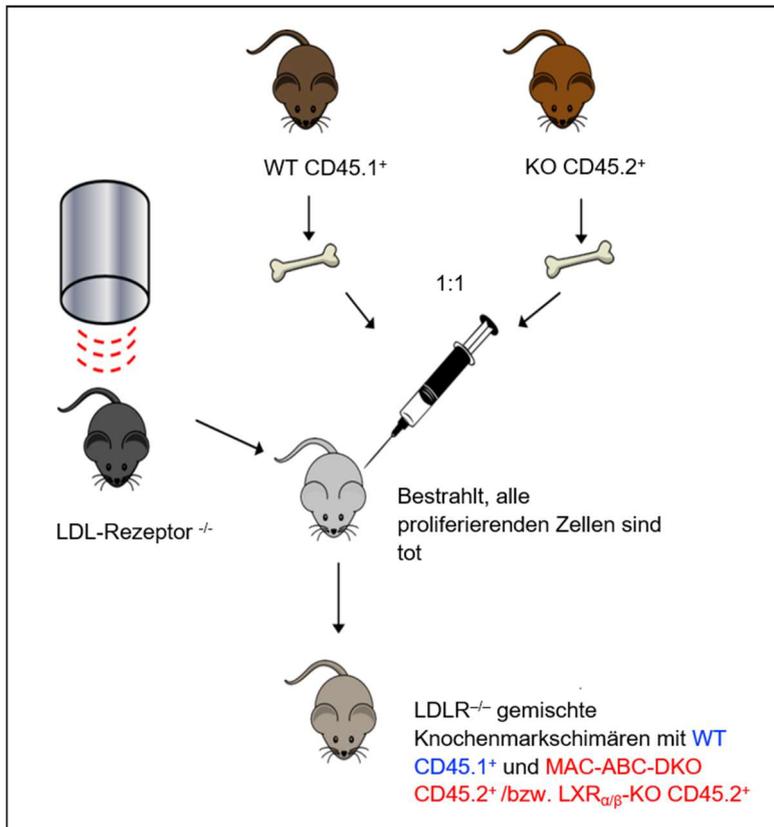


Abb. 7 Generierung der gemischten Knochenmarkschimären

Letal bestrahlte LDLR^{-/-} wurden mit einer 1:1 Mischung von Knochenmarkszellen von CD45.1⁺ Wildtyp- (WT) und CD45.2⁺ Knockout- (KO) Mäusen rekonstituiert. Es wurde eine myeloid-spezifische Defizienz der Cholesterinexporter ABCA1 und ABCG1 (MAC-ABC-DKO) bzw. eine Defizienz des *Liver-X*-Rezeptors (LXR α/β -KO) verwendet.

3.1.2. Atherosklerosestudie

Nach der unter 1.1. beschriebenen Knochenmarkstransplantation folgte eine 6-wöchige Rekonstitutionspause, innerhalb derer das Empfängerknochenmark durch die Spenderzellen besiedelt wurde und die Leukozyten und insbesondere die Monozyten als Vorläuferzellen der Plaquemakrophagen vollständig anwuchsen. Während der Rekonstitutionspause erhielten die Versuchstiere normales Haltungsfutter, sogenannte *Chow Diet*. Anschließend wurden die dann chimären Mäuse mit einer cholesterinreichen, pro-atherogenen Diät *ad libitum* gefüttert. Die proatherogene Diät, auch *High Cholesterol Diet* (HCD) oder *Western Diet* genannt enthielt 1,25 % Cholesterin, 21 % Butterfett und 1 % Maisöl. Unter der

cholesterinreichen Fütterung entwickelten die Mäuse nach 4 Wochen atherosklerotische Läsionen, die dem frühen Atherosklerosestadium entsprechen. Nach weiteren 8 Wochen unter proatherogener Diät wurde das Stadium der fortgeschrittenen, etablierten Atherosklerose erreicht (53). Die Versuchstiere wurden dementsprechend in 2 Gruppen aufgeteilt, um die Effekte bei der frühen Atherosklerose im Vergleich zu denen der späten Atherosklerose zu untersuchen (Abb. 8).

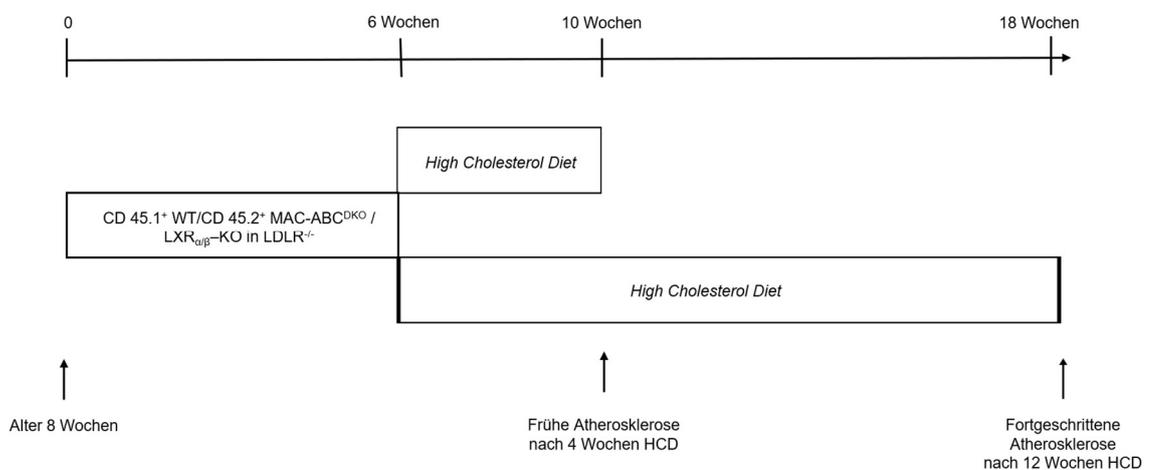


Abb. 8 Versuchsablauf mit Zeitstrahl

Initial Knochenmarksrekonstitution mit CD 45.1⁺ Wildtyp/ CD45.2⁺ MAC-ABC^{DKO} bzw. LXR_{α/β}-KO in 8 Wochen alte weibliche LDLR^{-/-}-Rezipienten. Nach 6-wöchiger Rekonstitutionspause Aufteilung in 4-wöchige *high cholesterol diet* (HCD)-Fütterung zur Untersuchung der frühen Atherosklerose und 12-wöchige HCD-Fütterung zur Untersuchung der fortgeschrittenen, etablierten Atherosklerose. HCD = High Cholesterol Diet

Im Anschluss an die jeweiligen Zeiträume wurden in den unterschiedlichen Versuchsgruppen jeweils durchflusszytometrische Untersuchungen von Blut- und Aortenmonozyten sowie Plaquemakrophagen durchgeführt sowie *in vitro* Versuche zur Analyse verschiedener Expressionsmuster auf RNA- und Proteinebene und in der Zellkultur.

3.1.3. Blutzellgewinnung

Die für die Zellaufbereitung notwendige Zentrifugation erfolgte, sofern nicht anders angegeben, mit 1300 rpm bei 4 °C für 5 Minuten in einer Heraeus Megafuge.

Für durchflusszytometrische Analysen von Blutmonozyten sowie verschiedene *in vitro* Versuche wurden den Versuchstieren 100 µl Blut retroorbital mittels

heparinisierten Glaskapillaren entnommen in Kurznarkose mit Isofluran 2 Vol.%. Das Blut wurde in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß aufgefangen und zur Antikoagulation mit Heparin versetzt. 100 µl des antikoagulierten Blutes wurden in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt. Die Erythrozyten wurden mit 1x RBC-Lysepuffer (2 ml RBC-Lysepuffer für 100 µl Blut) für 4 Minuten auf Eis lysiert. Die Lyse wurde mit mindestens 13 ml PBS^{-/-} terminiert und die Lösung für 5 Minuten bei 1300 rpm, 4 °C zentrifugiert. Das damit generierte Zellpellet enthielt nach Verwerfen des Überstandes nur noch die nicht lysierten Leukozyten, die anschließend nach Durchführung einer Oberflächenfärbung durchflusszytometrisch untersucht werden konnten.

3.1.4. Peritoneallavage und Organentnahme

Die Untersuchungen der atherosklerotischen Plaques erfolgten an Aorten. Die Aortenpräparation erfolgte in Verbindung mit der Gewinnung einer Peritoneallavage und Entnahme weiterer Blutproben. Hierfür wurden die Versuchstiere durch CO₂-Vergasung getötet und unter einem Binokularmikroskop auf dem Rücken liegend fixiert. Nach Freilegung des Peritoneums mittels eines Bauchschnittes wurde dieses mit 8 ml PBS^{-/-} gespült und die damit erhaltene Peritoneallavage in 15 ml Falcon-Gefäße aufgefangen für weiterführende Untersuchungen. Anschließend erfolgte die weitere Eröffnung des Abdomens bis zum Brustbein, die Entnahme der Leber für Proteinexpressionsanalysen und die Durchtrennung des Zwerchfells zur Freilegung des Herzens. Durch intrakardiale Punktion des rechten Ventrikels wurden weitere Blutproben gewonnen. Anschließend wurde der linke Ventrikel punktiert und das Gefäßsystem mit ungefähr 20 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung perfundiert, um das Gefäßsystem von zirkulierendem Blut zu befreien. Die Aorten wurden vorsichtig frei präpariert und *in toto* in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt, welches 500 µl einer enzymatischen Verdauungslösung enthielt (450 U/ml Collagenase I, 125 U/ml Collagenase XI, 60 U/ml Hyaluronidase, 74 U/ml DNase I, 20 mM HEPES gelöst in PBS^{-/-}). Nach Zerkleinerung mittels feiner chirurgischer Scheren wurden die Aorten für 45 Minuten auf einem Thermoschüttler bei 37 °C und 750 rpm in der Verdauungslösung inkubiert, dann durch ein 40 µm Zellsieb in ein 50 ml Falcon-Gefäß gedrückt und mit bis zu 20 ml PBS^{-/-} sorgfältig gespült. Nach Zentrifugation unter Standardeinstellungen wurde das Zellpellet in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen

und die erhaltene Zellsuspension für die weitere Analyse durch ein 40 µm-Zellsieb in ein FACS-Gefäß transferiert.

3.2. Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie werden verschiedene Zellpopulationen einerseits aufgrund unterschiedlicher Größe, Form und Granularität und andererseits anhand unterschiedlicher Expression von bestimmten Oberflächenmarkern und intrazellulären Antigenen differenziert. Die Markerexpression wird anhand Fluorochrom-gekoppelter Antikörper untersucht (54,55). In dieser Arbeit wurden unter anderem folgende fluoreszierende Farbstoffe eingesetzt: R-Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Peridinin-chlorophyll proteins (PerCP), PerCp-Cy5.5, Pe-Cy7, APC-Cy7, Pacific Blue und FluoresceinIsothiocyanat (FITC). Das zur Detektion verwendete BD FACS CANTO II besitzt einen blauen Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm, einen roten Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm sowie einen violetten Laser mit einer Wellenlänge von 405 nm.

3.2.1. Oberflächenfärbung

Die nach Filtrierung durch ein 40 µm Zellsieb in 300 µl FACS-Puffer aufgenommenen Zellen wurden anschließend mit Antikörpern in einer Konzentration von jeweils 1:500 bis 1:1000 lichtgeschützt für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert, mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen, um nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit den gefärbten Zellen abschließend in 300 µl FACS-Puffer zur durchflusszytometrischen Analyse aufgenommen.

3.2.2. Intrazelluläre Färbung gegen Ki 67 und Caspase 3

Zur Untersuchung der Proliferationsrate der Aortenmakrophagen wurde das intrazelluläre Antigen Ki 67 untersucht. Ki 67 ist in proliferierenden Zellen in der G1-, S-, G2- sowie in der Mitose-Phase des Zellzyklus präsent (56). Zur Untersuchung der Apoptoserate der Aortenmakrophagen wurde Caspase 3 untersucht, das ein Schlüsselenzym in der Kaskade des programmierten Zelltodes ist (57).

Da es sich bei Ki 67 und Caspase 3 um intrazelluläre Strukturen handelt, wurden die Zellen nach erfolgter Oberflächenfärbung zunächst fixiert und dann

permeabilisiert, um die intrazellulären Antigene zugänglich zu machen. Nach Entfernen der nicht oder unspezifisch gebundenen Antikörper wurden die Proben zentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl *Cytofix/Cytoperm-Puffer* (BD Bioscience) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde sodann für 20 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml *1x Perm/Wash-Puffer* gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl *Cytoperm Permeabilization Puffer Plus* aufgenommen. Nach einer Inkubationsphase von 10 min auf Eis wurde 1 ml *1x Perm/Wash Puffer* hinzugefügt und zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde mit 100 µl *Cytofix/Cytoperm-Puffer* aufgenommen, für 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend wieder mit 1 ml *1x Perm/Wash-Puffer* gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Zellpellet im Restvolumen des Überstands kurz suspendiert, für 15 min bei 37 °C inkubiert, mit 150 µl *1x Perm/Wash-Puffer* aufgenommen und mit 45 µl Antikörper-Färbelösung (anti-Ki 67 1:1000, anti-Caspase 3 1:1000) versehen. Nach lichtgeschützter Inkubation für 45 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit 2 ml *1x Perm/Wash-Puffer* gewaschen, und für 5 Minuten nochmals bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Zellpellet abschließend in 300 µl *1x Perm/Wash-Puffer* zur durchflusszytometrischen Analyse aufgenommen.

3.2.3. Zellsortierung mittels FACS

Neben der analytischen Durchflusszytometrie wurden aus den gefärbten Zellen aufgrund ihrer Oberflächenexpression mittels fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS) Subpopulationen isoliert. Je nach Art der nachfolgenden Untersuchung wurden die Zellen in unterschiedlichen Puffern aufgefangen. Für RNA-Expressionsanalysen wurden die Zellen in 350 µl RLT-β-Mercaptoethanol isoliert gesammelt. Für *in vitro* Zellkulturversuche erfolgte die Sammlung der Zellen in 500 µl RPMI-Vollmedium.

3.2.4. Auswertung

Die Daten der Durchflusszytometrie wurden mit der Software *FlowJo* ausgewertet. Die Darstellung der analysierten Zellen erfolgte in einem zweidimensionalen Koordinatensystem, auf denen verschiedene Merkmale, gegen die zuvor gefärbt wurde, dargestellt werden konnten. Zunächst wurden alle lebenden und einzelnen

Zellen in Betracht gezogen und aufgrund ihrer Größe (*forward scatter*) und ihrer Granularität bzw. internen Komplexität (*sideward scatter*) dargestellt. Hierbei stellen sich innerhalb der Gruppe der Leukozyten Monozyten in der Regel größer dar als Lymphozyten. Anschließend konnten die so differenzierten Populationen aufgrund ihrer Oberflächenexpression weiter untergliedert werden. Hierbei wurde CD11b für myeloide Zellen, CD115 für den M-CSF-Rezeptor auf Monozyten, Ly6C für Ly6C^{low} bzw. Ly6C^{high} Monozyten, F4/80 für Makrophagen, CD19 für B-Lymphozyten und CD3 für T-Lymphozyten verwendet. Demzufolge wurden Monozyten als CD45⁺, CD11b⁺, CD115⁺, für den Zelllinienmarker (*Lineage*) (CD19, Ly6G, NK1.1, CD3) negative und Ly6C^{high} bzw. Ly6C^{low} positive Populationen, Makrophagen als CD45⁺, CD11b⁺, Ly6C^{low} und F4/80⁺, *Lineage*⁻ Zellpopulation identifiziert.

Weiterhin konnten die untersuchten Populationen aufgrund ihrer Oberflächenexpression von den Leukozytenmarkern CD45.1 und CD45.2 den entsprechenden Wildtyp- bzw. gendefizienten Chimärismusgruppen zugewiesen werden.

3.3. RNA-Isolation, cDNA-Transkription und quantitative *Real-Time* Polymerasekettenreaktion

3.3.1. RNA-Isolation und cDNA-Transkription

Die mittels FACS gewonnenen Subpopulationen wurden in jeweils 350 µl β-Mercaptoethanol-RLT-Puffer aufgefangen und unter Verwendung eines *Qiagen-Shredders* bei höchster Geschwindigkeit für 2 Minuten homogenisiert. Sodann wurde die RNA unter Verwendung des *RNeasy Micro Kits* nach Angaben des Herstellers isoliert und unter Verwendung des *High-capacity cDNA-Reverse-Transkriptions-Kits* nach Herstellerangaben zu cDNA transkribiert. Bei Aortenmakrophagen wurde aufgrund geringer Zellausbeute für die cDNA-Synthese das *Ovation Pico SL WTA System V2* verwendet.

3.3.2. iQ SYBR Green Real-Time-Polymerasekettenreaktion

Für die *iQ SYBR Green real time* Polymerasekettenreaktion zum Nachweis einer Makrophagen-spezifischen ABCA1- und ABCG1-Defizienz wurden spezifische Primer generiert.

Hierbei wurden für den Nachweis der ABCA1-Defizienz- flankierende Primer für das Exon 45 (38,58) (forward 5'-GAGGATGAGGATGTGAGGCG-3', reverse 5'-GCAGTAGCCCATGTTCTGGT-3'; Produktlänge 303 bp), für die ABCG1-Defizienz entsprechende Primer für das Exon 3 (38) (forward 5'-CAACAGTGGAGAGCTGGTGG-3', reverse 5'-AACATGACAGGCGGGTTGTT-3'; Produktlänge 393 bp) generiert.

Als Referenz-Gen fungierte Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase [GAPDH] (forward 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3', reverse 5'-GATGCAGGGATGATGTTC-3').

Die *iQ SYBR-Green real time* Polymerasekettenreaktion wurde gemäß Hersteller-Protokoll durchgeführt. Das insgesamt 18 µl umfassende PCR-Reaktionsgemisch enthielt je 300 nM des jeweiligen *forward*- und *reverse*-Primers sowie 1x *iQ SYBR Green Supermix*-Lösung in Nuklease-freiem Wasser. Dieses Reaktionsgemisch wurde mit jeweils 2 µl der entsprechenden 40 ng/µl cDNA gemischt, die Reaktionsplatte versiegelt und anschließend für 2 Minuten bei 4 °C und 1300 rpm kurz zentrifugiert, um Luftblasen zu eliminieren. Die *real-time* PCR erfolgte dann in folgenden Schritten auf einem Bio Rad CFX96 *Real-Time* PCR-System: initiale Denaturierung und Enzymaktivierung für 3 Minuten bei 95 °C, weitere Denaturierung für 10 Minuten bei 95 °C, Annealing für 15 Minuten bei 60 °C, Extension für 30 Minuten bei 72 °C. Die Schmelzkurvenanalyse erfolgte im Temperaturbereich von 55 °C bis 95 °C in 0,5 °C-Erhöschungsschritten für insgesamt 10 Minuten. Die *real-time*-PCR-Daten wurden quantifiziert mit der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode. Bei Ct-Werten größer 39 wurde das Gen als nicht exprimiert gewertet.

