

Interaktionen zwischen dendritischen Zellen und Thrombozyten

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Judith Stein

geb. am 07.08.1985

in Wuppertal

Mainz, den 11.05.15

Angefertigt in der
Klinischen Forschergruppe Allergie
an der Hautklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin Mainz

Dekan:

1. Berichterstatte(r)in:

2. Berichterstatte(r):

Datum der mündlichen Prüfung: 06.08.2015

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Judith Stein, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, den 11.05.15

Judith Stein

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
DANKSAGUNG.....	VIII
VERÖFFENTLICHUNGEN	X
 1. EINLEITUNG	 1
1.1. Dendritische Zellen - essentielle Zellen des Immunsystems mit regulatorischer Funktion.....	 1
1.1.1. Das Immunsystem	1
1.1.2. Dendritische Zellen	1
1.1.3. Subtypen von DCs	3
1.1.4. Dendritische Zellen im kardiovaskulären System	4
1.2. Kardio-vaskuläre Erkrankungen	5
1.2.1. Aufbau von Blutgefäßen	5
1.2.2. Aufbau und Funktion von Thrombozyten.....	6
1.2.3. Hämostase.....	7
1.2.4. Störungen der Hämostase	10
1.2.5. Die Thrombose	11
1.2.6. Die Arteriosklerose.....	12
1.2.7. Dendritische Zellen und Arteriosklerose.....	14
 ZIELSETZUNG	 17
 2. MATERIAL UND METHODEN.....	 18
2.1. Material	18
2.1.1. Laborgeräte	18

2.1.2.	Labor- und Verbrauchsmaterial.....	20
2.1.3.	Chemikalien und Reagenzien	23
2.1.4.	Lösungen, Puffer und Kulturmedien.....	24
2.1.4.1.	Allgemein verwendete Lösungen und Puffer.....	25
2.1.5.	Medien und Supplemente für Zellkulturen.....	26
2.1.6.	Antikörper	28
2.1.6.1.	Antikörper zum Absättigen freier Fc-Rezeptoren.....	28
2.1.6.2.	Antikörper zur FACS-Färbung.....	28
2.1.6.3.	Farbstoff zur Detektion von intrazellulär gebildetem ROS	29
2.1.6.4.	Isotypkontrollantikörper für die FACS-Färbung	29
2.1.7.	Allgemein verwendete Zytokine und Mediatoren.....	30
2.1.8.	In der Aggregometrie verwendete Substanzen	32
2.1.9.	Substanzen für die Thrombin-Generierung mittels Calibrated-Automated-Thrombogram (CAT).....	33
2.1.10.	Versuchstiere.....	34
2.1.11.	Buffy Coats	34
2.2.	Zellbiologische Methoden	34
2.2.1.	Allgemeine Bedingungen	34
2.2.2.	Bestimmung der Lebendzellzahl	35
2.2.3.	Zellbiologische Methoden für murine Arbeiten	35
2.2.3.1.	Präparation von Knochenmarkszellen.....	35
2.2.3.2.	Kultivierung von Knochenmarkszellen	36
2.2.3.3.	Stimulation der BM-DC	36
2.2.3.4.	Ernten der BM-DC	36
2.2.3.5.	Präparation von Milzzellen	37
2.2.3.6.	T-Lymphozyten-Aufreinigung aus Milzzellen über Nylonwolle-Säulen	38
2.2.3.7.	MLR (gemischte Lymphozyten Reaktion).....	39
2.2.3.8.	Blutentnahme.....	40

2.2.3.9.	Generierung von plättchenreichem und plättchenarmem Plasma.....	40
2.2.4.	Zellbiologische Methoden für humane Arbeiten	40
2.2.4.1.	Isolierung von mononukleären Zellen aus Buffy Coats	40
2.2.4.2.	Einfrieren und Auftauen der PBMCs	41
2.2.4.3.	Kultivierung humaner DCs aus PBMC	42
2.2.4.4.	Blutabnahme und Generierung von PRP und PPP	43
2.3.	Analytische Methoden	44
2.3.1.	Durchflusszytometrie (FACS).....	44
2.3.2.	Aggregometrie	45
2.3.3.	Messung der Thrombingenerierung - CAT (Calibrated Automated Thrombography).....	46
2.3.4.	Statistik	47
3.	ERGEBNISSE.....	48
3.1.	Analysen zur Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für den Phänotyp und die Funktion Knochenmarksabgeleiteter dendritischer Zellen	48
3.1.1.	Stimulierung von DCs mit dem NADPH-Oxidase-Aktivator PDBu.....	51
3.1.1.1.	Vergleichende Analyse der durch Stimulierung mit unterschiedlichen Dosen PDBu hervorgerufenen intrazellulär gebildeten ROS-Menge	51
3.1.1.2.	Auswirkungen der Stimulation mit PDBu auf die Expression von MHCII nach kurzen Zeitintervallen	53
3.1.1.3.	Auswirkungen einer PDBu-Behandlung auf die Maturierung von DCs nach 24-stündiger Inkubation	54
3.1.1.4.	T-Zellstimulatorische Kapazität von BM-DCs nach Stimulierung mit PDBu.....	56