3.3.3. TaqMan Real-Time Polymerasekettenreaktion

Für die *TaqMan Multiplex real time* Polymerasekettenreaktion wurden nach Angaben des Herstellers 1 µl 40 ng/µl cDNA eingesetzt und mit einem 19 µl umfassenden Reaktionsgemisch versehen, bestehend aus je 1 µl der jeweiligen Zielprimer (20x) sowie 1 µl des Referenzprimers b-Actin (20x) und 10 µl eines 2x TaqMan Fast Mastermixes. Die *real time* Polymerasekettenreaktion erfolgte anschließend auf einem Bio Rad CFX96 *Real-Time* PCR-System.

Die Daten der *real-time*-Polymerasekettenreaktion wurden quantifiziert mit der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode. Bei Ct-Werten größer 39 wurde das Gen als nicht exprimiert gewertet.

3.4. Western Blot

Die Proteinexpression von ABCA1 in Wildtyp- und ABC-defizienten Peritonealmakrophagen sowie in der Leber eines ABC-defizienten Spendertieres wurde anhand eines Western Blot Verfahrens analysiert. Hierbei erfolgt die Identifizierung von mittels Gelelektrophorese aufgetrennten und auf eine Membran übertragenen Proteinen anhand spezifischer Antikörper (59).

3.4.1. Proteinlyse und -isolation von Gewebe und Zellen

3.4.1.1. Lebergewebe

Für den Nachweis einer myeloid-spezifischen Defizienz der ABC-Transporter wurde die Proteinexpression von ABCA1 exemplarisch in der Leber eines ABC-defizienten Spendertieres als Positivkontrolle gemessen.

50 mg Lebergewebe wurden mit 500 µl Lysepuffer für 30 Sekunden auf Eis lysiert und mittels eines Homogenisators homogenisiert. Der Lysepuffer bestand aus 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 % Glycerol, 1 % Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 100 mM destilliertem Wasser sowie 1 % 100x Proteaseinhibitor, 1 % Phosphataseinhibitor 2 und 1 % Phosphataseinhibitor 3. Anschließend wurde das Probenlysat in Flüssigstickstoff schockgefroren und nach vollständigem Auftauen auf Eis für 10 Minuten bei 4 °C und höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Das im Überstand isolierte Proteinlysat wurde in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und dessen Konzentration im anschließenden Bradford-Assay bestimmt und normiert.

3.4.1.2. Zellen

Für den Nachweis einer myeloid-spezifischen Defizienz der ABC-Transporter wurde exemplarisch die ABCA1-Proteinexpression in Peritonealmakrophagen einer ABC-defizienten Spendermaus sowie einer ABC-kompetenten Spendermaus gemessen. Eine Peritoneallavage wurde jeweils aus den Wildtyp- und ABC-defizienten Spendermäusen in Zellkultur-Vollmedium kultiviert. Hierbei setzten sich die Peritonealmakrophagen innerhalb von 24 Stunden auf dem Boden der Zellkulturplatte ab und wurden adhärent, während andere Zellpopulationen nicht adhärent wurden und im Überstand verblieben. Somit konnten durch Verwerfen des Zellkulturüberstandes die am Boden adhären Peritonealmakrophagen der Spendermäuse für die Proteinisolation verwendet werden.

Hierfür wurden 200 µl RIPA-Proteinisolutions-Gemisch pro Well verwendet. Gemäß Herstellerangaben wurden pro Milliliter RIPA-Lysis-Buffer-System 1 % PMSF als Proteaseinhibitor, 1 % Na₃VO₄ als Inhibitor der Tyrosin-Phosphatasen sowie 2 % Proteinase-Inhibitor eingesetzt. Die RIPA-Mischung wurde für zwei Minuten auf den Zellen inkubiert. Anschließend wurden die adhärennten Makrophagen mittels eines Zellschabers mobilisiert und lysiert. Der Inhalt wurde vollständig in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und für die weitere Zellyse zweimal in Flüssigstickstoff schockgefroren. Nach vollständigem Auftauen auf Eis wurde das Lysat für 15 Minuten bei 4 °C bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert, um weitere Zelltrümmer vom flüssigem Proteinlysat zu trennen. Das dadurch im Überstand generierte reine Proteinlysat wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und dessen Konzentration im anschließenden Bradford-Assay bestimmt und normiert.

3.4.2. Bradford Assay

Die Proteinkonzentrationsbestimmung und Normierung erfolgte mittels eines Bradford-Assays mit dem Bradford-Konzentrat von *Biorad*. Als Standard-Referenzprotein wurde Rinderserumalbumin (BSA) in einer 1:10 Verdünnung verwendet. Die photometrische Messung erfolgte bei 595 nm.

3.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden jeweils 40 µg Proteinprobe von dem Leberlysat und den Peritonealmakrophagen eingesetzt. Demzufolge wurden, entsprechend der Ergebnisse des Bradford-Assays, die Proteinlysate mit MilliQ H₂O und einem 6x fachen Laemmli-Probenpuffer auf die korrekte Konzentration adjustiert. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte in 1X SDS-Running-Puffer auf Eis. Die Proteinproben wurden in einem 5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel gesammelt. Die Sammlung der Proben im Sammelgel erfolgte für 10 Minuten bei 80 V.

Anschließend wurden die Proteinproben in einem 8%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Probentrennung im Trenngel erfolgte bei 120-150 V für circa 45-60 Minuten je nach Geschwindigkeit der Probenauftrennung.

3.4.4. Proteintransfer

Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte über einen *semi dry*-Blot in einem *Mini Trans Blot Cell System* bei 100 V für eine Stunde in einem 1X Transfer-Puffer.

3.4.5. Antikörperfärbung und Bildaufnahme

Nach dem Proteintransfer auf die Membran wurde diese isoliert und das Methanol des Transferpuffers mittels TBS-T-Puffer heruntergewaschen.

Die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf den Membranen wurden blockiert mit je 10 ml 5 % Milch/TBS-T-Blockierungslösung für insgesamt 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttelinkubator. Nach 60 Minuten wurde die Membran einmal mit 1x TBS-T gewaschen und anschließend mit 10 ml des jeweiligen Primärantikörpers über Nacht im Kühlraum auf einem Schwenk-Inkubator inkubiert, der an ein spezifisches Epitop des untersuchten Proteins bindet.

Für den Proteinnachweis von ABCA1 wurde der anti-ABCA1-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000, angesetzt in 5 % Milch-TBS-T, verwendet. Dieser Antikörper detektiert die Proteinbande auf einer Höhe von 220 kDa.

Für den Proteinnachweis des Referenzproteins GAPDH wurde der anti-GAPDH-Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in 5 % BSA-TBS-T eingesetzt. Dieser Antikörper markiert die Proteinbande auf einer Höhe von 37 kDa. Jede Antikörperlösung wurde zusätzlich mit 0,03 % Natriumazid als Kontaminationsschutz versehen.

Nach erfolgter Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Membranen dreimal für jeweils 5 Minuten mit 100 ml TBS-T bei Raumtemperatur auf dem Schüttelinkubator gewaschen, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte die Markierung und Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase (englisch *horseradish peroxidase*, kurz HRP) -gekoppelten Sekundärantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttelinkubator. Der Sekundärantikörper bindet indirekt an das Zielprotein, indem es an die Fc-Region des Primärantikörpers bindet.

Für den anti-ABCA1-Antikörper und den GAPDH-Antikörper wurde der anti-Rabbit-Sekundärantikörper in einer 1:2000-Verdünnung in 5 % Milch/TBS-T eingesetzt. Nach erfolgter Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde wieder dreimal für

jeweils 5 Minuten mit TBS-T bei Raumtemperatur auf dem Schüttelinkubator gewaschen. Dann wurde eine Luminol-basierte Substratlösung auf die Membranen hinzugegeben. Durch die Oxidation von in der Substratlösung enthaltenen Peroxiden und Luminol katalysiert HRP eine Chemolumineszenzreaktion, die detektiert werden kann (59). Dies ermöglicht die Visualisierung der Proteinbanden auf den Membranen im *BioRad Imager* und die Analyse der Bandendichte in Relation zum Referenzprotein.

3.5. Zellkultur: BODIPY-Cholesterin-Stimulationsversuch

Mit dem BODIPY-Cholesterin-Stimulationsversuch sollte die Schaumzellbildung von Makrophagen sowie der Cholesterinauswärtstransport über die ABCA1- und ABCG1-Transporter *in vitro* visualisiert und quantifiziert werden. Hierfür wurden kultivierte Makrophagen mit einem fluoreszierenden Cholesterin, dem BODIPY-Cholesterin, beladen.

BODIPY-Cholesterin ist die Kurzform für 23-(dipyrromethene-boron difluoride)-24-norcholesterol und ist ein fluoreszierendes Analogon von freiem Cholesterin, bei dem das 24.Kohlenstoffatom der Lipidseitenkette direkt mit der *Dipyrromethene boron difluoride* ("BODIPY") Einheit verbunden ist (60,61) (Abb. 9).

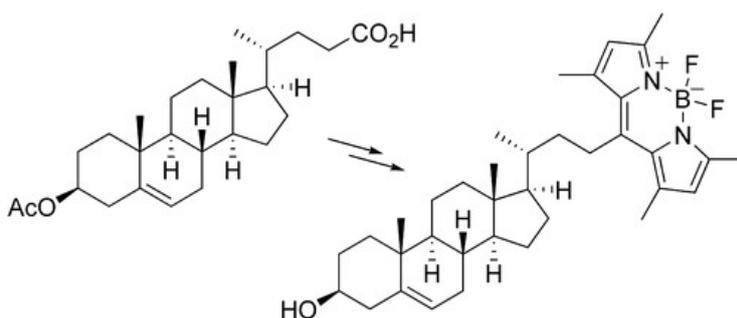


Abb. 9 Struktur von BODIPY-Cholesterin (61)

BODIPY-Cholesterin ist als ein Analogon von freiem Cholesterin über das 24. Kohlenstoffatom der Lipidseitenkette mit der fluoreszierenden BODIPY-Einheit verbunden.

3.5.1. Herstellung der BODIPY-Cholesterin-Lösung

Der im Folgenden geschilderte Versuchsaufbau orientierte sich an der Methode von *Sankaranarayanan et al.* (60).

1 mg des in Pulverform vorliegenden BODIPY-Cholesterin wurde in 375 μ l absolutem Ethanol gelöst, entsprechend einer Stockkonzentration von 4,53 mmol/l.

Die Lösung wurde anschließend für 5 Minuten bei 30 °C im Ultraschallwasserbad behandelt. Daraufhin wurden 25 µl Aliquots des BODIPY-Cholesterin-Ethanol-Gemisches in lichtundurchlässigen Mikroreaktionsgefäßen generiert mit einem Anteil von 66,5 µg BODIPY-Cholesterin pro Aliquot.

Da BODIPY-Cholesterin aufgrund seiner Lipophilie in wässriger Umgebung, wie beispielsweise einer Zellkultur, leicht in Cholesterinkristalle präzipitiert, bedarf es eines *Lipid Carriers*. Hierfür wurde Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD) gewählt. Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide bestehend aus alpha-1-4-verbundenen Glycopyranose-Untereinheiten. Sie besitzen einen hydrophoben Hohlraum, der wiederum hydrophobe Moleküle binden und einkapseln kann. β-Cyclodextrine, als Heptamere mit 7 Glycopyranose-Untereinheiten vorliegend, haben die höchste Affinität, Cholesterin zu binden. Dies liegt an der Größe des Hohlraumes, der sich bei β-Cyclodextrin als am besten geeignet für die Inkorporierung von Cholesterin erwiesen hat. Die Wasserlöslichkeit von β-Cyclodextrin kann durch hydrophile Modifikationen, wie zum Beispiel eine Methylierung, wie hier verwendet, gesteigert werden (62). Dieses wurde in einem molaren Verhältnis von BODIPY-Cholesterin zu MβCD von 1:10 eingesetzt (63). MβCD ist wasserlöslich und demzufolge auch löslich in absolutem Ethanol. Um das gleiche Lösungsdetergenz zu verwenden wie das für BODIPY-Cholesterin, wurden 15,31 mg MβCD in 306 µl absolutem Ethanol gelöst unter Berücksichtigung des molaren Verhältnisses von MβCD zu BODIPY-Cholesterin, als Aliquot mit 66,5 µg vorliegend, von 1:10 ($M_{\text{BODIPY-Cholesterin}} = 576,611 \text{ g/mol}$; $M_{\text{M}\beta\text{CD}} = 1331,36 \text{ g/mol}$).

In einem Vakuum-Exsikkator wurde das Ethanol eines BODIPY-Cholesterin-Aliquots verdunstet und abgesogen. Anschließend wurden die so verbliebenen 66,5 µg BODIPY-Cholesterin im entsprechenden Verhältnis mit 30 µl MβCD -Ethanol-Lösung gemischt mit einer finalen Stockkonzentration von 3,83 mmol/l und erneut im Ultraschallwasserbad für 20 Minuten bei 30°C behandelt (64). Die somit hergestellte BODIPY-Cholesterin-MβCD-Lösung eignete sich nur zur sofortigen Verwendung, da das BODIPY-Cholesterin trotz Komplexierung mit MβCD bei längerer Verweildauer eine starke Neigung zur Kristallpräzipitation in wässrigem Medium hat.

3.5.2. Fluorometrische Messung der Cholesterinabgabe

Zur Erfassung des intrazellulären Lipidgehalts und der Schaumzellbildung in Makrophagen in Abhängigkeit von den ABCA1- und ABCG1-Transportern wurden Monozyten aus dem Blut der chimären ABC-defizienten Mäuse mittels Fluoreszenz aktivierter Zellsortierung entsprechend der Oberflächenexpression isoliert. Monozyten wurden identifiziert als CD11b⁺, CD115⁺, Lineage⁻ und Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Zellpopulation sowie in eine CD45.1⁺ Wildtypfraktion und in eine CD45.2⁺ ABC-defiziente-Fraktion getrennt aufgefangen. Hierfür wurden jeweils 100.000 Wildtyp- und ABCA1-ABCG1-doppelt defiziente Blutmonozyten pro Well in RPMI-Vollmedium mit 10 % FCS und unter Stimulation mit dem Zytokin *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) in einer Konzentration von 30 ng/ml in einer 48-Well-Platte für 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ zu Makrophagen im Brutschrank differenziert. An Tag 3 erfolgte ein Mediumwechsel. 18 Stunden vor dem BODIPY-Stimulationsstart wurden die Makrophagen zusätzlich für den verbliebenen Zeitraum bis Stimulationsstart mit 3 µM eines *Liver-X*-Rezeptor-Agonisten (TO901317) in Vollmedium inkubiert zur Hochregulation der ABC-Transporter (38). An Tag 7 wurden die Makrophagen mit 1 ml warmem PBS-Puffer^{-/-} gewaschen und anschließend mit 0,025 mM BODIPY-Cholesterin in 500 µl serumfreiem und phenolrotfreiem Hunger-RPMI-Medium für 90 Minuten bei 37 °C stimuliert. Hervorzuheben ist die Verwendung von phenolrotfreiem Zellkulturmedium, da das Phenolrot, das sonst üblicherweise den Zellkulturmedien zugesetzt ist, die Fluoreszenzmessung stört. Nach 90-minütiger Stimulation wurden die Makrophagen mit 1 ml warmem PBS-Puffer^{-/-} gewaschen und mit 25 µg/ml HDL als Cholesterinakzeptor in serumfreiem RPMI-Medium für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Zellüberstand in Mikroreaktionsgefäße überführt, abzentrifugiert und je 100 µl des Überstandes pro Well in die schwarze Fluorometerplatte überführt. Anschließend erfolgte die Endpunkt-Messung im Fluorometer zur Quantifizierung des Fluoreszenzgehaltes des Überstandes mit einem Exzitationswert von 490 nm und Emissionswert von 520 nm, der Cutoff-Wert lag bei 515 nm. Zur internen Messkontrolle wurde eine Standardreihe mit ansteigenden BODIPY-Cholesterin-Konzentrationen hergestellt und im Fluorometer mitgemessen.

3.5.3. Fluoreszenzmikroskopische Messung des intrazellulären Cholesteringehaltes

Zur Quantifizierung des intrazellulären Cholesteringehaltes wurden jeweils *rund* 70.000 Wildtyp- und ABCA1-ABCG1-doppelt defiziente Monozyten nach oben beschriebenem Versuchsablauf mittels FACS isoliert, unter M-CSF-Stimulation in gekammerten Zellkultur-*Slides* zu Makrophagen differenziert und unter den gleichen Bedingungen wie unter 3.5.2. beschrieben mit BODIPY-Cholesterin stimuliert. Nach abgeschlossener Inkubation mit HDL wurde der Überstand abpipettiert und mit 1ml PBS^{-/-} möglicherweise verbliebene präzipitierte Cholesterinkristalle gewaschen. Die am Boden adhärenen Makrophagen wurden anschließend mit 100 µl 4%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert und die Zellkerne mittels des Fluoreszenzfarbstoffes 4',6-Diamidin-2-phenylindol [DAPI] blau gefärbt, da DAPI an die DNA-Helix bindet, hierbei mit hoher Affinität an Regionen, die reich an Adenin/Thymin-Basensequenzen sind (65,66).

Anschließend erfolgte die Visualisierung im Fluoreszenzmikroskop bei 40x-facher Vergrößerung sowie die Quantifizierung des intrazellulären Fluoreszenzgehaltes mittels der Software *Image Pro Plus*. Hierbei erfolgte die Identifizierung der Zellen anhand des Vorhandenseins eines durch DAPI blau gefärbten Zellkernes. Es wurden alle Zellen bei der Auswertung berücksichtigt. Die trotz Waschens eventuell auf der *Chamberslide* adhärenen, durch Präzipitation entstandenen BODIPY-Cholesterinkristalle wurden weggeschnitten und bei der Auswertung nicht berücksichtigt, da diese durch einen zu hohen Fluoreszenzwert die Messung verfälscht hätten. Von den markierten Zellen wurde die Hintergrundfluoreszenz subtrahiert, anschließend alle Zellen summiert und durch die jeweils ermittelte Zellzahl dividiert.

3.6. Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit der Software Graph Pad Prism 5.0 statistisch ausgewertet. Hierbei wurden die Werte als Mittelwert \pm den Standardfehler (SEM) angegeben. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$ %. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem ungepaarten Student's t-Test oder Mann-Whitney-Test analysiert. Signifikante Unterschiede zwischen mehr als 2 Gruppen wurden mit dem One-way-ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test festgestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Generierung von gemischten Knochenmarkschimären mit myeloid-spezifischem ABCA1- und ABCG1-Doppelknockout

Die Rolle des Cholesterinexports über ABC-Transporter in Makrophagen in der atherosklerotischen Plaque wurde in gemischten Knochenmarkschimären, bestehend aus 50% Wildtyp sowie 50% myeloid-spezifisch ABC-defizienten Zellen, untersucht. Das Modell des gemischten Chimärismus ermöglichte den direkten Vergleich von Wildtyp- und gendefizienten Zellpopulationen im selben atherosklerotischen Plaquemikromilieu. Da die beiden Populationen den gleichen externen Stimuli ihrer Umgebung ausgesetzt waren, waren Unterschiede zwischen den Genotypen daher zellintrinsisch und unbeeinflusst von systemischen Störeinflüssen, wie sie bei einheitlichen *Knockouts* auftreten können. Um zunächst eine myeloid-spezifische ABC-Defizienz in den für die Chimäre verwendeten Spendertieren auf Proteinebene sicherzustellen, wurden Peritonealmakrophagen sowohl aus einer exemplarischen CD45.1⁺ Wildtyp-Spendermaus als auch aus einer CD45.2⁺ myeloid-spezifisch ABC-defizienten-Spendermaus mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen ABCA1 analysiert. Als zusätzliche Kontrolle wurde die Leber aus der CD45.2⁺ ABC-defizienten-Spendermaus verwendet, da die ABC-Transporter in der Leber nicht nur in Makrophagen, sondern auch in anderen Zelltypen exprimiert werden wie beispielsweise in Endothelzellen, Hepatozyten und Adipozyten (67,68).

Im Vergleich zu den Peritonealmakrophagen aus ABC-Transporter kompetenten Spendertieren fand sich in Peritonealmakrophagen aus ABC-Transporter-defizienten Mäusen eine deutliche Reduktion der ABCA1-Proteinexpression. Hingegen fand sich in der Leber von ABC-Transporter defizienten Spendertieren ein weitgehend normales Expressionslevel von ABCA1 (Abb. 10). Somit konnte die myeloid-spezifische Defizienz des ABCA1-Transporters auf Proteinebene sichergestellt werden.

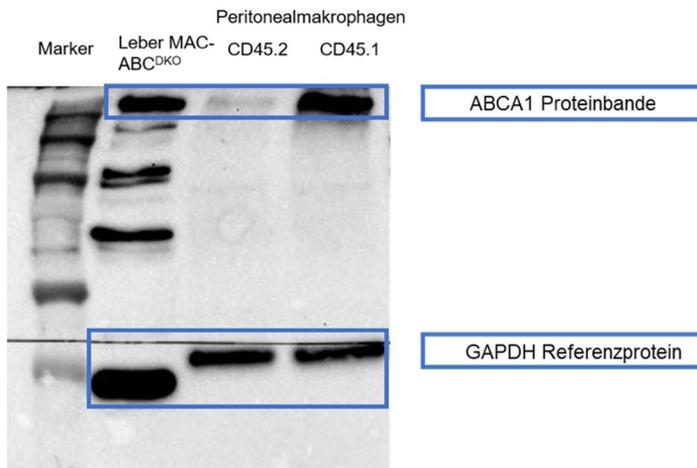


Abb. 10 Qualitative Analyse der Proteinexpression von ABCA1 in exemplarischen Lysaten aus Wildtyp- und ABC-defizienten Peritonealmakrophagen und Lebergewebe der MAC-ABC^{DKO}-Spendermäuse

CD 45.2⁺ ABC-DKO-Peritonealmakrophagen weisen gegenüber CD 45.1⁺ Wildtyp-Peritonealmakrophagen und der Leber der CD45.2⁺ ABC-DKO-Spendermaus eine deutlich reduzierte Expression des ABCA1-Proteinbande bei 220 kDa auf. Das Referenzprotein GAPDH (37 kDa) ist in allen Proben mit einer vergleichbaren Intensität exprimiert.

Anschließend wurden die gemischten Knochenmarkschimären generiert, indem LDLR-defiziente Empfängermäuse nach letaler Bestrahlung mit einer Mischung von 50% Wildtyp- und 50% myeloid-spezifisch ABCA1-ABCG1-doppeltdefizienten Knochenmarkszellen rekonstituiert wurden. Die myeloid-spezifische Defizienz basierte auf dem Prinzip der Cre-Rekombinase, die unter dem myeloiden Promotor LysM die mit *LoxP* („*flox*“) markierten ABC-Transporter-Gensequenzen erkennt und herausschneidet (38,52).

Um die myeloid-spezifische Defizienz der ABC-Transporter in der übertragenen CD45.2⁺ Population der Knochenmarkschimären sicherzustellen, wurden CD45.1⁺ und CD45.2⁺ Monozyten aus gepoolten Blutproben der chimären Mäuse mittels FACS isoliert und durch *in vitro* Inkubation mit M-CSF zu Makrophagen differenziert. Nach RNA-Isolation und cDNA-Transkription wurden die Expressionslevel von ABCA1 und ABCG1 anschließend durch quantitative *real time* Polymerasekettenreaktion gemessen. Hierbei war in der CD45.2⁺ Population die Expression des ABCA1-Gens um ca. 95%, das ABCG1-Gen um etwa 90% reduziert (Abb. 11). Somit konnte eine myeloid-spezifische Defizienz der ABCA1- und ABCG1-Transporter in der CD45.2⁺ Population der Knochenmarkschimären auf mRNA-Ebene sichergestellt werden.

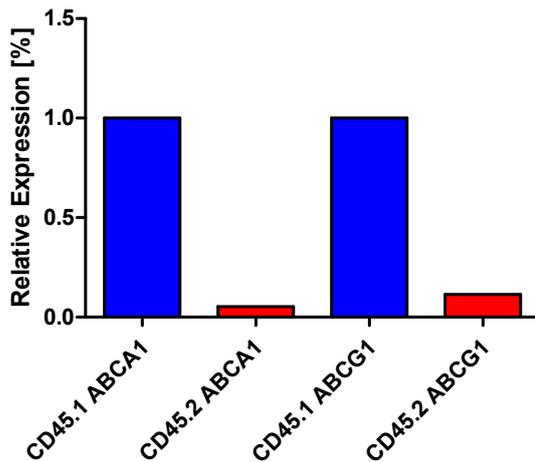


Abb. 11 ABCA1/ABCG1-mRNA-Expression in CD 45.1⁺ Wildtyp- und CD 45.2⁺ ABCA1-ABCG1-defizienten Makrophagen

Blutmonozyten aus gepoolten Blutproben der gemischten Knochenmarkschimären wurden mittels fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung in ihre CD 45.1⁺ Wildtyp- und CD 45.2⁺ gendefiziente Fraktion isoliert und anschließend unter M-CSF-Stimulation 7 Tage lang zu Makrophagen differenziert. Nach mRNA-Isolation und cDNA-Transkription wurde die ABCA1- und ABCG1-mRNA-Expression mittels quantitativer *real time SYBR-GREEN* PCR gemessen. Relative Expressionslevel wurden anhand der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode bestimmt. Die Abbildung zeigt Messwerte aus gepoolten Zellen aus n= 18 Tieren. Die ABCA1-mRNA-Expression war in den ABCDKO-Makrophagen um 95% reduziert, die ABCG1-mRNA-Expression um 90%. Der Graph gibt die mRNA-Expressionslevel relativ zum Wildtyp an. (n=18, gepoolte Blutproben)

4.2. Die Cholesterinexporter ABCA1 und ABCG1 verhindern die Schaumzellbildung von Makrophagen *in vitro* und vermitteln den Cholesterinexport an extrazelluläres HDL

Im nächsten Schritt wurde die Rolle der ABCA1- und ABCG1-Transporter für die Schaumzellbildung von Makrophagen unter Cholesterinstimulation untersucht. Makrophagen nehmen das in der Plaque anfallende cholesterinreiche und oxidativ modifizierte *low density lipoprotein* über die Scavenger-Rezeptoren Typ A (*Macrophage scavenger receptor 1*) und Typ B (CD36) auf und speichern es in Form von intrazellulären Lipidtröpfchen, was zur typischen Schaumzell-Morphologie führt (20). Die Schaumzellbildung wurde durch die Verwendung von fluoreszenzmarkiertem BODIPY-Cholesterin visualisiert und quantifiziert (60).

Monozyten wurden aus dem Blut der chimären Mäuse mittels FACS als CD11b⁺-, CD115⁺- und Lineage-negative Zellpopulation isoliert, in CD45.1⁺ Wildtyp- bzw. CD45.2⁺ ABCA1-ABCG1-defiziente Populationen getrennt und durch *in vitro* Inkubation mit M-CSF zu Makrophagen differenziert. Um eine verstärkte Expression

der ABC-Transporter zu induzieren, wurden beide Populationen zusätzlich mit dem *Liver-X*-Rezeptor-Agonisten T0901317 als Transkriptionsfaktor der ABC-Transporter stimuliert. Nach *in vitro*-Exposition zu BODIPY-Cholesterin und anschließender Inkubation mit HDL als extrazellulärem Cholesterinakzeptor wurde der Zellüberstand im Fluorometer gemessen. Hierbei repräsentierte die mittels Fluorometer gemessene Fluoreszenzintensität des Zellüberstandes den Anteil an fluoreszenzmarkiertem BODIPY-Cholesterin, der über die Transporter ABCA1 und ABCG1 an HDL nach extrazellulär in das Zellkulturmedium abgegeben wurde.

Als Hauptbefund zeigte sich im Zellüberstand von ABCA1- und ABCG1-doppelt-defizienten Makrophagen eine um etwa 40% erniedrigte mittlere Fluoreszenzintensität, so dass die Cholesterinabgabe bei den ABCA1-ABCG1 doppelt-defizienten Makrophagen signifikant erniedrigt war. Umgekehrt war der intrazelluläre Gehalt an fluoreszenzmarkiertem BODIPY-Cholesterin in ABC-defizienten Makrophagen signifikant um ca. 60% erhöht. (Abb. 12).

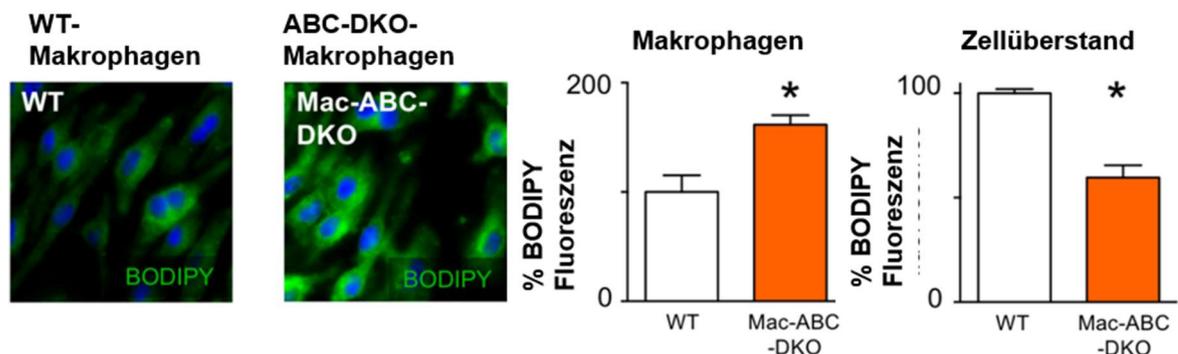


Abb. 12

Cholesterinexport über die ABC-Transporter bei Makrophagen

Cholesterinexporter-kompetente (WT) und -defiziente (Mac-ABC-DKO) Makrophagen wurden mit fluoreszenzmarkiertem BODIPY-Cholesterin (grün) beladen nach Stimulation mit LXR-Agonisten zur Hochregulation der ABC-Transporter. Durch Stimulation mit HDL wurde anschließend die Cholesterinabgabe über die ABC-Transporter induziert. Die BODIPY-Cholesterin-Fluoreszenz wurde jeweils intrazellulär in kultivierten Makrophagen und im Zellüberstand quantifiziert. Kerngegenfärbung mit DAPI (blau). ABC-DKO-Makrophagen weisen eine gesteigerte intrazelluläre Akkumulation von BODIPY-Cholesterin bei gleichzeitig reduziertem Export in den Zellüberstand auf.

Ergebnisse sind angegeben als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) \pm SEM, n=3; * zeigt p < 0,05, ANOVA und *Student's t-test*.

4.3. Wirkung der ABC-Transporter auf Makrophagenanreicherung in atherosklerotischen Aorten

Die *in vitro* Untersuchungen legten eine wichtige Rolle des Cholesterinauswärtstransportes über die ABC-Transporter von Makrophagen in Bezug auf die Schaumzellbildung nahe. Um die pathophysiologische Funktion der ABC-Transporter und deren Transkriptionsfaktor *Liver-X-Rezeptor* für die Atherosklerose *in vivo* zu charakterisieren, wurden durchflusszytometrische Analysen der gemischten Knochenmarkschimären durchgeführt. Aufgrund des gemischten Chimärismus konnten Wildtyp- und gendefiziente Makrophagen im selben Plaquemikromilieu direkt miteinander verglichen werden, Unterschiede zwischen den Zellpopulationen waren daher zellintrinsisch. Der Schwerpunkt lag hierbei auf der Frage, inwieweit ABC-Transporter und der *Liver-X-Rezeptor* die lokale Makrophagenproliferation in der atherosklerotischen Plaque beeinflussen und welche Effekte hieraus in frühen bzw. späten Atherosklerosestadien resultieren. Gemischte Knochenmarkschimären wurden deshalb einerseits nach 4 Wochen cholesterinreicher Diät, zum anderen nach 12 Wochen cholesterinreicher Diät durchflusszytometrisch analysiert. Anhand der bereits beschriebenen Parameter wurden $Ly6C^{high}$ Blutmonozyten, $Ly6C^{low}/F4/80^{low}$ Aortenmonozyten und $Ly6C^{low}/F4/80^{high}$ Aortenmakrophagen differenziert. Anschließend wurde der jeweilige Anteil von $CD45.1^{+}$ Wildtyp- und $CD45.2^{+}$ gendefizienten Zellen quantifiziert. Hierbei wurde insbesondere auf eine potenzielle Verschiebung des relativen Anteils dieser Populationen in zirkulierenden Monozytenvorläufern bzw. lokal in der Plaque eingewanderten und dort lokal differenzierten und proliferierten Makrophagen abgezielt (Abb. 13). Fragestellung war, ob die ABC-Transporter die Verteilung von Monozytenpopulationen im Blut und deren Einwanderung in die Aorta sowie die Populationsverteilung von Aortenmakrophagen innerhalb der atherosklerotischen Plaque beeinflussen.

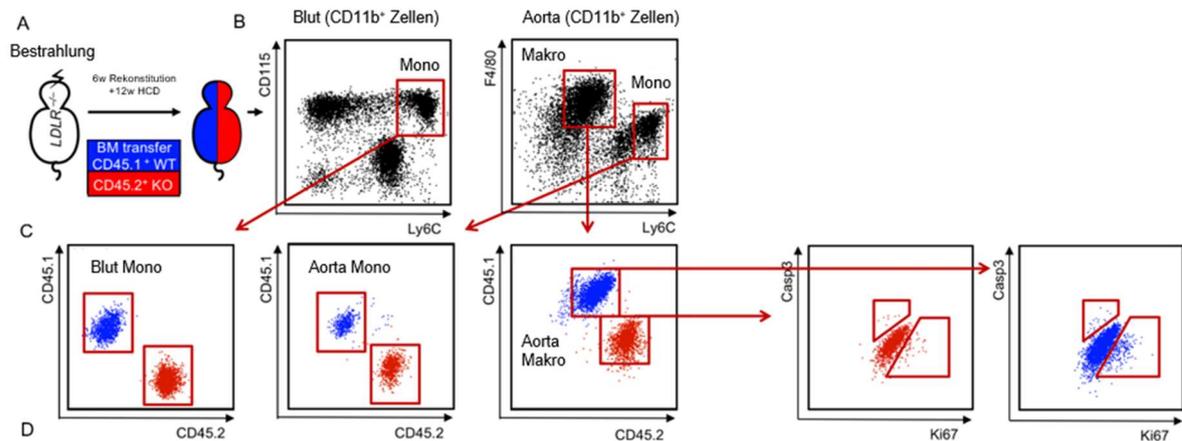


Abb. 13 Schema der *in vivo* Analyse der gemischten Knochenmarkschimären mittels Durchflusszytometrie

LDLR^{-/-} Empfängermause wurden bestrahlt und mit einer 1:1 Mischung von WT- und ABC-defizienten Knochenmarkszellen rekonstituiert. Nach einer 6-wöchigen Rekonstitutionspause folgt die Gabe einer *high cholesterol diet* (HCD) zur Induktion einer Atherosklerose für 4 Wochen zur Untersuchung der frühen Atherosklerose (nicht dargestellt) und für 12 Wochen zur Untersuchung der etablierten Atherosklerose (A).

Durchflusszytometrische Analyse der Monozyten aus dem Blut und in der Aorta anhand von CD11b, Ly6C, F4/80 und CD115 sowie der Aortenmakrophagen anhand ihrer Oberflächenexpression von Ly6C und F4/80 (B). Durchflusszytometrische Analyse der Verteilung des Chimärismus von Monozyten aus dem Blut und in der Aorta sowie von Aortenmakrophagen anhand ihrer Expression von CD45.1 für die WT-Population und CD45.2 für die gendefiziente Population. Innerhalb der WT- und gendefizienten Aortenmakrophagenpopulation anschließende Analyse der Proliferationsrate mittels Ki67 und der Apoptoserate mittels Caspase 3 (C). Makro = Makrophagen, Mono = Monozyten

Im Stadium der **frühen Atherosklerose** fanden sich im Blut und in der Aorta der gemischten Knochenmarkschimären zu gleichen Anteilen CD45.1⁺ Wildtyp- und CD45.2⁺ gendefiziente Monozytenpopulationen. Auch für differenzierte, F4/80⁺ Plaquemakrophagen fand sich im Frühstadium kein signifikanter Unterschied zwischen CD45.1⁺ Wildtyp- und CD45.2⁺ ABC-defizienten Plaquemakrophagen (Abb. 14). Insgesamt war somit die Einwanderung zirkulierender Monozyten in die entstehende Läsion und ihre frühe Differenzierung zu Plaquemakrophagen ABC-Transporter unabhängig.