3.1.2.	Stimulierung von BM-DCs mit dem NADPH-Oxidase-Aktivator PMA	58
3.1.2.1.	ROS-Generierung nach Stimulation mit PMA für kurze Zeitintervalle	58
3.1.2.2.	Expression von MHCII nach Stimulation mit PMA.....	60
3.1.2.3.	Vergleichende Analyse der Maturierung nach Behandlung mit PMA	60
3.1.2.4.	Auswirkung der PMA-Behandlung auf die T-Zell-stimulatorische Kapazität	62
3.1.3.	Auswirkungen der Inhibition der NADPH-Oxidase mit Apocynin auf mit PDBu stimulierte BM-DCs.....	64
3.1.3.1.	Einfluss auf die ROS-Produktion und die MHCII-Expression nach kurzen Zeitintervallen	64
3.1.3.2.	Einfluss auf die Maturierung und die T-Zellstimulatorische Kapazität.....	67
3.1.4.	Auswirkungen der Inhibition der NADPH-Oxidase mit Chelerythrin auf mit PDBu stimulierte BM-DCs	70
3.1.4.1.	Einfluss auf die ROS-Produktion und die MHCII-Expression nach kurzen Zeitintervallen	70
3.1.4.2.	Auswirkung der Behandlung mit dem PKC-Inhibitor Chelerythrin auf PDBu-stimulierte BM-DCs nach 24-stündiger Inkubation.....	73
3.1.5.	Analyse der Effekte einer Stimulation mit PDBu auf die ROS-Generierung und den Phänotyp bei Verwendung von gp91 ^{phox -/-} knockout-BM-DCs	75
3.1.5.1.	Auswirkungen auf die ROS-Produktion und die MHCII-Expression nach kurzen Zeitintervallen.....	75
3.1.5.2.	Analyse der phänotypischen und funktionalen Auswirkungen der Stimulation mit PDBu bei der Verwendung	

von gp91 ^{phox -/-} knockout BM-DCs nach langen Inkubationszeiträumen	78
3.2. Versuche zur Aggregation zwischen dendritischen Zellen und Thrombozyten	81
3.2.1. Titration von DCs und Thrombozyten für eine optimale Aggregation.....	81
3.2.2. Einfluss von Tissue Factor auf die Aggregation	86
3.2.3. Rolle von Thrombin bei der Aggregation	91
3.2.4. Einfluss von Apyrase auf die Aggregation.....	96
3.2.5. Einfluss der Oberflächenmoleküle CD18 und PSGL-1 auf die Aggregation.....	98
3.2.6. Einfluss der Fc-Rezeptoren auf die Aggregation	102
3.2.7. Einfluss des Fcγ-Rezeptors IIb auf die Aggregationsfähigkeit dendritischer Zellen.....	108
4. DISKUSSION.....	113
4.1. Analysen zur Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für den Phänotyp und die Funktion Knochenmarksabgeleiteter dendritischer Zellen	113
4.1.1. Die Stimulation mit PDBu führt zur Generierung hoher ROS- Mengen bereits nach kurzen Zeiträumen und gesteigerter MHCII-Expression	113
4.1.2. Die Stimulation dendritischer Zellen mit PDBu führt zu einer gesteigerten CD86 und MHCII-Expression sowie zu einem gesteigerten T-Zellstimulationspotential	115
4.1.3. Die Behandlung von BM-DCs mit dem NADPH-Oxidase- Inhibitor Apocynin vor der PDBu-Stimulation führt zu einer reduzierten MHCII-Expression und einer verminderten T- Zellstimulatorischen Kapazität.....	116