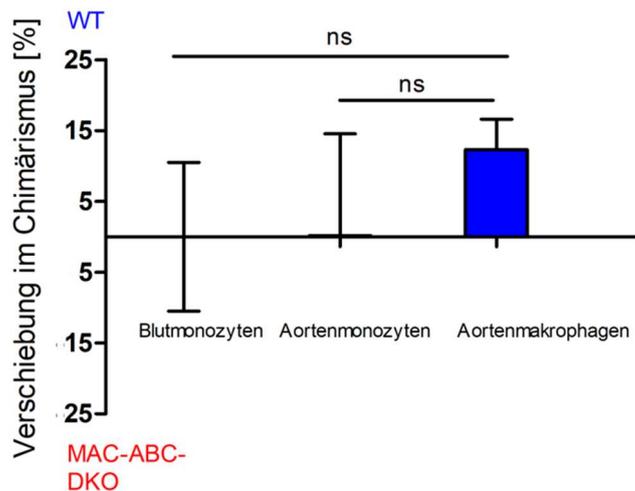


Abb. 14 Chimärismus von Wildtyp- und ABCA1/G1-defizienten Monozyten aus dem Blut und der Aorta sowie in Plaquemakrophagen zum Zeitpunkt der frühen Atherosklerose

Durchflusszytometrische Analyse des Chimärismus von Wildtyp- und ABC-defizienten Blut- und Aortenmonozyten und Aortenmakrophagen anhand der Oberflächenexpression von CD45.1 und CD45.2. Ausgeglichener Chimärismus von Wildtyp- und gendefizienten Blutmonozyten im Blut und in der Aorta, die Einwanderung aus dem Blut in die Aorta ist in beiden Populationen gleich. Zum Zeitpunkt der frühen Atherosklerose zeigt sich keine relevante, signifikante Verschiebung des Chimärismus bei den Aortenmakrophagen. Statistisch nicht signifikantes Überwiegen der Wildtyp-Aortenmakrophagen gegenüber den ABC-defizienten Aortenmakrophagen. Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert \pm SEM. ns = nicht signifikant, $p > 0,05$, $n = 5$, verbundener t-Test.

Zum Zeitpunkt der **fortgeschrittenen Atherosklerose** nach 12 Wochen cholesterinreicher Fütterung zeigten sich im Blut und in der Aorta ebenfalls gleich viele CD45.1⁺ Wildtyp- und CD45.2⁺ gendefiziente Monozyten. Auch in der fortgeschrittenen Atherosklerose blieb die Einwanderung der Monozyten von der Zirkulation in die etablierte Läsion demnach von einer Deletion der ABC-Transporter unbeeinflusst. Hingegen war der Anteil von CD45.1⁺ Wildtyp- mit 79% gegenüber 21% CD45.2⁺ gendefizienten Aortenmakrophagen erhöht (Abb. 15). Der Chimärismus von Wildtyp- und ABC-defizienten Makrophagen hatte sich zugunsten der Wildtyp-Aortenmakrophagen statistisch signifikant verschoben.

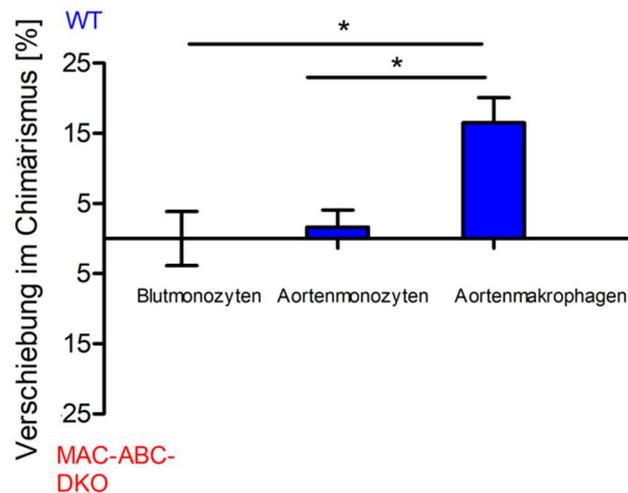


Abb. 15 Chimärismus von Wildtyp- und ABCA1/G1-defizienten Monozyten aus dem Blut und der Aorta sowie in Plaquemakrophagen zum Zeitpunkt der etablierten Atherosklerose

Durchflusszytometrische Analyse des Chimärismus von Wildtyp- und gendefizienten Blut- und Aortenmonozyten und Aortenmakrophagen anhand der Oberflächenexpression von CD45.1 und CD45.2 zum Zeitpunkt der etablierten Atherosklerose.

In der etablierten Plaque stellt die Wildtyp-Makrophagenpopulation den dominierenden Anteil dar gegenüber der ABCA1/G1-defizienten Makrophagenpopulation. ABCA1 und ABCG1 kompetente Makrophagen sind gegenüber den gendefizienten Makrophagen im Vorteil. Der Chimärismus ist signifikant zugunsten der Wildtyp-Makrophagen verschoben. Hingegen fand sich eine ausgeglichene Verteilung des Chimärismus in Monozytenpopulationen im Blut und in der Aorta. Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert \pm SEM. * $P < 0,05$, $n = 6$, verbundener t-Test. chim= Chimärismus, MAC = Makrophagen

4.3.1. Rolle der Cholesterinexporter ABCA1 und ABCG1 für die Proliferation und Apoptose von Aortenmakrophagen in der frühen und etablierten Atherosklerose

Da die Einwanderung der Monozyten als Vorläufer der Plaquemakrophagen bei gleich großen Anteilen von CD45.1⁺ und CD45.2⁺ Subpopulationen im Blut und in der Aorta unverändert war, musste das Überwiegen der CD45.1⁺ Wildtyp-Plaquemakrophagen gegenüber den CD45.2⁺ ABC-defizienten Plaquemakrophagen durch einen lokalen Effekt in der Läsion bedingt sein, der entweder zu einer erhöhten Proliferation von CD45.1⁺ Plaquemakrophagen oder zu einer verstärkten Apoptose von CD45.2⁺ Plaquemakrophagen führt. Untersucht wurde dies anhand der quantitativen Bestimmung der Proliferationsrate und Apoptoserate der Plaquemakrophagen *in vivo*. Zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Proliferationsrate wurde das intrazelluläre Antigen Ki67 verwendet, das in proliferierenden Zellen in der G1-, S-, G2- sowie in der Mitose-Phase

exprimiert wird (56). Zur Detektion der Apoptoserate wurde Caspase 3 verwendet, das als Schlüsselenzym in der Kaskade des programmierten Zelltodes fungiert (57,69).

In der frühen Atherosklerose waren die Anteile Ki67⁺ und Caspase3⁺ CD45.2⁺ ABC-defizienter gegenüber CD45.1⁺ Wildtyp- Plaquemakrophagen nicht signifikant unterschiedlich. (Abb. 16).

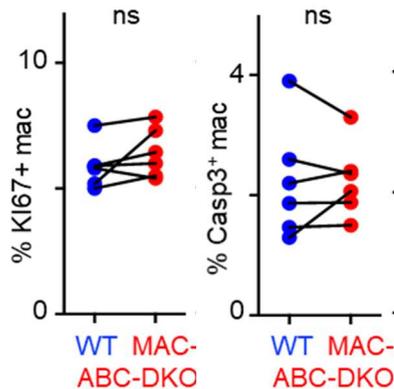


Abb. 16 Proliferations- und Apoptoserate von Wildtyp- und ABCA1/ABCG1-doppelt-defizienten Plaquemakrophagen in der frühen Atherosklerose

Durchflusszytometrische Analyse der Proliferationsrate mittels Ki67 und der Apoptoserate mittels Caspase 3 bei WT- und ABC-defizienten Plaquemakrophagen in der frühen Atherosklerose. In der frühen Atherosklerose zeigen sich keine signifikant veränderten Proliferations- und Apoptoseraten der Wildtyp-Plaquemakrophagen und der ABCA1/ABCG1-doppelt-defizienten Plaquemakrophagen. Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert ± SEM. n= 5. Verbundener t-Test. ns = nicht signifikant, mac = Makrophagen

In der fortgeschrittenen Atherosklerose hingegen zeigte sich gegenüber den Wildtyp-Aortenmakrophagen eine Zunahme Ki67⁺-ABC-defizienter Makrophagen um 15% (p < 0,05). Noch deutlicher war aber der um 54 % erhöhte Anteil von Caspase 3⁺ Zellen in der Population ABC-defizienter Plaquemakrophagen (Abb. 17). Die Cholesterinüberladung ABC-defizienter Makrophagen erhöhte somit zwar bis zu einem gewissen Grad die Proliferation, aber vor allem die Apoptose der Aortenmakrophagen.

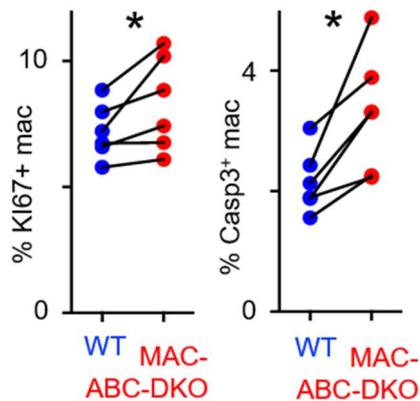


Abb. 17 Proliferations- und Apoptoserate von Wildtyp- und ABCA1/ABCG1-doppelt-defizienten Plaquemakrophagen in der fortgeschrittenen Atherosklerose
 Durchflusszytometrische Analyse der Proliferationsrate mittels Ki67 und der Apoptoserate mittels Caspase 3 bei Wildtyp- und ABC-defizienten Plaquemakrophagen in der fortgeschrittenen Atherosklerose. Die Proliferationsrate ist bei den ABCA1-ABCG1-doppelt-defizienten Plaquemakrophagen in Relation zu der der Wildtyp-Plaquemakrophagen signifikant erhöht. Die Apoptoserate ist bei den gendefizienten Plaquemakrophagen ebenfalls signifikant erhöht. Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert \pm SEM. n= 6. Verbundener t-Test. * = P < 0,05, mac = Makrophagen

Die erhöhte Apoptoserate der ABC-defizienten Aortenmakrophagen erklärt, warum der Chimärismus zum Zeitpunkt der etablierten Atherosklerose zugunsten der Wildtyp-Aortenmakrophagen-Population verschoben war. Da die ABC-defizienten Plaquemakrophagen vermehrt in den programmierten Zelltod gingen, überwog der prozentuale Anteil ABC-kompetenter Plaquemakrophagen in der etablierten atherosklerotischen Plaque.

4.4. Die Rolle des *Liver-X*-Rezeptor als Transkriptionsfaktor der ABCA1- und ABCG1-Transporter in der etablierten Atherosklerose

Der *Liver-X*-Rezeptor reguliert als Transkriptionsfaktor Liganden-abhängig die Expression der ABCA1- und ABCG1-Transporter hoch, so dass er als Cholesterinsensor die Zelle vor einem intrazellulären Cholesterinüberschuss bewahrt (70). Aufgrund der anti-atherogenen Effekte des *Liver-X*-Rezeptors (71) gingen wir im Weiteren der Rolle des *Liver-X*-Rezeptors für die Progression der etablierten Plaque nach. Es sollte insbesondere geklärt werden, inwiefern eine *Liver-X*-Rezeptor-vermittelte Hochregulation der ABC-Transporter das Proliferationsverhalten von Plaquemakrophagen beeinflusst.

Hierfür wurden in der Arbeitsgruppe von Filip Swirski gemischte Knochenmarkschimären entsprechend den ABC-defizienten Chimären generiert. LDLR^{-/-}-Mäuse wurden nach letaler Bestrahlung mit einer 1:1-Mischung aus Wildtyp- und LXR_{α/β}-defizienten Knochenmarkszellen rekonstituiert und für 12 Wochen einer cholesterinreichen, pro-atherogenen Diät unterzogen. Da die Cholesterinabgabe über die ABC-Transporter keinen Effekt auf das Makrophagenverhalten im frühen Atherosklerosestadium hatte, wurde auf eine gesonderte Untersuchung der LXR_{α/β}-defizienten Chimären zum frühen Atherosklerosestadium verzichtet.

Die gemischten LXR_{α/β}-defizienten Knochenmarkschimären wurden im Stadium der etablierten Atherosklerose durchflusszytometrisch hinsichtlich der Verteilung von CD45.1⁺-Wildtyp- und CD45.2⁺-gendifizienten Monozytenpopulationen im Blut und der Aorta sowie Aortenmakrophagenpopulationen sowie hinsichtlich deren Proliferations- und Apoptoserate analog zu den ABC-defizienten Knochenmarkschimären untersucht.

In der etablierten Atherosklerose war der Anteil von CD45.1⁺ Wildtyp- und CD45.2⁺ LXR-defizienten Monozyten sowohl im Blut als auch in der Aorta gleich groß. Die Einwanderung von hämatogenen Monozyten in die atherosklerotische Plaque war folglich LXR-unabhängig. Allerdings überwog der Anteil der CD45.1⁺ Wildtyp-Plaquemakrophagen mit etwa 90% deutlich den der CD45.2⁺ LXR-defizienten Plaquemakrophagen mit nur 10% (Abb. 18). Diese Befunde waren mit den Ergebnissen der Untersuchung der ABC-defizienten Knochenmarkschimären kongruent, jedoch in einem quantitativ größeren Ausmaß.

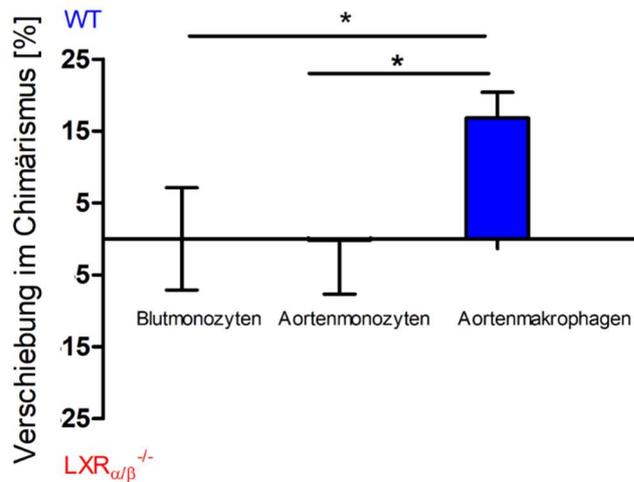


Abb. 18 Chimärismus von Wildtyp- und LXR-defizienten Monozyten aus dem Blut und der Aorta sowie in Plaquemakrophagen zum Zeitpunkt der etablierten Atherosklerose

Durchflusszytometrische Analyse des Chimärismus von Wildtyp- und LXR-defizienten Blut- und Aortenmonozyten und Aortenmakrophagen anhand der Oberflächenexpression von CD 45.1 und CD 45.2. Ausgeglichener Chimärismus von Wildtyp- und gendefizienten Blutmonozyten im Blut und in der Aorta, die Einwanderung aus dem Blut in die Aorta ist in beiden Populationen gleich. Zum Zeitpunkt der etablierten Atherosklerose zeigt sich eine relevante, signifikante Verschiebung des Chimärismus bei den Aortenmakrophagen zugunsten der Wildtyp-Plaquemakrophagen. Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert \pm SEM. n= 6. Verbundener t-Test. * P < 0,05, chim= Chimärismus

Auch bei der Proliferations- und Apoptoserate zeigten sich ähnliche Verhältnisse wie bei den ABC-defizienten Chimären. Der Anteil Ki67⁺ Zellen war bei den LXR-defizienten Plaquemakrophagen nur gering und statistisch nicht signifikant erhöht (p=0,08), der Anteil Caspase3⁺ Zellen aber um 153% erhöht (p<0,05; Abb. 19). Eine Deletion des Liver-X-Rezeptors führt demnach zu einer Erhöhung der Apoptoserate, hat aber keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate von Plaquemakrophagen. Der zugunsten der LXR-kompetenten Wildtyp-Aortenmakrophagenpopulation verschobene Chimärismus ließ sich folglich durch die signifikant erhöhte Apoptoserate der LXR-defizienten Aortenmakrophagen in der etablierten Plaque erklären.

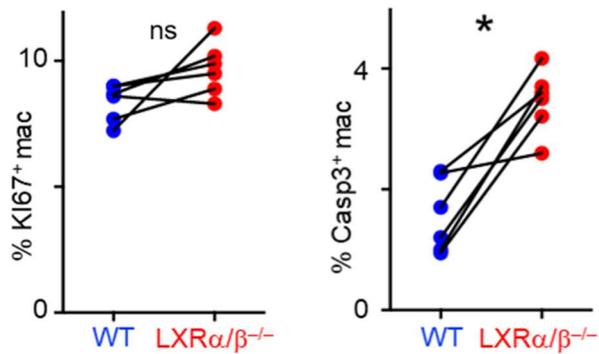


Abb. 19 Proliferations- und Apoptoserate von Wildtyp- und LXRα/β-defizienten Plaquemakrophagen in der fortgeschrittenen Atherosklerose
 Durchflusszytometrische Analyse der Proliferationsrate mittels Ki67 und der Apoptoserate mittels Caspase 3 bei Wildtyp- und LXR-defizienten Plaquemakrophagen in der fortgeschrittenen Atherosklerose. Die Proliferationsrate ist bei den LXRα/β -defizienten Plaquemakrophagen nicht signifikant erhöht ($p = 0,08$). Die Apoptoserate ist bei den gendefizienten Plaquemakrophagen signifikant erhöht. Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert \pm SEM. $n = 6$. Verbundener t-Test. * $P < 0,05$, ns= nicht signifikant $P > 0,05$, mac= Makrophagen

4.5. Zytokinexpression in myeloid-spezifisch ABCA1-ABCG1-defizienten gemischten Knochenmarkschimären

Um den Einfluss der ABC-Transporter und des Cholesterinauswärtstransportes auf den inflammatorischen Phänotyp von Plaquemakrophagen zu untersuchen, wurden die Zytokinexpressionsmuster von Aortenmakrophagen aus gemischten Knochenmarkschimären zum Zeitpunkt der etablierten Atherosklerose nach 12 Wochen cholesterinreicher Fütterung analysiert. Mittels FACS wurden Aortenmakrophagen als CD11b⁺, Ly6C^{low} sowie F4/80^{high} identifiziert und anschließend anhand ihrer Oberflächenexpression von CD45.1 und CD45.2 in die entsprechenden genkompetenten und gendefizienten Populationen getrennt. Anschließend wurde die Genexpression der unterschiedlichen Populationen mittels quantitativer *real time* Polymerasekettenreaktion analysiert.

Hierbei wurden IL-1 β , IL-6 und TNF α als typische Zytokine inflammatorischer M1- und IL-10 und TGF β als anti-inflammatorische Zytokine sog. M2-Makrophagen untersucht (20). Insgesamt fand sich bei großen interindividuellen Schwankungen in ABCA1- und ABCG1-defizienten Makrophagen im Vergleich zum Wildtyp eine tendenzielle, statistisch aber nicht signifikante Abnahme von IL-10 und TGF β sowie eine tendenzielle Zunahme von TNF α (Abb. 20).

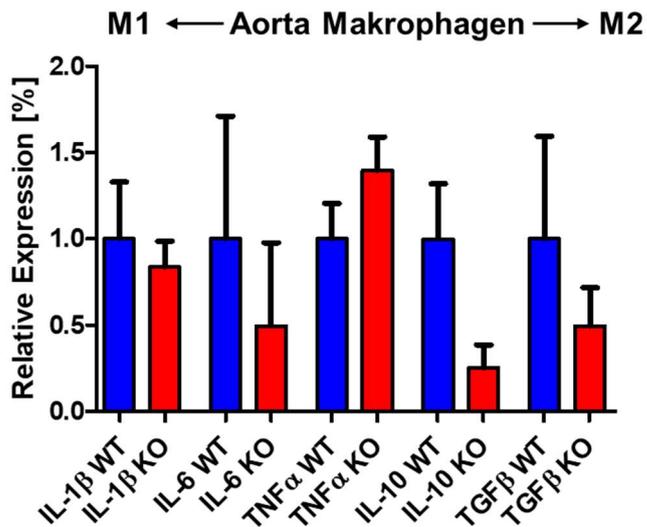


Abb. 20

Myeloid-spezifische ABCA1-ABCG1-Defizienz hat geringe Effekte auf den inflammatorischen Phänotyp von Aortenmakrophagen

Das Säulendiagramm zeigt das Zytokinprofil von Wildtyp- (WT) und ABCA1-ABCG1-doppelt-defizienten (KO) Aortenmakrophagen, die mittels FACS aus den Aorten der gemischten Knochenmarkschimären nach 12 Wochen cholesterinreicher Fütterung isoliert wurden. Mittels quantitativer *TaqMan real time* PCR wurde die mRNA-Expression M1-assoziiierter, pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6 und TNF α) sowie die mRNA-Expression M2-assoziiierter anti-inflammatorischer Zytokine (IL-10 und TGF β) analysiert. Die Daten der quantitativen PCR wurden mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet. Werte mit einem Ct-Wert größer 39 wurden als nicht exprimiert gewertet. Der Graph gibt die mRNA-Expressionslevel relativ zum Wildtyp an. (Mittelwert \pm SEM). (n=4 pro Gruppe, p < 0,05, Mann-Whitney-Test/t-test).

5. Diskussion

5.1. Überblick

Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, welche pathophysiologische Rolle die ABC-Transporter ABCA1 und ABCG1 und ihre transkriptionelle Regulation über die Liver-X-Rezeptoren für das Verhalten von Plaquemakrophagen in der Atherogenese spielen. Hierbei wurde zunächst in einem *in vitro* Modell die Modulation der Schaumzellbildung durch ABC-vermittelten Cholesterinexport charakterisiert. Hauptbefund war eine vermehrte intrazelluläre Cholesterinakkumulation und Schaumzellbildung in ABC-defizienten Makrophagen. Die pathophysiologischen Konsequenzen wurden vergleichend in chimären Mausmodellen der frühen und etablierten atherosklerotischen Plaque untersucht. Hierbei fand sich in der etablierten Plaque eine erhöhte Proliferations- und Apoptoserate von ABC- und LXR-defizienten Plaquemakrophagen. Das Zytokinprofil von ABC-defizienten Makrophagen aus etablierten Plaques zeigte eine tendenzielle Hochregulation von proinflammatorischem TNF α bei gleichzeitiger Herabregulation von anti-inflammatorischem IL-10 und TGF β . Im Gegensatz zur etablierten Plaque fand sich in frühen Stadien der Läsionsentwicklung kein Einfluss einer ABC-Defizienz auf die Makrophagenakkumulation in der Plaque bei unveränderter Proliferations- und Apoptoserate. Insgesamt legen die Befunde somit nahe, dass der ABC-abhängige Cholesterinexport eine kritische gegenregulatorische Funktion bei der Proliferation und insbesondere bei der Apoptose von Makrophagen in der etablierten, nicht aber entstehenden Plaque spielt.

Die *in vitro*-Befunde der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit Untersuchungen von *Yvan-Charvet et al.*, die in ABC-defizienten Mäusen eine verstärkte Infiltration von ABC-defizienten Makrophagen-Schaumzellen histologisch im Myokard und der Milz atherosklerotischer Mäuse nachweisen konnten (72). Schaumzellen speichern Cholesterin in Form von Lipidtröpfchen, stellen den dominierenden zellulären Bestandteil einer atherosklerotischen Plaque dar und sind ein zentraler Treiber für den inflammatorischen Progress der Läsion (24). Den hemmenden Einfluss des ABCA1/G1-vermittelten Cholesterinauswärtstransports auf die Schaumzellbildung konnten wir *in vitro* in ABC-defizienten Makrophagen zeigen. Unter Verwendung von fluoreszenzmarkiertem BODIPY-Cholesterin wurde

der ABC-abhängige Cholesterinauswärtstransport aus Makrophagen an extrazelluläres HDL als Cholesterinakzeptor direkt visualisiert und quantifiziert. Hierbei hatten ABC-defiziente Makrophagen im Vergleich zum Wildtyp einen höheren intrazellulären Cholesteringehalt. Übertragen auf die *in vivo* Situation bei der Atherogenese bedeutet dies, dass eine Cholesterinüberladung durch erschöpften Auswärtstransport über die ABC-Transporter die Entstehung von Schaumzellen und damit eine proinflammatorische Differenzierung der Plaquemakrophagen befördert. Dieser Vorgang spielt eine zentrale Rolle bei der Atherogenese und Plaqueprogression (24).

Die Analyse des Zytokinprofils der ABC-defizienten Plaquemakrophagen aus etablierten Plaques lieferte in dieser Promotionsarbeit ein tendenzielles, statistisch aber nicht signifikantes Überwiegen proinflammatorischer gegenüber antiinflammatorischer Zytokinexpression. *Yvan-Charvet et al.* fanden nach *in vitro* Stimulation mit Lipopolysacchariden in ABCA1 und ABCG1-doppeltdefizienten Makrophagen im Vergleich zum Wildtyp eine signifikante Erhöhung von proinflammatorischen Zytokinen und beschrieben *in vivo* eine nach Thioglycollatstimulation vermehrte Infiltration inflammatorischer Zellen, insbesondere neutrophiler Granulozyten, in Plaqueläsionen atherosklerotischer ABCG1-defizienter Mäuse (73). Diese Befunde legen grundsätzlich eine wichtige Rolle des ABC-vermittelten Cholesterinexports für antiinflammatorische Gegenregulation in Makrophagen nahe. *Westerterp et al.* fanden im *in vivo* Atherosklerosemodell ABCA1-ABCG1-doppeltdefizienter Makrophagen zwar eine Hochregulation der Chemokine Mip1- α und Mcp-1 in ABC-defizienten Makrophagen, welche eine Rolle für die Rekrutierung von Monozyten spielen und die Atherogenese beschleunigen. Hingegen lieferte die Analyse von inflammatorischen Zytokinen auch in der Arbeit von *Westerterp et al.* keine signifikanten Ergebnisse [81]. Hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist zu sagen, dass in der vorliegenden Arbeit gemischte Knochenmarkschimären verwendet wurden, bei denen die transferierten Knochenmarkszellen zur Hälfte aus ABC-defizienten und zur anderen Hälfte aus ABC-kompetenten Wildtypzellen bestanden. Hingegen verwendeten *Westerterp et al.* Knochenmarkschimären mit einer globalen ABCA1-ABCG1-Defizienz in allen transplantierten Knochenmarkszellen.

Hauptbefund der *in vivo*-Experimente der vorliegenden Arbeit war, dass ABC- und LXR-defiziente Plaquemakrophagen in der etablierten atherosklerotischen Plaque eine erhöhte Proliferations- und Apoptoserate aufwiesen. Hierbei nahm sowohl in ABC- als auch LXR-defizienten Plaquemakrophagen die Apoptose stärker zu als die Proliferation. Denkbar wäre, dass im Zuge einer konstanten intrazellulären Cholesterinanhäufung, zum Beispiel im Zuge des Erschöpfens des kompensatorischen Cholesterinauswärtstransportes ab einem Schwellenwert der pro-apoptotische Effekt den proliferationsförderlichen Effekt überwiegt, so dass Ausmaß und Dauer der intrazellulären Cholesterinüberladung über das Schicksal der Makrophagen entscheiden könnte. Grundsätzlich stehen unsere *in vivo* Befunde im Einklang mit Ergebnissen von *Yvan-Charvet et al.*, die eine vermehrte Apoptose in Makrophagen-Schaumzellen histologisch im Herz sowie atherosklerotischen Läsionen von Mäusen mit einer globalen ABC-Knochenmarks-Defizienz und *in vitro* nach Cholesterinstimulation in ABC-defizienten Makrophagen nachweisen konnten (72). Hervorzuheben sei hier der Vorteil des von uns verwendeten Modells der gemischten Knochenmarkschimären, das gegenüber einer Globaldefizienz den direkten Vergleich spezifischer zellintrinsischer Funktionen zwischen gendefizienter und genkompetenter Zelle bei identischen systemischen Bedingungen ermöglicht. Zahlreiche Studien haben stadienspezifische zelluläre Pathomechanismen im Krankheitsverlauf der Atherosklerose gezeigt. In der frühen Atherosklerose stellt die hämatogene Monozyteneinwanderung in die entstehende Läsion den entscheidenden Mechanismus für die Zellakkumulation in der Plaque dar (36). Unsere Untersuchungen zeigten, dass die Proliferation und Apoptose von ABC-defizienten Plaquemakrophagen im Frühstadium der Läsion gegenüber den Wildtyp-Makrophagen nicht gesteigert war, so dass der lokale, von der hämatogenen Einwanderung unabhängige Prozess des Cholesterinexports zu diesem Zeitpunkt keine wesentliche Rolle für die Makrophagenakkumulation spielt. Hingegen zeigten unsere Untersuchungen in der etablierten Plaque, dass die Interferenz mit dem ABC-vermittelten Cholesterinexport einen entscheidenden Einfluss auf die lokale Makrophagenproliferation und -apoptose als Schlüsselmechanismen der etablierten Atherosklerose hat.

Bisherige Studien beleuchteten vor allem den atheroprotektiven Effekt von ABC-Transportern in Bezug auf hämatopoetische Stammzellen (14), Monozyten, neutrophile Granulozyten (38) und Endothelzellen (67). So wurde ein

antiproliferativer Effekt von ABCA1 und ABCG1 für hämatopoetische Stammzellen und Monozyten in atherosklerotischen Mäusen mit einer globalen ABC-Knochenmarks-Defizienz beschrieben (14). *Westerterp et al.* wiesen darüber hinaus eine verstärkte Monozytose und Neutrophilie im Blut von atherosklerotischen myeloid-spezifisch ABC-defizienten Mäusen nach, die auf stimulierende Wachstumsfaktoren (M-CSF, G-CSF) von aus der Milz ansässigen Makrophagen-Schaumzellen zurückzuführen war. In dieser Arbeit führte die myeloid-spezifische Defizienz von ABCA1 und ABCG1 zu signifikant größeren und komplexeren atherosklerotischen Läsionen (38). In dieser Studie blieb jedoch unklar, inwieweit der beobachtete Effekt der ABC-Defizienz durch stadienspezifische Einflüsse auf die hämatogene Monozytenrekrutierung bzw. lokale Proliferation von Plaquemakrophagen andererseits vermittelt wurde. Ferner wurden die unterschiedlichen Atherosklerosestadien nicht adressiert.

Ein Hauptbefund dieser Promotionsarbeit ist, dass die Monozyteneinwanderung in die Läsion zum Zeitpunkt der frühen als auch fortgeschrittenen Atherosklerose unabhängig vom ABC-vermittelten und über LXR-transkriptionell regulierten Cholesterinexport vonstattengeht. Da der Chimärismus von ABC-defizienten und ABC-kompetenten Monozyten im Blut und in der Aorta vergleichbar war, kann man schlussfolgern, dass die Cholesterinexporter nicht direkt die Rekrutierungskapazität von Monozyten in die Läsion beeinflussen. Würden ABC-defiziente Monozyten präferentiell rekrutiert werden, hätte sich der Chimärismus zugunsten der ABC-defizienten Monozyten in der Aorta verschieben müssen.

Komplementär zum ABC-abhängigen Cholesterinexport hatten bereits Arbeiten von *Hilgendorf et al.* die Rolle des Cholesterinimports über den Scavenger Rezeptor Msr1 in Plaquemakrophagen adressiert (36). Hierbei förderte die Cholesterinaufnahme über Msr1 die Makrophagenproliferation in der etablierten atherosklerotischen Plaque. Hieran anknüpfend zeigte unsere Arbeitsgruppe bereits, dass die Cholesterinaufnahme nicht nur über Msr1, sondern auch über den Scavenger Rezeptor CD36 die Proliferation von Makrophagen zum Zeitpunkt der etablierten Atherosklerose triggert (74).

Zusammengenommen stellen die gegenläufigen Prozesse des Cholesterinexports über ABCA1 und ABCG1, transkriptionell reguliert über LXR, und des Cholesterinimports über Msr1 und CD36 zentrale Regulationsmechanismen dar mit Auswirkung auf die Progression der fortgeschrittenen Atherosklerose, indem sie mit

der Makrophagenproliferation und -apoptose zwei kritische, lokal in der Plaque wirkende Pathomechanismen beeinflussen.

5.2. Makrophagen-Apoptose, Inflammation, Inflammasom

Der Befund gesteigerter Apoptose von ABC-defizienten, mit Cholesterin beladenen Makrophagen stehen im Einklang mit Ergebnissen von *Feng et al. (75)*. Demnach führt die intrazelluläre Überladung von freiem Cholesterin und dessen Anhäufung im endoplasmatischen Retikulum (ER) zu einer Dysfunktion der dort lokalisierten Membranproteine, was wiederum über eine ER-abhängige Signalkaskade, die den Zelltod-Effektor CHOP beinhaltet, in der Apoptose resultiert (75). Die pathophysiologische Konsequenz der Apoptose lipidbeladener Makrophagen für den Progress einer atherosklerotischen Läsion hängt hierbei entscheidend davon ab, wie effizient apoptotische Zellen im Prozess der sogenannten Efferozytose von Phagozyten beseitigt werden können.

Wie diese Promotionsarbeit zeigt, ist die Apoptose von Makrophagen durch Cholesterinüberladung im Zuge einer ABC-Transporter-Defizienz erst im fortgeschrittenen Atherosklerose-Stadium zu beobachten. In der frühen Atherosklerose konnte keine erhöhte Apoptoserate der ABC-defizienten Plaquemakrophagen detektiert werden, so dass anzunehmen ist, dass in diesem Stadium die intrazelluläre Cholesterinakkumulation durch einen gestörten Cholesterinauswärtstransport noch kompensiert werden kann und keinen ER-Stress-vermittelten Zelltod induziert. Erst durch eine manifeste intrazelluläre Cholesterin-Dysbalance durch fortwährende Cholesterinaufnahme würde demnach zum späteren Zeitpunkt in der etablierten Atherosklerose der proapoptotische Effekt der intrazellulären Cholesterinüberladung resultieren. Nach publizierten Daten sind je nach Stadium auch Effizienz und Kapazität der Beseitigung apoptotischer Zellen verschieden. So ist in der frühen Atherosklerose die phagozytotische Beseitigung von apoptotischen Makrophagen-Schaumzellen durch benachbarte Makrophagen noch effizient und damit die Apoptose von Makrophagen aufgrund einer damit einhergehenden verringerten Anzahl lebender Schaumzellen in der Läsion mit einer Verlangsamung des Krankheitsprogresses und einer Limitierung der Läsionsgröße assoziiert (76). Somit kommt der Efferozytose apoptotischer Zellen in einer frühen atherosklerotischen Läsion atheroprotektive und anti-inflammatorische Eigenschaften zu. Sind aber im fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose die

Kapazitäten der Efferozytose erschöpft, häufen sich apoptotische Zellen an mit sekundärer postapoptotischer Nekrose und konsekutiver Freisetzung intrazellulärer Bestandteile. Hieraus resultiert ein direkter Gewebeschaden durch die freigesetzten intrazellulären Proteasen mit vermehrter Koagulations- und Thromboseneigung und einer inflammatorischen Reaktion des Plaquemilieus, die wiederum die Monozyteneinwanderung in die Läsion verstärkt. Diese Mechanismen werden mit der Formation des nekrotischen Kerns und der Entstehung einer instabilen Läsion mit erhöhter Rupturneigung assoziiert (Abb. 21).

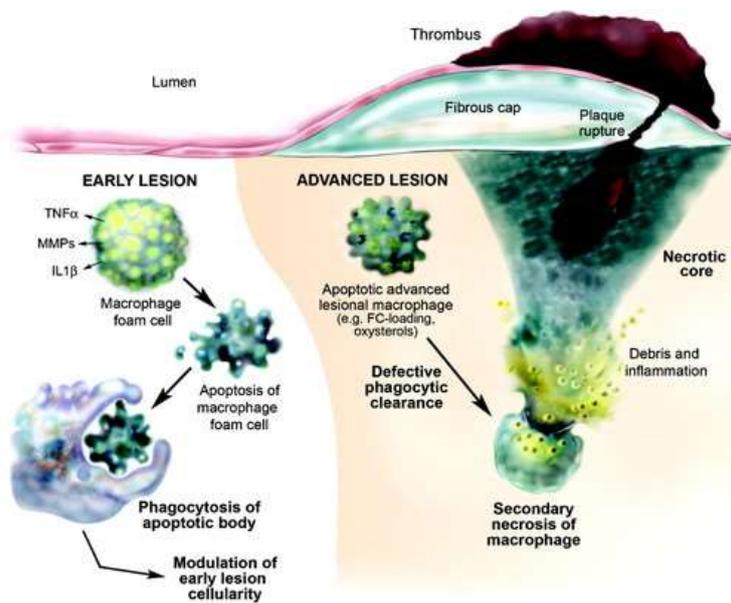


Abb. 21 Stadienabhängige Auswirkung der Apoptose von Makrophagen in der Atherosklerose (69)

In frühen Läsionen (links abgebildet) werden apoptotische Makrophagen-Schaumzellen schnell und effizient durch benachbarte phagozytotische Makrophagen beseitigt. Dieser Mechanismus geht aufgrund einer Verringerung der Anzahl lebender Schaumzellen mit einer Verlangsamung der Progression der Läsion einher. In etablierten Läsionen (rechts abgebildet) können apoptotische Makrophagen aufgrund einer Erschöpfung der phagozytotischen Kapazitäten nicht mehr effizient beseitigt werden, woraufhin sie sekundär postapoptotisch nekrotisch werden und eine inflammatorische Signalkaskade auslösen. Dies wiederum führt zu der Ausbildung des nekrotischen Kerns einer instabilen und rupturgefährdeten Plaque mit Thrombusbildung.