4.1.4.	Die Behandlung von BM-DCs mit Chelerythrin vor PDBu-Stimulation führt zu reduzierter ROS-Produktion und einer verminderten MHCII-Expression nach 2 Stunden und einem immaturen Phänotyp nach 24 Stunden.....	118
4.1.5.	Die Verwendung von BM-DCs, welche einen gp91 ^{phox -/-} -Genotyp aufweisen, führt zu einer Reduzierung der ROS-Produktion nach kurzen Zeitabständen, allerdings hat dies keinen Einfluss auf den Phänotyp und die Funktionalität der BM-DCs nach 24 Stunden.....	119
4.1.6.	Schlussfolgerung.....	121
4.2.	Versuche zur Aggregation zwischen humanen Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen und Thrombozyten.....	122
4.2.1.	Von dendritischen Zellen produzierter Tissue Factor hat keinen Einfluss auf die Aggregation.....	124
4.2.2.	Dendritische Zellen sind in der Lage Thrombin zu generieren, allerdings verläuft die Aggregation unabhängig von Thrombin.....	125
4.2.3.	Die Aggregation zwischen dendritischen Zellen und Thrombozyten ist nicht wesentlich ATP- oder ADP-abhängig	127
4.2.4.	Die Verwendung von Antikörpern gegen CD18 bzw. PSGL-1 führt zu einer vergleichbar reduzierten Aggregation zwischen dendritischen Zellen und Thrombozyten wie bei Einsatz der korrespondierenden Isotypkontrollantikörper	128
4.2.5.	Die Blockierung der Fc-Rezeptoren auf dendritischen Zellen führt zu einer verminderten Aggregation zwischen DCs und Thrombozyten	131
4.2.6.	Schlussfolgerung.....	136

ZUSAMMENFASSUNG	138
ABSTRACT	140
LITERATURVERZEICHNIS.....	142
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	XI
LEBENS LAUF.....	XIV

Danksagung

Veröffentlichungen

Originalpublikationen:

Hausding M, Jurk K, Daub S, Kröller-Schön S, **Stein J**, Schwenk M, Oelze M, Mikhed Y, Kerahrodi JG, Kossmann S, Jansen T, Schulz E, Wenzel P, Reske-Kunz AB, Becker C, Münzel T, Grabbe S, Daiber A. *CD40L contributes to angiotensin II-induced pro-thrombotic state, vascular inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction.* **Basic Research in Cardiology**, 2013; 108(6):386.

Stein J, Maxeiner JH, Montermann E, Höhn Y, Raker V, Taube C, Sudowe S, Reske-Kunz AB. *Non-eosinophilic airway hyperreactivity in mice, induced by IFN- γ producing CD4⁺ and CD8⁺ lung T cells, is responsive to steroid treatment.* **Scandinavian Journal of Immunology**, 2014 Nov; 80(5):327-38.

Raker V, **Stein J**, Montermann E, Maxeiner J, Taube C, Reske-Kunz AB, Sudowe S. *Regulation of IgE production and airway reactivity by CD4-CD8- regulatory T cells.* **Immunobiology**, 2015 Apr; 220(4):490-9.

Kongressbeiträge:

Stein J, Raker V, Montermann E, Maxeiner J, Taube C, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Sudowe S. *Die durch Immunisierung mit einer allergenkodierenden Plasmid-DNA hervorgerufene Atemwegsentszündung ist sensitiv gegenüber einer Behandlung mit Glukokortikoiden.* **6. Deutscher Allergiekongress der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 08. – 10. September 2011, Wiesbaden.**

Stein J, Raker V, Montermann E, Maxeiner J, Taube C, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Sudowe S. *Biolytic transfection with pFascin- β Gal as a mouse model for steroid-resistant asthma?* **24. Mainzer Allergie-Workshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 22. – 23. März 2012, Mainz.**

1. Einleitung

1.1. Dendritische Zellen - essentielle Zellen des Immunsystems mit regulatorischer Funktion

1.1.1. Das Immunsystem

Zum Schutz vor Pathogenen wie Bakterien, Viren oder Parasiten oder auch zur Erkennung veränderter eigener Zellen besitzt jedes mehrzellige Lebewesen ein Immunsystem. Man unterscheidet dabei grundlegend das zuerst reagierende angeborene (innate) Immunsystem und das erworbene (adaptive) Immunsystem. Schon kurz nach dem Eindringen eines Pathogens wird das innate Immunsystem aktiviert. Dabei spielen sowohl zelluläre Komponenten eine Rolle, wie Makrophagen, Monozyten oder natürliche Killerzellen (NK-Zellen), aber auch humorale Komponenten wie das Komplementsystem sind dabei beteiligt. Diese erste Reaktion des Immunsystems ist semi-spezifisch, das heißt es werden nur allgemein vorkommende Moleküle über unveränderliche Rezeptoren erkannt, die sich auf der Oberfläche des Pathogens befinden.

Sehr viel spezifischer dagegen reagiert das adaptive Immunsystem, zu dem T- und B-Lymphozyten gezählt werden. Dabei können spezifische Antigene, die durch Antigen-präsentierende Zellen präsentiert werden, erkannt und die Immunantwort an diese spezifischen Moleküle angepasst werden (Janeway et al., 2002). Dendritische Zellen (DCs) stellen die Schnittstelle zwischen der innaten und der adaptiven Immunantwort dar.