Duewell et al. zeigen, dass die Cholesterinüberladung von Plaquemakrophagen in ApoE-defizienten Mäusen eine lysosomale Ruptur mit Freisetzung von phago-lysosomalen Bestandteilen ins Zytosol induzierte, die mit einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und konsekutiver Freisetzung von pro-inflammatorischem IL-1 β einherging (77). Das NLRP3-Inflammasom ist ein zytosolischer Multiprotein-Signalkomplex, der eine zentrale Stellung in verschiedenen immunologischen und

inflammatorischen Prozessen einnimmt (78). Er wird von unterschiedlichen Signalen wie den PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) und DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) aktiviert. Das NLRP3-Inflammasom besteht aus dem NLRP3-Protein (NLR Family Pyrin domain containing 3), seinem Adaptor-Protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain (CARD)) und Caspase 1, das von diesem Proteinkomplex aus seiner inaktiven Vorstufe Pro-Caspase 1 gespalten und aktiviert wird. Caspase 1 ist ein proteolytisches Enzym, das wiederum proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β sowie IL18 in seine aktiven Stufen spaltet (78). Bezüglich des potenziellen Zusammenhangs zwischen Inflammasom-Aktivierung und der Makrophagenproliferation zeigen noch unveröffentlichte Befunde unserer Arbeitsgruppe, dass das NLRP3-Inflammasom die Proliferation von Plaquemakrophagen in der etablierten Atherosklerose fördert. Die Apoptose von Plaquemakrophagen jedoch blieb von einer Defizienz des NLRP3-Inflammasoms unbeeinflusst. Mit Blick auf die Atherogenese ergaben Experimente in NLRP3-defizienten Mäusen eine deutliche Reduktion atherosklerotischer Läsionen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (77). Auch die Transplantation von Caspase 1-defizienten Knochenmarkszellen in LDLR^{-/-}-Mäuse führte zu einer Größenreduktion der atherosklerotischen Läsionen und einer Verkleinerung des nekrotischen Kerns (79).

Interessanterweise zeigten *Westerterp et al.*, dass eine Cholesterinakkumulation durch eine myeloide ABC-Defizienz zu einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms mit konsekutiver Erhöhung der Sekretion von proinflammatorischem IL-18 führt (39). LDLR^{-/-}-Mäuse mit einer kombinierten Defizienz für ABCA1/ABCG1 sowie NLRP3 bzw. Caspase 1/11 wiesen unter cholesterinreicher Fütterung eine deutlich verringerte Läsionsgröße auf. Somit aggraviert der NLRP3-Inflammasom-Komplex die Atherosklerose in ABCA1-ABCG1-defizienten Mäusen. Patienten mit der Tangier-Erkrankung, die eine Mutation von ABCA1 haben und im jungen Lebensalter verfrüht an Atherosklerose erkranken, zeigten eine Erhöhung der Inflammasommarker im Serum, was ebenfalls verdeutlicht, dass die Cholesterinabgabe über die ABC-Transporter die Inflammasom-Aktivierung unterdrückt (39). HDL, das als extrazellulärer Cholesterinakzeptor über Interaktion mit den ABC-Transportern den Cholesterinauswärtstransport aus Makrophagen fördert, konnte die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch

Cholesterinüberladung ebenfalls unterdrücken und zu einer reduzierten Expression von Caspase 1 und pro-IL-1 β führen (80).

Zusammengenommen kann also eine Verbindung postuliert werden zwischen der rezeptorvermittelten Cholesterinaufnahme, der im Zuge der erschöpften Cholesterinabgabe anfallenden intrazellulären Cholesterinüberladung und die dadurch induzierte Inflammasom-Aktivierung, die allesamt in einer gesteigerten Makrophagenproliferation und konsekutivem inflammatorischen Läsionsprogress münden.

5.3. Therapeutische Ansätze

Aus den vorliegenden Befunden erscheint die durch Cholesterinim- und -export regulierte Lipidhomöostase als ein zentrales therapeutisches Target für die Behandlung der etablierten Atherosklerose. Da im klinischen Setting die Atherosklerose erst im fortgeschrittenen Stadium symptomatisch wird, sind auf die etablierte Plaque gerichtete therapeutische Strategien von entscheidender klinischer Bedeutung. Interessanterweise zeigten Therapiestrategien, die durch Verabreichung eines SYK-Inhibitors die Monozytenbildung und –einwanderung in die Plaque reduzierten, aber die Makrophagenproliferation unbeeinflusst ließen, keine Wirkung in der etablierten Atherosklerose (81).

Basierend auf den Befunden der vorliegenden Arbeit zur atheroprotektiven Rolle des Cholesterinexports aus Makrophagen ergibt sich mit Blick auf die klinische Translation die Perspektive, zum einen die ABC-Transporter selbst, zum anderen die den ABC-Transportern nachgeschalteten extrazellulären Cholesterinakzeptoren hochzuregulieren, z.B. das Lipoprotein HDL.

In Hinblick auf die erste Variante bieten sich die *Liver-X*-Rezeptoren mit ihren atheroprotektiven Eigenschaften als potenzielle therapeutische Targets an. Somit wurden synthetische LXR-Agonisten bereits eingesetzt (20), wie beispielsweise T0901317, der an LXR α und LXR β mit gleicher Affinität aktivierend bindet. So konnte der Einsatz von LXR-Agonisten nicht nur die Entstehung von atherosklerotischen Plaques reduzieren, sondern auch die Größe von etablierten atherosklerotischen Läsionen in LDLR^{-/-}-Mäusen um 60% verringern (82). Desweiteren bewirkten die LXR-Agonisten in dieser Studie eine positive Veränderung der Plaquebiologie und -morphologie. Sie stabilisierten die Plaque und

reduzierten das Rupturrisiko, indem der Makrophagengehalt in der Läsion reduziert wurde und der Kollagengehalt der fibrösen Kappe stieg. Darüber hinaus induzierten LXR-Agonisten die Expression von ABCA1- und ABCG1-Transportern in den Makrophagen. Der therapeutische Einsatz beim Menschen ist jedoch derzeit noch eingeschränkt, da T0901317 in Nagetieren die hepatische Lipogenese stimuliert und zu einer Hypertriglyceridämie mit Steatohepatitis führt (35,68,83).

Die enge Verknüpfung des Zusammenspiels von Cholesterinauswärtstransport, *Liver-X-Rezeptor* (LXR) und inflammatorischen Signalwegen und deren potentielle therapeutischen Angriffspunkte verdeutlicht eine Studie von *Zimmer et al.* (84). Die Autoren behandelten atherosklerotische ApoE^{-/-}-Mäuse mit dem Lipidcarrier Cyclodextrin, der den reversen Cholesterintransport sowie den intrazellulären Metabolismus von freiem Cholesterin durch die Verhinderung der Cholesterinkristallbildung fördert. Durch vermehrte Bildung des endogenen LXR-Aktivators 27-Hydroxycholesterin scheinen diese Effekte *Liver-X-Rezeptor* vermittelt zu sein. Es resultierte eine vermehrte Expression von LXR-Zielgenen wie den ABC-Transportern ABCA1 und ABCG1 sowie des Inflammasom-Inhibitors HSP90AA1, was wiederum in einer verminderten Expression des NLRP3-Inflammasoms resultierte (84). Behandlungen von humanen Plaques aus Carotis-Endarteriektomien mit Cyclodextrin resultierten in einem verringerten Cholesteringehalt und in einer Hochregulation antiinflammatorischer sowie anti-atherogener Gene. Somit erscheint Cyclodextrin, bereits als Trägersubstanz für lipophile Medikamente im klinischen Gebrauch, als potentielles und dabei gut verträgliches Agens für die Behandlung der Atherosklerose (84).

Die Befunde der vorliegenden Arbeit sind darüber hinaus mit Blick auf die Interaktion des über ABC exportierten Cholesterins mit extrazellulärem HDL zu interpretieren. In den durchgeführten Experimenten war HDL insofern involviert, als dass wir *in vitro* zeigen konnten, dass HDL als extrazellulärer Cholesterinakzeptor die Schaumzellentstehung von Makrophagen *in vitro* verhindern konnte. Auch *Fotakis et al.* zeigten, dass Infusionen von rekonstituiertem HDL in atherosklerotische ApoE^{-/-}-Mäuse die inflammatorische Genexpression in myeloiden Zellen aus atherosklerotischen Plaques reduzierten (85). Entscheidend für den Effekt von HDL auf die Genexpression war der Zustand der intrazellulären Cholesterinbeladung von Makrophagen. Die ABC-vermittelten Effekte von HDL ergänzen damit die bereits bekannten atheroprotektiven Eigenschaften von HDL, darunter

antiinflammatorische, antioxidative, antithrombotische sowie vasodilatierende Eigenschaften (72,86,87).

Deshalb erscheint die exogene Zufuhr von HDL als potentieller therapeutischer Ansatz, um über eine Modulation der intrazellulären Cholesterinhomöostase antiinflammatorische und damit atheroprotektive Effekte zu vermitteln.

Im klinischen Kontext zeigten epidemiologische Daten, dass Plasma-HDL-Spiegel invers korreliert sind mit der Inzidenz von Herzinfarkt und Schlaganfall (88). So wurde der Einsatz von HDL- oder apoA1-Infusionen bereits in klinischen Studien erprobt (89). In einer klinischen Studie aus dem Jahr 2007 konnten durch Infusionen von rekonstituiertem HDL bei Patienten mit koronarer Atherosklerose signifikante Verbesserungen in der mittels intravaskulären Ultraschalles (IVUS) detektierten Plaquecharakterisierung (u.a. Anteile von fibrotischen versus kalzifizierten Plaques) verzeichnet werden (90). In einer anderen Studie konnte jedoch kein Rückgang der Koronarsklerose erzielt werden (91). Auch ein spezifischerer, in den HDL-Metabolismus eingreifender Therapieansatz wurde bereits versucht. Der Cholesterin-Ester-Transfer-Protein (CETP)-Inhibitor Torcetrapib, der durch Hemmung des Cholesterin-Ester-Transfer-Proteins die Umwandlung von HDL zu VLDL verhindert und damit die HDL-Spiegel erhöht, konnte allerdings im Rahmen der ILLUMINATE-Studie aus dem Jahr 2006 keine Erfolge erzielen. Im Gegenteil stieg das kardiovaskuläre Risiko durch eine Erhöhung des arteriellen Blutdrucks bei sekundärem Hyperaldosteronismus als unerwünschte Nebenwirkung sogar an (30,92). Dennoch bleibt HDL mit seinen atheroprotektiven Effekten ein wichtiger Forschungsgegenstand als potenzielles Agens für die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen.

Neben der lokalen Interferenz mit dem Cholesterinexport stellt aber auch die systemische Senkung von Cholesterinspiegeln ein potentieller Ansatz dar. Anhand der weitgehend bereits in die klinische Praxis eingeführten Statine konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die systemische Cholesterinsenkung durch orale Gabe von Atorvastatin bei atherosklerotischen Mäusen die Makrophagenproliferation hemmt und damit zur Plaquerückbildung führt, ohne dass sich Atorvastatin unmittelbar in atherosklerotischen Plaques anreichert und es sich damit nicht nur um einen direkten, lokalen pharmakologischen Effekt handeln könnte (74). Hierbei korrelierten Serum-LDL-Spiegel proportional mit der lokalen Makrophagenproliferationsrate in der atherosklerotischen Plaque: je niedriger die

Serum-LDL-Spiegel, desto niedriger war die lokale Proliferationsrate der Makrophagen. Darüber hinaus verwendeten wir in der Studie einen gemischten Chimäransatz analog zu dieser Promotionsarbeit mit einer Defizienz der Scavenger-Rezeptoren CD36 und Msr1, die – im Unterschied zu den ABC-Transportern in dieser Promotionsarbeit – die Aufnahme und nicht die Abgabe von Cholesterin-haltigen Lipoproteinen vermitteln (Abb. 22). Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass eine Hemmung der Aufnahme cholesterinreicher Lipoproteine lokale Proliferation hemmt und die Hemmung der Abgabe von intrazellulärem Cholesterin über ABCA1 und ABCG1 die lokale Proliferation steigert.

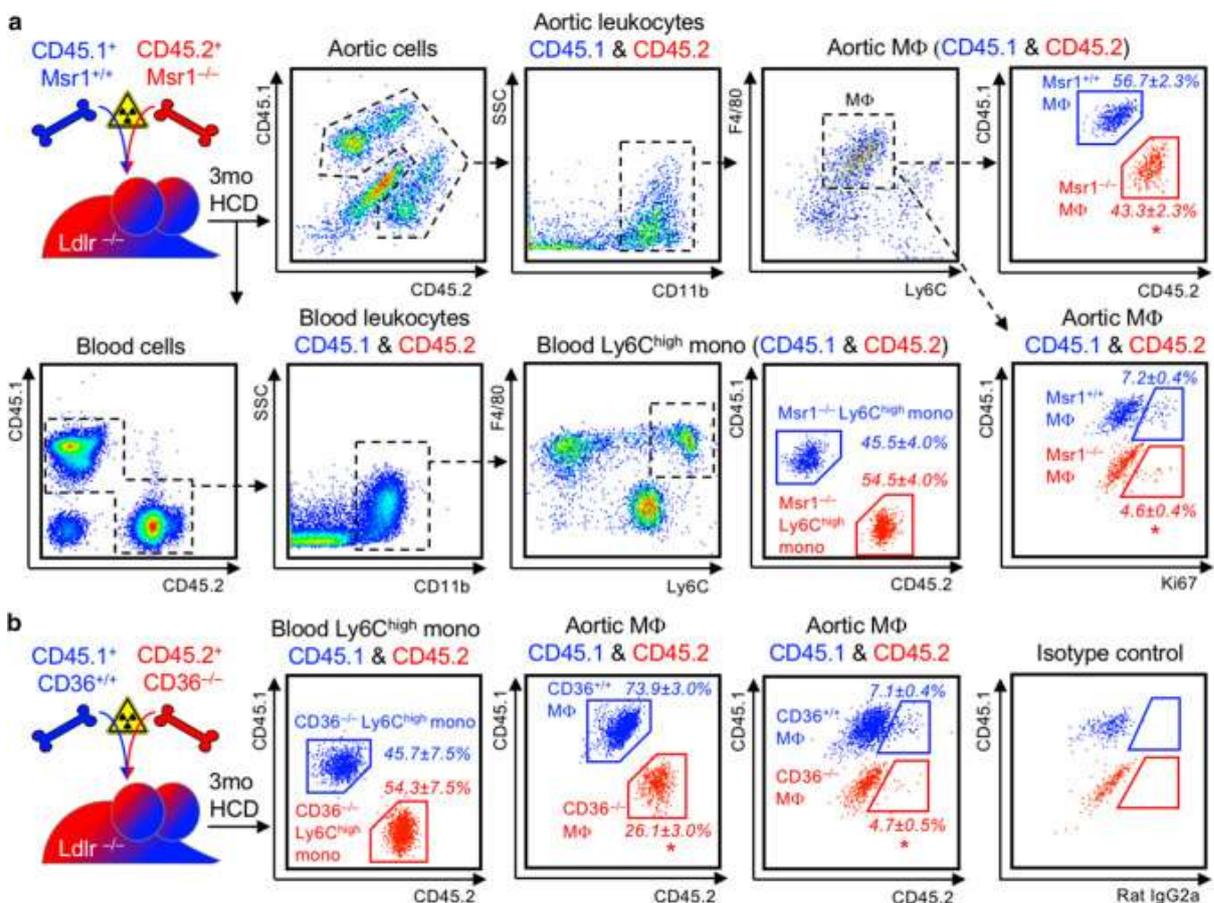


Abb. 22 Die Aufnahme cholesterinreicher LDL-Partikel über die Scavenger-Rezeptoren Msr1 und CD36 fördert die Proliferation von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques (74)

a.+b. LDLR^{-/-} Mäuse wurden nach Bestrahlung mit einer 50:50% Mischung aus CD45.1⁺ Wildtyp- sowie CD45.2⁺ Scavenger-Rezeptor-defizienten (Msr1 bzw. CD36) Knochenmarkszellen rekonstituiert. Analog zu dieser Promotionsarbeit wurde nach dreimonatiger proatherogener Diät die Verteilung des Chimärismus von Scavenger-Rezeptor-kompetenten und Scavenger-Rezeptor-defizienten Ly6C^{hi} Monozyten (mono) - bzw. Makrophagenpopulationen (MΦ) im Blut und in der Aorta durchflusszytometrisch analysiert. Der Anteil proliferierender Zellen wurde anhand von Ki67-Expression in Scavenger-Rezeptor-kompetenten sowie -defizienten Makrophagen gemessen. Ergebnisse sind angegeben als prozentualer Mittelwert ± SEM im Chimärismus bzw. des Ki67⁺-Anteils, n=4 pro Gruppe, *p<0,05.

Den Ansatz einer direkten Gewebeanreicherung von Statinen wiederum verfolgten *Tang et al.*, die mit Simvastatin beladene HDL-Nanopartikel (S-HDL) verwendeten, die spezifisch von Plaquemakrophagen aufgenommen wurden und über die Hemmung des Mevalonat-Signalweges die direkte Inhibition der Makrophagenproliferation und Reduktion der Plaqueinflammation in der etablierten Atherosklerose bewirkten (93) (Abb. 23). Hier sei jedoch hervorzuheben, dass in dieser Arbeit keine systemische Cholesterinsenkung erzielt wurde.

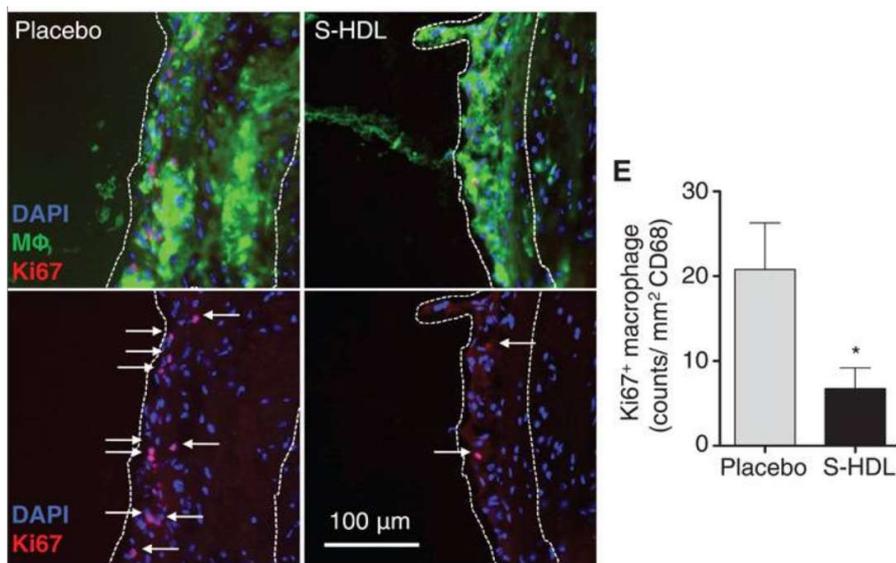


Abb. 23

S-HDL inhibiert die Makrophagenproliferation (93)

Die Abbildung links zeigt histologische Schnitte von Aortenwurzeln von der Placebo-Gruppe und der Gruppe, die mit S-HDL (mit Simvastatin beladene HDL-Partikel) behandelt wurde. Proliferierende Makrophagen wurden als dreifach-positiv für den Makrophagen-Marker CD 68 (grün), den Proliferationsmarker Ki67 (rot) sowie den Zellkern-Marker 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blau) identifiziert. Die rechte Abbildung zeigt die Quantifizierung Ki67+ proliferierender Makrophagen in den Placebo-Aortenwurzeln und den S-HDL-behandelten Aortenwurzeln. Die Behandlung mit S-HDL reduzierte die Makrophagenproliferation um 67%. (Die Placebo-Gruppe hatte durchschnittlich $5,5 \pm 3,0$ proliferierende Makrophagen pro Schnitt, die S-HDL-Gruppe $0,7 \pm 0,5$ pro Schnitt.)

Eine weitere Variante der auf eine Hemmung der Makrophagenproliferation abzielenden Therapie atherosklerotischer Läsionen sind cholesterinreiche Nanopartikel, die mit dem antiproliferativen Zytostatikum Paclitaxel gekoppelt werden und sich nach intravenöser Injektion in atherosklerotischen Läsionen und neoplastischen Geweben konzentrieren. In einer experimentellen Studie bei Kaninchen konnte mit Paclitaxel-gekoppelten Nanopartikeln eine Inhibition der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, eine Reduktion des Makrophagengehalts der Läsionen und eine 60%ige Verkleinerung der atherosklerotischen Plaques

erzielt werden (94). *Shiozaki et al.* führten basierend auf diesen Erkenntnissen eine kleine klinische Pilotstudie durch (95). Sie untersuchten den Effekt einer intravenösen Gabe von Paclitaxel-beladenen Nanopartikeln bei Patienten mit schwerer aortaler Atherosklerose. Bei der Hälfte der Interventionsgruppe konnte mittels CT-Angiographie eine Reduktion der mittleren Läsionsgröße in der Aorta detektiert werden, während in der Kontrollgruppe die Läsionsgröße unverändert blieb und in einem Fall sogar zunahm (95).

Zusammenfassend ergeben sich aus dem in dieser Promotionsarbeit gezeigten Effekt der ABC- und LXR-gesteuerten Proliferation und Apoptose von Makrophagen durch Regulation der intrazellulären Cholesterinhomöostase wichtige neue Perspektiven für die gezielte therapeutische Intervention im Stadium der fortgeschrittenen Atherosklerose.

6. Zusammenfassung

In dieser Promotionsarbeit wurde die pathophysiologische Funktion des Cholesterinauswärtstransportes über die ABC-Transporter ABCA1 und ABCG1 sowie über die *Liver-X*-Rezeptoren als Transkriptionsfaktor der ABC-Transporter in Plaquemakrophagen in Bezug auf die Regulation inflammatorischer Signalwege zum Zeitpunkt der frühen und fortgeschrittenen Atherosklerose untersucht.

1. Eine Defizienz der ABCA1- und ABCG1-Transporter in Plaquemakrophagen führt *in vitro* zu einem erhöhten intrazellulären Cholesteringehalt. Der ABC-vermittelte Cholesterinexport an HDL kompensiert demnach die Schaumzelltransformation von Makrophagen.
2. Eine Doppeldefizienz für ABCA1 und ABCG1 in Plaquemakrophagen hat bei tendenziell vermehrter pro-inflammatorischer Zytokinexpression von TNF α ansonsten keine statistisch signifikante Auswirkung auf deren pro- und antiinflammatorisches Zytokinprofil.
3. Eine pathologisch erhöhte intrazelluläre Cholesterinansammlung bei ABC- und LXR-Defizienz führt in der fortgeschrittenen Atherosklerose zu einer verstärkten Proliferation und in noch stärkerem Ausmaß zu einer vermehrten Apoptose. Dies unterstreicht die physiologische Bedeutung der Cholesterinexporter bei der Regulation des zellulären Cholesterinhaushalts. Der Cholesterinexport hat keinen Einfluss auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten von Plaquemakrophagen zum Zeitpunkt der frühen Atherosklerose. Damit stellt der ABC-abhängige Cholesterinexport einen atheroprotektiven Mechanismus im fortgeschrittenen Atherosklerosestadium dar, indem es lokale Makrophagenproliferation und -apoptose als Haupttreiber für den inflammatorischen Läsionsprogress mildert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Cholesterinexporter ABCA1 und ABCG1 sowie die *Liver-X*-Rezeptoren als deren Transkriptionsfaktoren Schlüsselfunktionen in Bezug auf die Proliferation und die Apoptose von Makrophagen übernehmen. Damit stellt die intrazelluläre Lipidhomöostase von Makrophagen ein potentiell therapeutisches Target in der etablierten Atherosklerose dar.

7. Literaturverzeichnis

1. Cochain, C., Zerneck, A. Macrophages and immune cells in atherosclerosis: recent advances and novel concepts. *Basic Res Cardiol*, 2015 110(4): 34
2. Hansson, G. K., Libby, P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 2006 6(7): 508–519
3. Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., AlMazroa, M. A., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., Andrews, K. G., Atkinson, C., Baddour, L. M., Barker-Collo, S., Bartels, D. H., Bell, M. L., Benjamin, E. J., Bennett, D., Bhalla, K., Bikbov, B., Abdulhak, A. B., Birbeck, G., Blyth, F., Bolliger, I., Boufous, S., Bucello, C., Burch, M., Burney, P., Carapetis, J., Chen, H., Chou, D., Chugh, S. S., Coffeng, L. E., Colan, S. D., Colquhoun, S., Colson, K. E., Condon, J., Connor, M. D., Cooper, L. T., Corriere, M., Cortinovis, M., Vaccaro, K. C. de, Couser, W., Cowie, B. C., Criqui, M. H., Cross, M., Dabhadkar, K. C., Dahodwala, N., Leo, D. de, Degenhardt, L., Delossantos, A., Denenberg, J., Des Jarlais, D. C., Dharmaratne, S. D., Dorsey, E. R., Driscoll, T., Duber, H., Ebel, B., Erwin, P. J., Espindola, P., Ezzati, M., Feigin, V., Flaxman, A. D., Forouzanfar, M. H., Fowkes, F. G. R., Franklin, R., Fransen, M., Freeman, M. K., Gabriel, S. E., Gakidou, E., Gaspari, F., Gillum, R. F., Gonzalez-Medina, D., Halasa, Y. A., Haring, D., Harrison, J. E., Havmoeller, R., Hay, R. J., Hoen, B., Hotez, P. J., Hoy, D., Jacobsen, K. H., James, S. L., Jasrasaria, R., Jayaraman, S., Johns, N., Karthikeyan, G., Kassebaum, N., Keren, A., Khoo, J.-P., Knowlton, L. M., Kobusingye, O., Koranteng, A., Krishnamurthi, R., Lipnick, M., Lipshultz, S. E., Ohno, S. L., Mabweijano, J., MacIntyre, M. F., Mallinger, L., March, L., Marks, G. B., Marks, R., Matsumori, A., Matzopoulos, R., Mayosi, B. M., McAnulty, J. H., McDermott, M. M., McGrath, J., Memish, Z. A., Mensah, G. A., Merriman, T. R., Michaud, C., Miller, M., Miller, T. R., Mock, C., Mocumbi, A. O., Mokdad, A. A., Moran, A., Mulholland, K., Nair, M. N., Naldi, L., Narayan, K. M. V., Nasser, K., Norman, P., O'Donnell, M., Omer, S. B., Ortblad, K., Osborne, R., Ozgediz, D., Pahari, B., Pandian, J. D., Rivero, A. P., Padilla, R. P., Perez-Ruiz, F., Perico, N., Phillips, D., Pierce, K., Pope, C. A., Porrini, E., Pourmalek, F., Raju, M., Ranganathan, D., Rehm, J. T., Rein, D. B., Remuzzi, G., Rivara, F. P., Roberts, T., León, F. R. de, Rosenfeld, L. C., Rushton, L., Sacco, R. L., Salomon, J. A., Sampson, U., Sanman, E., Schwebel, D. C., Segui-Gomez, M., Shepard, D. S., Singh, D., Singleton, J., Sliwa, K., Smith, E., Steer, A., Taylor, J. A., Thomas, B., Tleyjeh, I. M., Towbin, J. A., Truelsen, T., Undurraga, E. A., Venketasubramanian, N., Vijayakumar, L., Vos, T., Wagner, G. R., Wang, M., Wang, W., Watt, K., Weinstock, M. A., Weintraub, R., Wilkinson, J. D., Woolf, A. D., Wulf, S., Yeh, P.-H., Yip, P., Zabetian, A., Zheng, Z.-J., Lopez, A. D., Murray, C. J. L. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 2012 380(9859): 2095–2128
4. Lüscher, A. J. Atherosclerosis. *Nature*, 2000 407(6801): 233–241
5. Barquera, S., Pedroza-Tobías, A., Medina, C., Hernández-Barrera, L., Bibbins-Domingo, K., Lozano, R., Moran, A. E. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Arch Med Res*, 2015 46(5): 328–338
6. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999 340(2): 115–126

7. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002 420(6917): 868–874
8. Hansson, G. K., Hermansson, A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*, 2011 12(3): 204–212
9. van der Wal, A. Atherosclerotic plaque rupture – pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovascular Research*, 1999 41(2): 334–344
10. Libby, P., Ridker, P. M., Hansson, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 2011 473(7347): 317–325
11. Swirski, F. K., Libby, P., Aikawa, E., Alcaide, P., Luscinskas, F. W., Weissleder, R., Pittet, M. J. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J. Clin. Invest.*, 2007 117(1): 195–205
12. Tacke, F., Alvarez, D., Kaplan, T. J., Jakubzick, C., Spanbroek, R., Llodra, J., Garin, A., Liu, J., Mack, M., van Rooijen, N., Lira, S. A., Habenicht, A. J., Randolph, G. J. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.*, 2007 117(1): 185–194
13. Robbins, C. S., Chudnovskiy, A., Rauch, P. J., Figueiredo, J.-L., Iwamoto, Y., Gorbатов, R., Etzrodt, M., Weber, G. F., Ueno, T., van Rooijen, N., Mulligan-Kehoe, M. J., Libby, P., Nahrendorf, M., Pittet, M. J., Weissleder, R., Swirski, F. K. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation*, 2012 125(2): 364–374
14. Yvan-Charvet, L., Pagler, T., Gautier, E. L., Avagyan, S., Siry, R. L., Han, S., Welch, C. L., Wang, N., Randolph, G. J., Snoeck, H. W., Tall, A. R. ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science*, 2010 328(5986): 1689–1693
15. Murphy, A. J., Akhtari, M., Tolani, S., Pagler, T., Bijl, N., Kuo, C.-L., Wang, M., Sanson, M., Abramowicz, S., Welch, C., Bochem, A. E., Kuivenhoven, J. A., Yvan-Charvet, L., Tall, A. R. ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J Clin Invest*, 2011 121(10): 4138–4149
16. Sunderkötter, C., Nikolic, T., Dillon, M. J., van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D. A., Leenen, P. J. M. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol*, 2004 172(7): 4410–4417
17. Geissmann, F., Jung, S., Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 2003 19(1): 71–82
18. Hilgendorf, I., Swirski, F. K., Robbins, C. S. Monocyte fate in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015 35(2): 272–279
19. Robbins, C. S., Swirski, F. K. The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cell Mol Life Sci*, 2010 67(16): 2685–2693
20. Moore, K. J., Sheedy, F. J., Fisher, E. A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol*, 2013 13(10): 709–721
21. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 2007 7(9): 678–689
22. Combadière, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., Merval, R., Proudfoot, A., Tedgui, A., Mallat, Z. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost

- abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*, 2008 117(13): 1649–1657
23. Swirski, F. K., Hilgendorf, I., Robbins, C. S. From proliferation to proliferation: monocyte lineage comes full circle. *Semin Immunopathol*, 2014 36(2): 137–148
 24. Moore, K. J., Tabas, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*, 2011 145(3): 341–355
 25. Colin, S., Chinetti-Gbaguidi, G., Staels, B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol Rev*, 2014 262(1): 153–166
 26. Kunjathoor, V. V., Febbraio, M., Podrez, E. A., Moore, K. J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J. S., Silverstein, R., Hoff, H. F., Freeman, M. W. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem*, 2002 277(51): 49982–49988
 27. Yancey, P. G., Bortnick, A. E., Kellner-Weibel, G., La Llera-Moya, M. de, Phillips, M. C., Rothblat, G. H. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003 23(5): 712–719
 28. Yvan-Charvet, L., Wang, N., Tall, A. R. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010 30(2): 139–143
 29. Wang, N., Tall, A. R. Regulation and mechanisms of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003 23(7): 1178–1184
 30. Tall, A. R., Yvan-Charvet, L., Terasaka, N., Pagler, T., Wang, N. HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab*, 2008 7(5): 365–375
 31. Oram, J. F., Vaughan, A. M. ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res*, 2006 99(10): 1031–1043
 32. Beis, K. Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochem Soc Trans*, 2015 43(5): 889–893
 33. Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Res.*, 2001 11(7): 1156–1166
 34. Shiffman, D., Mikita, T., Tai, J. T., Wade, D. P., Porter, J. G., Seilhamer, J. J., Somogyi, R., Liang, S., Lawn, R. M. Large scale gene expression analysis of cholesterol-loaded macrophages. *J Biol Chem*, 2000 275(48): 37324–37332
 35. Baranowski, M. Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol*, 2008 59 Suppl 7: 31–55
 36. Robbins, C. S., Hilgendorf, I., Weber, G. F., Theurl, I., Iwamoto, Y., Figueiredo, J.-L., Gorbатов, R., Sukhova, G. K., Gerhardt, L. M. S., Smyth, D., Zavitz, C. C. J., Shikatani, E. A., Parsons, M., van Rooijen, N., Lin, H. Y., Husain, M., Libby, P., Nahrendorf, M., Weissleder, R., Swirski, F. K. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med*, 2013 19(9): 1166–1172
 37. Kappus, M. S., Murphy, A. J., Abramowicz, S., Ntonga, V., Welch, C. L., Tall, A. R., Westerterp, M. Activation of liver X receptor decreases atherosclerosis in *Ldlr^{-/-}* mice in the absence of ATP-binding cassette transporters A1 and G1 in myeloid cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014 34(2): 279–284
 38. Westerterp, M., Murphy, A. J., Wang, M., Pagler, T. A., Vengrenyuk, Y., Kappus, M. S., Gorman, D. J., Nagareddy, P. R., Zhu, X., Abramowicz, S.,

- Parks, J. S., Welch, C., Fisher, E. A., Wang, N., Yvan-Charvet, L., Tall, A. R. Deficiency of ABCA1 and ABCG1 in Macrophages Increases Inflammation and Accelerates Atherosclerosis in Mice. *Circ Res*, 2013 112(11): 1456–1465
39. Westerterp, M., Fotakis, P., Ouimet, M., Bochem, A. E., Zhang, H., Molusky, M. M., Wang, W., Abramowicz, S., La Bastide-van Gemert, S., Wang, N., Welch, C. L., Reilly, M. P., Stroes, E. S., Moore, K. J., Tall, A. R. Cholesterol Efflux Pathways Suppress Inflammasome Activation, NETosis, and Atherogenesis. *Circulation*, 2018 138(9): 898–912
40. Aiello, R. J., Brees, D., Francone, O. L. ABCA1-deficient mice: insights into the role of monocyte lipid efflux in HDL formation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003 23(6): 972–980
41. Zadelaar, S., Kleemann, R., Verschuren, L., Vries-Van der Weij, J. de, van der Hoorn, J., Princen, H. M., Kooistra, T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007 27(8): 1706–1721
42. Paigen, B., Ishida, B. Y., Verstuyft, J., Winters, R. B., Albee, D. Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Arteriosclerosis*, 1990 10(2): 316–323
43. Paigen, B., Mitchell, D., Holmes, P. A., Albee, D. Genetic analysis of strains C57BL/6J and BALB/cJ for Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility in mice. *Biochem Genet*, 1987 25(11-12): 881–892
44. Whitman, S. C. A Practical Approach to Using Mice in Atherosclerosis Research. *Clin Biochem Rev*, 2004 25(1): 81–93
45. Getz, G. S., Reardon, C. A. Do the Apoe^{-/-} and Ldlr^{-/-} Mice Yield the Same Insight on Atherogenesis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016 36(9): 1734–1741
46. Lee, Y. T., Lin, H. Y., Chan, Y. W. F., Li, K. H. C., To, O. T. L., Yan, B. P., Liu, T., Li, G., Wong, W. T., Keung, W., Tse, G. Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances. *Lipids Health Dis*, 2017 16
47. Herijgers, N., van Eck, M., Groot, P. H., Hoogerbrugge, P. M., van Berkel, T. J. Effect of bone marrow transplantation on lipoprotein metabolism and atherosclerosis in LDL receptor-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997 17(10): 1995–2003
48. Paigen, B., Holmes, P. A., Mitchell, D., Albee, D. Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H. *Atherosclerosis*, 1987 64(2-3): 215–221
49. Chan, C. T., Fenn, A. M., Harder, N. K., Mindur, J. E., McAlpine, C. S., Patel, J., Valet, C., Rattik, S., Iwamoto, Y., He, S., Anzai, A., Kahles, F., Poller, W. C., Janssen, H., Wong, L. P., Fernandez-Hernando, C., Koolbergen, D. R., van der Laan, Anja M., Yvan-Charvet, L., Sadreyev, R. I., Nahrendorf, M., Westerterp, M., Tall, A. R., Gustafsson, J.-Å., Swirski, F. K. Liver X receptors are required for thymic resilience and T cell output. *J Exp Med*, 2020 217(10)
50. Alberti, S., Schuster, G., Parini, P., Feltkamp, D., Diczfalusy, U., Rudling, M., Angelin, B., Björkhem, I., Pettersson, S., Gustafsson, J.-Å. Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXR β -deficient mice. *J Clin Invest*, 2001 107(5): 565–573
51. Miao, Y., Wu, W., Dai, Y., Maneix, L., Huang, B., Warner, M., Gustafsson, J.-Å. Liver X receptor β controls thyroid hormone feedback in the brain and regulates