1.1.2. Dendritische Zellen

DCs sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen, deren Hauptaufgabe es ist, Pathogene oder auch entartete körpereigene Zellen zu erkennen, aufzunehmen, zu prozessieren und anschließend Antigenfragmente T-Lymphozyten zu präsentieren um dadurch eine Proliferation pathogenspezifischer T-Zellen zu induzieren (Hopp et

al., 2014). Aufgrund dieser Aufgabe sind die DCs im gesamten Organismus verteilt, vor allem an Barrieren und Oberflächengewebe wie der Haut, den Schleimhäuten und den Lymphknoten, aber auch in der Nähe von Blutgefäßen (Novak et al., 2008). Die im Gewebe befindlichen DCs sind zumeist immatur. Charakterisiert wird dieser Zustand durch eine niedrige Expression von MHC-Molekülen und eine geringe Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen. Weiterhin besitzen immature DCs ein hohes phagozytotisches Potential (Banchereau et al., 1998; Waithman et al., 2013). Anhand von fremden, konservierten Strukturen wie Lipopolysacchariden, Mannanen oder Lipoteichonsäuren auf der Oberfläche können Pathogene erkannt werden, ebenso wie Bakterien oder Viren anhand von DNA oder RNA. Dazu tragen die DCs Rezeptoren auf ihrer Oberfläche wie z.B. TLRs („Toll like receptors“), C-Typ-Lektine oder Mannose-Rezeptoren (Sato et al., 2007). Die Aufnahme kann über verschiedene Wege erfolgen, z.B. über die rezeptorvermittelte Phagozytose als wichtigstem Mechanismus, aber auch per Endozytose oder Makropinozytose. Innerhalb der Zelle werden die Proteine der Pathogene zu Peptidfragmenten prozessiert und je nach Ort des Abbaus (Zytoplasma oder angesäuerte Vesikel) auf Molekülen der MHC-Klasse I oder -Klasse II an der Zelloberfläche präsentiert (Janeway et al., 2002). Dieser Prozess führt zur Maturation der dendritischen Zelle. In der Folge sezerniert die Zelle proinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-6, TNF- α oder auch IL-12. Weiterhin werden kostimulatorische Moleküle wie CD83 und CD86 sowie auch MHCII verstärkt exprimiert. Die DC verliert ihre phagozytotische Kapazität und migriert von ihrem ursprünglichen Ort/Lokalisation zum nächstgelegenen Lymphknoten. Dies geschieht unter anderem durch die Aufregulation des Chemokin-Rezeptors CCR7 (Sato et al., 2007). Dort präsentiert sie die an den MHC-Komplex gebundenen Peptide T-Zellen.

DCs sind allerdings nicht nur wichtig für die Auslösung einer Immunantwort. Auch bei der Aufrechterhaltung der Toleranz eines Individuums spielen sie eine wichtige Rolle. Es ist wichtig, dass jeder mehrzellige Organismus Fremd- und Selbstantigene unterscheiden kann. Dadurch werden eventuelle selbstschädigende Immunantworten, also eine Autoimmunität, im Regelfall vermieden (Buckner et al., 2004). Um diese Funktion im Immunsystem aufrechtzuerhalten, sind unter anderem DCs notwendig, die suppressiv-wirkende regulatorische T-Zellen induzieren können (Jonuleit et al., 2000). Diese sogenannten tolerogene DCs entstehen zumeist durch den Kontakt mit bestimmten Zytokinen wie beispielsweise IL-10. Die Anwesenheit

von IL-10 führt dazu, dass die DCs keinen vollständig maturen Phänotyp erreichen können, sondern in einem semi-maturen Status arretiert werden (Steinbrink et al., 1997). Sie exprimieren im Vergleich zu reifen DCs weniger MHCI- und MHCII-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche und auch die Expressionsdichte von kostimulatorischen Molekülen wie CD80 oder CD86 ist reduziert. Ebenso ist die Sekretion proinflammatorischer Zytokine stark eingeschränkt (Lutz et al., 2002). In der Folge induzieren tolerogene DCs die Differenzierung von interagierenden T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen.

1.1.3. Subtypen von DCs

DCs entstehen aus Vorläuferzellen im Knochenmark, den hämatopoetischen Stammzellen, welche sich zu lymphatischen als auch myeloiden Vorläuferzellen weiterentwickeln können. Frühere Klassifikationen der DC-Subtypen folgten der These, dass DCs entweder aus lymphoiden (plasmazytoide DC, pDC) oder myeloiden (mDC) Vorläuferzellen entstehen (Kushwah et al., 2011). Heute ist klar, dass diese Trennung so nicht aufrechterhalten werden kann, und es ist bekannt, dass die Differenzierung plastischer verläuft.