- browning of subcutaneous white adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015 112(45): 14006–14011
52. Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., Förster, I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Research*, 1999 8(4): 265–277
 53. Getz, G. S., Reardon, C. A. Diet and murine atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006 26(2): 242–249
 54. Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2017 37(2): 163–176
 55. Maciorowski, Z., Chattopadhyay, P. K., Jain, P. Basic Multicolor Flow Cytometry. *Curr Protoc Immunol*, 2017 117: 5.4.1-5.4.38
 56. Thomas Scholzen, J. G. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182, 2000: 311–322
 57. Zimmermann, K. C., Bonzon, C., Green, D. R. The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics*, 2001 92(1): 57–70
 58. Timmins, J. M., Lee, J.-Y., Boudyguina, E., Kluckman, K. D., Brunham, L. R., Mulya, A., Gebre, A. K., Coutinho, J. M., Colvin, P. L., Smith, T. L., Hayden, M. R., Maeda, N., Parks, J. S. Targeted inactivation of hepatic *Abca1* causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J. Clin. Invest.*, 2005 115(5): 1333–1342
 59. Gavini, K., Parameshwaran, K. Western Blot (Protein Immunoblot) [Internet]. 2019 [zitiert 19.08.2019]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542290/>
 60. Sankaranarayanan, S., Kellner-Weibel, G., La Llera-Moya, M. de, Phillips, M. C., Asztalos, B. F., Bittman, R., Rothblat, G. H. A sensitive assay for ABCA1-mediated cholesterol efflux using BODIPY-cholesterol. *J Lipid Res*, 2011 52(12): 2332–2340
 61. Li, Z., Mintzer, E., Bittman, R. First synthesis of free cholesterol-BODIPY conjugates. *J Org Chem*, 2006 71(4): 1718–1721
 62. Zidovetzki, R., Levitan, I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta*, 2007 1768(6): 1311–1324
 63. Leppimäki, P., Mattinen, J., Slotte, J. P. Sterol-induced upregulation of phosphatidylcholine synthesis in cultured fibroblasts is affected by the double-bond position in the sterol tetracyclic ring structure. *Eur J Biochem*, 2000 267(21): 6385–6394
 64. Maxfield, F. R., Wüstner, D. Analysis of cholesterol trafficking with fluorescent probes. *Methods Cell Biol*, 2012 108: 367–393
 65. Kubista, M., Akerman, B., Nordén, B. Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry*, 1987 26(14): 4545–4553
 66. Manzini, G., Barcellona, M. L., Avitabile, M., Quadrioglio, F. Interaction of diamidino-2-phenylindole (DAPI) with natural and synthetic nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 1983 11(24): 8861–8876
 67. Westerterp, M., Tsuchiya, K., Tattersall, I. W., Fotakis, P., Bochem, A. E., Molusky, M. M., Ntonga, V., Abramowicz, S., Parks, J. S., Welch, C. L., Kitajewski, J., Accili, D., Tall, A. R. Deficiency of ATP-Binding Cassette

- Transporters A1 and G1 in Endothelial Cells Accelerates Atherosclerosis in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016 36(7): 1328–1337
68. Wójcicka, G., Jamroz-Wiśniewska, A., Horoszewicz, K., Bełtowski, J. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej*, 2007 61: 736–759
69. Tabas, I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005 25(11): 2255–2264
70. Bełtowski, J. Liver X receptors (LXR) as therapeutic targets in dyslipidemia. *Cardiovasc Ther*, 2008 26(4): 297–316
71. Dou, F., Chen, J., Cao, H., Jia, Q., Shen, D., Liu, T., Chen, C. Anti-atherosclerotic effects of LXR α agonist through induced conversion of M1 macrophage to M2. *Am J Transl Res*, 2019 11(6): 3825–3840
72. Yvan-Charvet, L., Ranalletta, M., Wang, N., Han, S., Terasaka, N., Li, R., Welch, C., Tall, A. R. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J. Clin. Invest.*, 2007 117(12): 3900–3908
73. Yvan-Charvet, L., Welch, C., Pagler, T. A., Ranalletta, M., Lamkanfi, M., Han, S., Ishibashi, M., Li, R., Wang, N., Tall, A. R. Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. *Circulation*, 2008 118(18): 1837–1847
74. Härdtner, C., Kornemann, J., Krebs, K., Ehlert, C. A., Jander, A., Zou, J., Starz, C., Rauterberg, S., Sharipova, D., Dufner, B., Hoppe, N., Dederichs, T.-S., Willecke, F., Stachon, P., Heidt, T., Wolf, D., zur Mühlen, C. von, Madl, J., Kohl, P., Kaeser, R., Boettler, T., Pieterman, E. J., Princen, H. M. G., Ho-Tin-Noé, B., Swirski, F. K., Robbins, C. S., Bode, C., Zirlik, A., Hilgendorf, I. Inhibition of macrophage proliferation dominates plaque regression in response to cholesterol lowering. *Basic Res Cardiol*, 2020 115(6)
75. Feng, B., Yao, P. M., Li, Y., Devlin, C. M., Zhang, D., Harding, H. P., Sweeney, M., Rong, J. X., Kuriakose, G., Fisher, E. A., Marks, A. R., Ron, D., Tabas, I. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol*, 2003 5(9): 781–792
76. Gautier, E. L., Huby, T., Witztum, J. L., Ouzilleau, B., Miller, E. R., Saint-Charles, F., Aucouturier, P., Chapman, M. J., Lesnik, P. Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage. *Circulation*, 2009 119(13): 1795–1804
77. Duwell, P., Kono, H., Rayner, K. J., Sirois, C. M., Vladimer, G., Bauernfeind, F. G., Abela, G. S., Franchi, L., Nuñez, G., Schnurr, M., Espevik, T., Lien, E., Fitzgerald, K. A., Rock, K. L., Moore, K. J., Wright, S. D., Hornung, V., Latz, E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, 2010 464(7293): 1357–1361
78. Baldridge, M., Mallat, Z., Li, X. NLRP3 inflammasome pathways in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2017 267: 127–138
79. Hendrikx, T., Jeurissen, M. L. J., van Gorp, P. J., Gijbels, M. J., Walenbergh, S. M. A., Houben, T., van Gorp, R., Pöttgens, C. C., Stienstra, R., Netea, M. G., Hofker, M. H., Donners, M. M. P. C., Shiri-Sverdlov, R. Bone marrow-specific

- caspase-1/11 deficiency inhibits atherosclerosis development in Ldlr(-/-) mice. *FEBS J*, 2015 282(12): 2327–2338
80. Thacker, S. G., Zarzour, A., Chen, Y., Alcicek, M. S., Freeman, L. A., Sviridov, D. O., Demosky, S. J., Remaley, A. T. High-density lipoprotein reduces inflammation from cholesterol crystals by inhibiting inflammasome activation. *Immunology*, 2016 149(3): 306–319
 81. Lindau, A., Härdtner, C., Hergeth, S. P., Blanz, K. D., Dufner, B., Hoppe, N., Anto-Michel, N., Kornemann, J., Zou, J., Gerhardt, L. M. S., Heidt, T., Willecke, F., Geis, S., Stachon, P., Wolf, D., Libby, P., Swirski, F. K., Robbins, C. S., McPheat, W., Hawley, S., Braddock, M., Gilsbach, R., Hein, L., zur Mühlen, C. von, Bode, C., Zirlik, A., Hilgendorf, I. Atheroprotection through SYK inhibition fails in established disease when local macrophage proliferation dominates lesion progression. *Basic Res Cardiol*, 2016 111(2): 20
 82. Levin, N., Bischoff, E. D., Daige, C. L., Thomas, D., Vu, C. T., Heyman, R. A., Tangirala, R. K., Schulman, I. G. Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005 25(1): 135–142
 83. Jamroz-Wiśniewska, A., Wójcicka, G., Horoszewicz, K., Bełtowski, J. Liver X receptors (LXRs). Part II: non-lipid effects, role in pathology, and therapeutic implications. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2007 61: 760–785
 84. Zimmer, S., Grebe, A., Bakke, S. S., Bode, N., Halvorsen, B., Ulas, T., Skjelland, M., Nardo, D. de, Labzin, L. I., Kerksiek, A., Hempel, C., Heneka, M. T., Hawxhurst, V., Fitzgerald, M. L., Trebicka, J., Björkhem, I., Gustafsson, J.-Å., Westerterp, M., Tall, A. R., Wright, S. D., Espevik, T., Schultze, J. L., Nickenig, G., Lütjohann, D., Latz, E. Cyclodextrin promotes atherosclerosis regression via macrophage reprogramming. *Sci Transl Med*, 2016 8(333): 333ra50
 85. Fotakis, P., Kothari, V., Thomas, D. G., Westerterp, M., Molusky, M. M., Altin, E., Abramowicz, S., Wang, N., He, Y., Heinecke, J. W., Bornfeldt, K. E., Tall, A. R. Anti-Inflammatory Effects of HDL (High-Density Lipoprotein) in Macrophages Predominate Over Proinflammatory Effects in Atherosclerotic Plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019 39(12): e253-e272
 86. Kontush, A., Chapman, M. J. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev*, 2006 58(3): 342–374
 87. Plump, A. S., Scott, C. J., Breslow, J. L. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994 91(20): 9607–9611
 88. Gordon, D. J., Rifkind, B. M. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med*, 1989 321(19): 1311–1316
 89. Cuchel, M., Rader, D. J. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation*, 2006 113(21): 2548–2555
 90. Tardif, J.-C., Grégoire, J., L'Allier, P. L., Ibrahim, R., Lespérance, J., Heinonen, T. M., Kouz, S., Berry, C., Basser, R., Lavoie, M.-A., Guertin, M.-C., Rodés-Cabau, J. Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2007 297(15): 1675–1682
 91. Tardif, J.-C., Ballantyne, C. M., Barter, P., Dasseux, J.-L., Fayad, Z. A., Guertin, M.-C., Kastelein, J. J. P., Keyserling, C., Klepp, H., Koenig, W., L'Allier, P. L.,

- Lespérance, J., Lüscher, T. F., Paolini, J. F., Tawakol, A., Waters, D. D. Effects of the high-density lipoprotein mimetic agent CER-001 on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized trial. *Eur Heart J*, 2014 35(46): 3277–3286
92. Barter, P. J., Caulfield, M., Eriksson, M., Grundy, S. M., Kastelein, J. J. P., Komajda, M., Lopez-Sendon, J., Mosca, L., Tardif, J.-C., Waters, D. D., Shear, C. L., Revkin, J. H., Buhr, K. A., Fisher, M. R., Tall, A. R., Brewer, B. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*, 2007 357(21): 2109–2122
93. Tang, J., Lobatto, M. E., Hassing, L., van der Staay, S., van Rijs, S. M., Calcagno, C., Braza, M. S., Baxter, S., Fay, F., Sanchez-Gaytan, B. L., Duivenvoorden, R., Sager, H., Astudillo, Y. M., Leong, W., Ramachandran, S., Storm, G., Pérez-Medina, C., Reiner, T., Cormode, D. P., Strijkers, G. J., Stroes, E. S. G., Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Fisher, E. A., Fayad, Z. A., Mulder, W. J. M. Inhibiting macrophage proliferation suppresses atherosclerotic plaque inflammation. *Sci Adv*, 2015 1(3)
94. Maranhão, R. C., Tavares, E. R., Padoveze, A. F., Valduga, C. J., Rodrigues, D. G., Pereira, M. D. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. *Atherosclerosis*, 2008 197(2): 959–966
95. Shiozaki, A. A., Senra, T., Morikawa, A. T., Deus, D. F., Filho-Paladino, A. T., Im Pinto, Maranhão, R. C. Treatment of patients with aortic atherosclerotic disease with paclitaxel-associated lipid nanoparticles. *Clinics*, 2016 71(8): 435–439

8. Förderung

Die Promotionsarbeit wurde gefördert durch das Otto-Hess-Promotionsstipendium der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie.

9. Publikationen und Auszeichnungen

1. Härdtner C, Kornemann J, Krebs K, Ehlert CA, **Jander A**, Zou J, Starz C, Rauterberg S, Sharipova D, Dufner B, Hoppe N, Dederichs TS, Willecke F, Stachon P, Heidt T, Wolf D, von Zur Mühlen C, Madl J, Kohl P, Kaeser R, Boettler T, Pieterman EJ, Princen HMG, Ho-Tin-Noé B, Swirski FK, Robbins CS, Bode C, Zirlik A, Hilgendorf I. Inhibition of macrophage proliferation dominates plaque regression in response to cholesterol lowering. *Basic Res Cardiol.* 2020;115:78
2. Die Promotionsarbeit wurde bei der Posterpreissitzung bei den Herztagen der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie im Jahr 2018 im Rahmen des Otto-Hess-Promotionsstipendiums vorgestellt und mit dem 1.Preis ausgezeichnet.
3. Teile der Promotionsarbeit wurden außerdem beim abteilungsinternen Workshop der Klinik für Kardiologie und Angiologie der Universitätsklinik Freiburg im Jahr 2016 als Poster präsentiert und als bestes Poster ausgezeichnet.

10. Lebenslauf

Die Seite 80 enthält persönliche Daten. Sie ist nicht Bestandteil der Veröffentlichung.

Die Seite 81 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie ist nicht Bestandteil der Veröffentlichung.

Die Seite 82 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie ist nicht Bestandteil der Veröffentlichung.

11. Eidesstattliche Versicherung

gemäß § 8 Absatz 1 Nr. 3 der Promotionsordnung der Universität Freiburg für die Medizinische Fakultät

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema „Der Einfluss des Cholesterinexports über die ABC-Transporter auf das Makrophagenverhalten in der atherosklerotischen Plaque“ handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
3. Die Ordnung der Albert-Ludwigs-Universität zur Sicherung der Redlichkeit der Wissenschaft habe ich zur Kenntnis genommen und akzeptiert.
4. Die Dissertation oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
5. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
6. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Hamburg, den 11.03.2022

Ort, Datum



Alina Jander

12. Erklärung zum Eigenanteil

Die Studie wurde von meinem Doktorvater PD Dr.med. Ingo Hilgendorf konzipiert. PD Dr. med. Ingo Hilgendorf und Frau Dr. rer. nat. Carmen Härdtner haben mich in die verschiedenen Methoden eingewiesen und fortwährend betreut.

Die Versuchstiere wurden von Jackson Laboratory käuflich erworben. Die Zucht, Verpaarung und Haltung fand in Tierställen der Universitätsklinik Freiburg mit Unterstützung der Mitarbeiter statt.

Folgende Methoden habe ich nach Unterweisung von Herrn PD Dr. med. Ingo Hilgendorf und Frau Dr. rer. nat. Carmen Härdtner durchgeführt: Präparation der isolierten Organe, Zellisolierung, Antikörperfärbung für Durchflusszytometrie und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung, RNA-Isolation, cDNA-Transkription und Quantifizierung mittels *real time* Polymerasekettenreaktion, Proteinisolation, Bradford Assay und Proteinexpressionsanalyse mittels Western Blot. Methodische Etablierung und Durchführung der *in vitro* BODIPY-Cholesterinstimulation von Makrophagen-Zellkulturen, Fluorometermessung und die Färbung der Kammerobjektträger für die Fluoreszenzmikroskopie.

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde von Frau Natalie Hoppe (B. Sc.) durchgeführt.

Die retroorbitale Blutentnahme sowie die Organpräparation aus den Versuchstieren führten PD Dr. med. Ingo Hilgendorf, Dr. rer. nat. Carmen Härdtner sowie Bianca Dufner (Chemielaborantin) durch.

Hinsichtlich der Publikation "*Inhibition of macrophage proliferation dominates plaque regression in response to cholesterol lowering*" (*Basic Research in Cardiology*):

Zu der Publikation habe ich folgenden Beitrag geleistet: Präparation der isolierten Organe, Zellisolierung, extra- und intrazelluläre Antikörperfärbung für Durchflusszytometrie der APOE*3-Leiden.CETP Tiere (Abbildung 4b) sowie der gemischten Knochenmarkschimäre Msr1/CD36 (Abbildung 5), Datenerhebung und Datenanalyse.

Die anderen Autor*innen haben folgende Beiträge geleistet:

Carmen Härdtner: Mitarbeit bei der Studienkonzeption, Organisolation, Generierung der gemischten Knochenmarkschimären, Durchflusszytometrie, Cholesterinassays, Auswertung der Massenspektrometrie, Mitverfassung des Manuskriptes

Jan Kornemann: Mitarbeit bei der Studienkonzeption, Organisolation, Durchflusszytometrie der APOE*3-Leiden.CETP Tiere, Cholesterinassays, Datenerhebung und Datenanalyse, Mitverfassung des Manuskriptes

Katja Krebs: Präparation der isolierten Organe, Zellisolierung, extra- und intrazelluläre Antikörperfärbung für Durchflusszytometrie, quantitative PCR, Datenerhebung und Datenanalyse

Carolin A Ehlert, Jiadai Zou, Christopher Starz, Simon Rauterberg: Zellpräparation, extra- und intrazelluläre Antikörperfärbung für Durchflusszytometrie, Datenanalyse.

Diana Sharipova: Präparation der isolierten Organe, Zellisolierung, extra- und intrazelluläre Antikörperfärbung für Durchflusszytometrie.

Bianca Dufner: Bestrahlung und Knochenmarksrekonstitution der Knochenmarkschimären, Organpräparation, *in vivo* Zellfärbung, histologische Färbungen

Natalie Hoppe: histologische Färbungen, immunhistochemische Färbungen, Konfokalmikroskopie

Tsai-Sang Dederichs: Präparation der isolierten Organe, Zellisolierung, extra- und intrazelluläre Antikörperfärbung für Durchflusszytometrie, histologische Färbungen, quantitative PCR, Datenerhebung und Datenanalyse.

Florian Willecke, Peter Stachon, Timo Heidt, Dennis Wolf, Constantin von zur Mühlen, Peter Kohl: Dateninterpretation sowie Editierung des Manuskriptes

Josef Madl: Konfokalmikroskopie, Dateninterpretation, Editierung des Manuskriptes

Rafael Kaeser, Tobias Boettler: Cholesterinassays aus humanem hepatischem Gewebe sowie humanem Plasma, Datenerhebung und Datenanalyse.

Elsbeth J Pieterman, Hans M G Princen: Generierung und Bereitstellung der APOE*3-Leiden.CETP Tiere, Dateninterpretation.

Benoît Ho-Tin-Noé: Präparation der isolierten Organe, Zellisolierung, extra- und intrazelluläre Antikörperfärbung für Durchflusszytometrie, histologische Färbungen, Datenerhebung und -analyse

Filip K Swirski, Clinton S Robbins, Christoph Bode, Andreas Zirlik: Dateninterpretation sowie Editierung des Manuskriptes

Ingo Hilgendorf: Konzeption und Supervision des Projektes, Datenanalyse sowie -interpretation, Verfassung des Manuskriptes, Drittmittelfinanzierung

13. Danksagung

Meinem Doktorvater PD Dr. med. Ingo Hilgendorf danke ich für die Themenstellung, hervorragende Betreuung und zahlreiche, anregende Diskussionen.

Herrn PD Dr. med. Dominik Bettinger danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. med. Christoph Bode danke ich für die Bereitstellung hervorragender wissenschaftlicher Arbeitsmöglichkeiten an seiner Klinik.

Frau Dr. rer. nat. Carmen Härdtner und der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für ihre Unterstützung, Einweisung in die Labormethoden und die stets wertvolle Hilfestellung.

Der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie danke ich für die finanzielle sowie ideelle Unterstützung im Rahmen des Otto-Hess-Promotionsstipendiums.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich für die ausdauernde Unterstützung während meines Studiums und der Doktorarbeit.