Mittlerweile unterscheidet man grundlegend zwei verschiedene Arten von DCs: die konventionellen DCs (cDC) und die plasmazytoiden DCs (pDC). Sie unterscheiden sich durch ihre äußere Erscheinungsform, ihre Funktion, ihr Vorkommen im Organismus und durch die Expression ihrer Oberflächenmoleküle (Waithman et al., 2013).

Charakteristisch für plasmazytoide DCs ist eine eher runde Form, die an Plasmazellen erinnert, wodurch auch die Namensgebung zustande kam. Die für DCs typischen Dendriten bekommen sie erst während des Maturierungsprozesses. Die wichtigste Eigenschaft der pDCs ist die Produktion von Typ-1-Interferonen, weswegen ihnen eine bedeutende Rolle bei der Abwehr von viralen Infekten und bei der Tumorbekämpfung zugesprochen wird. Auch bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen ist dieser DC-Subtyp entscheidend. pDCs sind hauptsächlich im Blut und in den peripheren Lymphorganen lokalisiert. Bei der Expression von Oberflächenmolekülen unterscheiden sich pDCs von konventionellen DCs. pDCs exprimieren kaum CD11c und CD14, stattdessen B220 und CD45RA,

sowie die Toll-like Rezeptoren TLR-7 und TLR-9 (Manthey et al., 2011; Hubo et al., 2012; Hopp et al., 2014).

Konventionelle DCs hingegen stellen die „klassischen“ DCs dar. Sie weisen das typische Aussehen mit langen Dendriten auf, welches für die Namensgebung 1973 durch Steinman und Cohn verantwortlich war (Steinman et al., 1973).

Man unterscheidet bei den konventionellen DCs migrierende und im lymphoiden Gewebe verbleibende DCs, welche ihrerseits in CD8⁺ und CD8⁻ Subtypen unterteilt werden können. Zu den migratorischen DCs zählen zum Beispiel Langerhanszellen und dermale DCs. Sie sind in den peripheren Geweben wie der Haut lokalisiert und wandern nach Pathogenaufnahme und Aktivierung zu den drainierenden Lymphknoten, um Antigene zu präsentieren. Unter den im lymphoiden Gewebe residierenden DCs fasst man die DCs zusammen, die sich in den Lymphknoten, dem Thymus und der Milz befinden (Villadangos et al., 2007). Den konventionellen DCs ist gemein, dass sie die Oberflächenmoleküle CD11c und MHCII tragen und nach einem Aktivierungssignal die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83 und CD86 in erhöhtem Maße exprimieren. Sie können je nach Lokalisation sehr spezialisiert sein und dadurch bedingt unterschiedliche Oberflächenmoleküle exprimieren, so tragen z.B. in der Milz befindliche DCs CD11b auf ihrer Oberfläche, einen Marker, der sonst im Kontext mit der Charakterisierung von Makrophagen steht (Reizis, 2012). Zusätzlich zu der zuvor beschriebenen Differenzierung können sich im inflammatorischen Kontext dendritische Zellen auch aus Monozyten entwickeln (Koltsova et al., 2011).

1.1.4. Dendritische Zellen im kardiovaskulären System

Dendritische Zellen kommen allerdings nicht nur in lymphatischen und Oberflächengeweben vor, auch ein Vorkommen dendritischer Zellen in der Nähe von Blutgefäßen wurde beschrieben. Weiterhin ist bekannt, dass DCs auch in einer geringer Anzahl im Blut auftreten (Koltsova et al. 2011; Manthey et al. 2011). Diese Tatsache ist von großer Bedeutung hinsichtlich der Überlegung, inwiefern DCs an der Entstehung und Aufrechterhaltung von kardio-vaskulären Erkrankungen beteiligt sind.

1.2. Kardio-vaskuläre Erkrankungen

Der Begriff der kardio-vaskulären Erkrankungen ist in der Humanmedizin nicht klar definiert, zumeist werden hierbei alle das Herz und das Gefäßsystem betreffenden Erkrankungen zusammengefasst. Als Orientierung dienen hierbei die von der Weltgesundheitsorganisation aufgelisteten, das Herz-Kreislaufsystem betreffenden Erkrankungen (vgl. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10) Version for 2010, Chapter IX).

Die wohl bekanntesten kardio-vaskulären Erkrankungen sind neben Hypertonie und Herzinfarkt die Arteriosklerose und die Thrombose.

Kardio-vaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in Deutschland. Ungefähr 40% aller Todesfälle in Deutschland sind auf Herz-Kreislauserkrankungen zurückzuführen (Robert Koch Institut, 2015).

Doch auch wenn die Erkrankung nicht zum Tode führt, so bleiben nach einer solchen Erkrankung durchaus schwere Folgeerscheinungen zurück (Bundesministerium für Bildung und Forschung, 2014). Aufgrund der Tatsache, dass sich das Durchschnittsalter der Bevölkerung erhöht, ist auch in den kommenden Jahren mit einem Anstieg der Zahlen zu rechnen. Daher ist es besonders wichtig, grundlegende Mechanismen zu erforschen, um neue Therapiemöglichkeiten zu schaffen.

Verschiedene Risikofaktoren begünstigen die Entstehung kardio-vaskulärer Erkrankungen. Zum einen sind hier nicht beeinflussbare genetische Prädispositionen zu nennen. Zum anderen gibt es aber auch beeinflussbare Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Adipositas oder auch ganz allgemein eine ungesunde, fettreiche Ernährung, die zu einem erhöhten Cholesterinlevel führt. Auch Rauchen und eine inaktive Lebensweise fördern die Entstehung solcher Erkrankungen (Robert Koch-Institut, 2015).

1.2.1. Aufbau von Blutgefäßen

Grundsätzlich gliedert sich der Aufbau der Blutgefäße in drei Schichten: Innen liegt die Tunica intima (Intima), es folgen die Tunica media (Media) und die äußerste Schicht, die Tunica externa (Adventitia).

Die Intima bildet die Grenzfläche zum Blut. Sie besteht aus Endothel und einer subendothelialen Bindegewebsschicht. Die Endothelzellen, die zum Lumen hin eine Glykokalyxschicht besitzen, können Lymphozytenadhäsionsmoleküle, Von Willebrand-Faktor, sowie gefäßerweiternde (z.B. Stickstoffmonoxid NO) oder auch gefäßverengende (Endothelin) Stoffe bilden.

Die zwischen Intima und Adventitia gelegene Media besteht aus zirkulär verlaufenden, glatten Muskelzellen sowie aus elastischen und kollagenen Fasern.

Die außen gelegene Adventitia ist eine Bindegewebsschicht, die die Verbindung der Blutgefäße zum umliegenden Gewebe herstellt. Sie enthält elastische und kollagene Fasern, Fibroblasten und kleinere Blutgefäße und Nerven.

Dieser Aufbau gilt grundsätzlich für alle Blutgefäße, allerdings sind die Gefäße je nach Lokalisation im Körper an spezielle Aufgaben angepasst. So besitzen herznahe Gefäße (z.B. die Aorta) zusätzlich große Mengen an elastischen Fasern in der Media, während die Media herzferner Arterien hauptsächlich aus Muskelfasern besteht.

Der geschilderte Aufbau bezieht sich sowohl auf Arterien als auch auf Venen, jedoch unterscheiden sich beide im Feinaufbau, was ihrer Funktion geschuldet ist. Venen, die das Blut zum Herzen zurücktransportieren müssen, besitzen ein größeres Lumen und eine dünnere Gefäßwand verglichen mit Arterien. Weiterhin besitzen die Venen der Extremitäten sogenannte Venenklappen, die aus Ausstülpungen der Intima bestehen. Sie erfüllen eine Ventilfunktion, um den gerichteten Blutfluss sicherzustellen (Schwegler et al. 2011; Ulfing, 2010).

1.2.2. Aufbau und Funktion von Thrombozyten

Thrombozyten oder auch Blutplättchen entstehen im Knochenmark aus Megakaryozyten. Sie sind mit einem Durchmesser von 2-4 µm die kleinsten Zellen des Blutes. Ihre Form ist im nicht-aktivierten, ruhenden Zustand diskoid, bikonkav und elliptisch. Nach Aktivierung findet ein sogenannter „shape change“ statt, bei dem Pseudopodien ausgebildet werden. Thrombozyten besitzen keinen Zellkern. Im Blut befinden sich durchschnittlich etwa 150.000 bis 300.000 Zellen pro µl. Es werden pro Stunde etwa 250 Milliarden neue Thrombozyten gebildet, die im Schnitt eine

Überlebensdauer von neun Tagen haben. Ungefähr ein Drittel der Blutplättchen wird in der Milz gespeichert. Abgebaut werden Thrombozyten im retikuloendothelialen System der Leber und Milz (Neumann, 2008). Der morphologische Aufbau ist sehr komplex. In der Zellmembran tragen Thrombozyten viele Glykoproteine (GP) z.B. GP IIb/IIIa, die als Oberflächenrezeptoren eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und der Vernetzung der Blutplättchen spielen. Im Zytosol befindet sich ein dichtes tubuläres System, in dem hauptsächlich Ca^{2+} -Ionen gespeichert werden. Weiterhin charakteristisch für Thrombozyten sind sehr viele im Zytosol enthaltene Speichergranulae. Die sogenannten α -Granula enthalten Fibrinogen, Fibronektin, Von Willebrand-Faktor, platelet-derived growth factor und weitere Adhäsionsmoleküle wie z.B. P-Selektin. In den sogenannten dichten Granula werden niedermolekulare Moleküle wie Serotonin, Ionen oder auch Nukleotide gespeichert. Eine dritte wichtige Gruppe der Speichergranulae sind die Lysosomen. In ihnen werden hydrolytische Enzyme gespeichert (Neumann, 2008; Henning, 2012). Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Hämostase, der Blutgerinnung.

1.2.3. Hämostase

Die Hämostase ist die Blutgerinnung. Sie ist der physiologische Prozess, um in Abhängigkeit bestimmter Faktoren, wie der Funktion der Gefäßinnenwand, der Blutplättchen (Thrombozyten) und Gerinnungsfaktoren bzw. der Gerinnungskaskade, eine entstandene Blutung zu beenden. Dieser Prozess gliedert sich in zwei Teile: die primäre Hämostase und die sekundäre Hämostase, die teils zeitgleich ablaufen und eng miteinander verbunden sind (de Gruyter, 2003).

In der ersten Phase der Hämostase spielen die Thrombozyten eine entscheidende Rolle (zusammengefasst in: Jurk et al., 2005). Das Gefäßendothel ist mit einer heparanasulfathaltigen Glykokalyx ausgekleidet, an welche die Thrombozyten im Normalfall aufgrund fehlender Rezeptoren nicht binden können und die so gerinnungshemmend wirkt (Heine, 2007). Somit sind der ungestörte Blutfluss und eine Vermeidung der Aktivierung der Thrombozyten sichergestellt. Kommt es nun allerdings zu einer Verletzung der Gefäße, so wird diese Schranke unterbrochen, und die Thrombozyten kommen in Kontakt mit der subendothelialen Matrix. Diese besteht vor allem aus Kollagen, aber auch aus anderen Faktoren wie der Von Willebrand-

Faktor (vWF), Laminin und Fibronektin. Die Thrombozyten binden direkt oder mit Hilfe des vWF an die freigelegten Kollagenfasern. Die Bindung von vWF an die Plättchen erfolgt über den Glykoproteinkomplex (GP) Ib/V/IX (Jurk et al., 2005; Wei et al., 2009; Schmidt et al., 2013). Diese Adhäsion wird durch Aktivierung weiterer Oberflächenmoleküle und deren direkte Bindung an das Kollagen stabilisiert. In Folge dieser Reaktionen werden verschiedene Signalwege innerhalb der Thrombozyten aktiviert. Durch Degranulation werden Calcium-Ionen freigesetzt, aber auch ADP, Fibrinogen und Fibronektin. Aufgrund der Calcium-Freisetzung wird innerhalb der Thrombozyten Thromboxan-A₂ und plättchenaktivierender Faktor (PAF) generiert und ebenfalls sezerniert. Dies bewirkt unter anderem eine Vasokonstriktion. Die Aktivierung der Thrombozyten führt zur Bindung von weiteren Plättchen und somit zu einer reversiblen Aggregation. Wichtig für die Aggregation und die Bildung eines stabilen Thrombus ist der mit der Aktivierung einhergehende „shape change“ der Thrombozyten. So wird der Vorgang bezeichnet, bei dem sich durch Umorganisieren des Zytoskeletts die Oberfläche der Thrombozyten vergrößert, indem Pseudopodien ausgebildet werden. Nicht aktivierte Thrombozyten weisen eine eher rundlich-flache, bikonkave Form auf. Im Zuge der Oberflächenumstrukturierung gelangen außerdem negativ geladene Phospholipide an die Zelloberfläche, die im späteren Verlauf der Hämostase eine Rolle spielen. Die phänotypische Veränderung der Zelloberfläche führt ebenfalls zu einer Stabilisierung des Aggregats. Eine Hauptrolle bei der Thrombozytenaggregation spielt der Fibrinogenrezeptor GP IIb/IIIa, der für eine Stabilisierung des Komplexes durch Ausbildung von Fibrinogenbrücken sorgt. Das durch den aktivierten GP IIb/IIIa gebundene plasmatische Fibrinogen führt primär zu einer Vernetzung der Thrombozyten und somit zu einer Aggregation der Blutplättchen (zusammengefasst in: Jurk et al., 2005). Durch die Signalkaskade der primären Hämostase wird parallel auch die sekundäre Hämostase in Gang gesetzt.

Die sekundäre Hämostase läuft primär auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten kaskadenförmig ab, wobei immer ein Gerinnungsfaktor durch proteolytische Prozesse zur Aktivierung des nächsten führt. Die Gerinnung wird in drei Phasen unterteilt: die Aktivierungsphase, die Koagulationsphase und die Retraktionsphase.

Die Aktivierungsphase spaltet sich auf in einen intrinsischen und einen extrinsischen Weg. Der intrinsische Weg wird ausgelöst durch den Kontakt mit negativ geladenen

Oberflächen wie beispielsweise Kollagen, wodurch der Faktor XII aktiviert wird und anschließend seinerseits Faktor XI aktiviert. Durch die nachfolgende Aktivierung der Faktoren IX und VIII wird Faktor X aktiviert, welcher zur proteolytischen Spaltung von Prothrombin zu Thrombin führt.

Beim extrinsischen Weg spielt der Tissue Faktor (TF) eine bedeutende Rolle. TF ist ein integrales Membranprotein, welches in der Adventitia der Blutgefäße vorkommt und durch Ruptur/Gefäßverletzung freigesetzt wird oder auch von aktivierten Endothelzellen sezerniert wird. TF bildet auf anionischen Phospholipidoberflächen beispielsweise auf freigelegten Fibroblasten und Monozyten, aber auch aktivierten Thrombozyten mit Faktor VII einen Komplex, wodurch letzterer aktiviert wird.

Nachfolgend wird, wie im intrinsischen System, Faktor X aktiviert, welcher wie oben beschrieben Prothrombin in das enzymatisch aktive Thrombin spaltet. Für diesen Schritt ist die Anwesenheit von Ca^{2+} - Ionen unerlässlich. An dieser Stelle der Gerinnungskaskade treffen sich der intrinsische und der extrinsische Weg, und es endet die Aktivierungsphase.

Thrombin ist das Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade. Während der Koagulationsphase erfüllt das Thrombin mehrere Aufgaben. Zum einen spaltet es kurze Peptidketten von Fibrinogen ab, so dass Fibrinmonomere entstehen, die sich zusammenlagern und ein Fibrinnetz bilden. Weiterhin aktiviert Thrombin Faktor XIII, einen fibrinstabilisierenden Faktor, der zu einer stabilen Quervernetzung der Fibrinmonomere führt. Durch Thrombin werden auch die Faktoren V, XI und VIII aktiviert, was zu einer positiven Rückkopplung und einer Beschleunigung der Gerinnungskaskade führt. In dem gebildeten Fibrinnetz können sich andere Zellen verfangen, z.B. Erythrozyten, wodurch sich der sogenannte „rote Thrombus“ bildet.

Im letzten Schritt der sekundären Hämostase, der Retraktionsphase, führen die Thrombozyten im Thrombus zu einer Kontraktion des Fibrinnetzes. Die Freisetzung von Calcium-Ionen aus intrazellulären Speichern führt zu einer zytoplasmatischen Erhöhung der Calcium-Konzentration. Dies hat zur Folge, dass sich in den Thrombozyten Aktin-Myosin-Querbrücken bilden und diese zu einer Kontraktion des Thrombus führen. Eine Folge dieser Kontraktion ist die Annäherung der Wundränder, was eine schnellere Wundheilung begünstigt (Behrends et al., 2010; Silbernagel et al., 2012).

Um unter normalen Umständen eine Gerinnung des Blutes zu vermeiden, gibt es verschiedene Moleküle, die inhibierend auf einzelne Schritte der Hämostase wirken. Antithrombin III inhibiert durch Komplexbildung die Faktoren IIa, IXa, Xa, XIa und XIIa. Durch Heparin, welches von Mastzellen und basophilen Granulozyten gebildet werden kann, kann der Effekt verstärkt werden. Thrombomodulin ist ein Thrombinrezeptor und befindet sich auf der Membran von Endothelzellen. Es bindet Thrombin hochaffin und verhindert so die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin. Gleichzeitig wird durch die Bindung in den Endothelzellen Protein C aktiviert, welches die Faktoren Va und VIII hemmt. Verstärkt wird dieser Effekt durch eine Komplexbildung von Protein C mit Protein S (Behrends et al., 2010). Ein weiteres Molekül ist der Tissue factor pathway inhibitor (TFPI). Dieser wird z. B. von Endothelzellen gebildet und interagiert mit Faktor X und mit dem Faktor VII-Tissue Faktor-Komplex und inhibiert so die extrinsische Gerinnung (Silbernagel et al., 2012).

1.2.4. Störungen der Hämostase

Gerinnungsstörungen sind auf verschiedene Ursachen zurückzuführen. Sie können durch einen angeborenen (z.B. Hämophilie) oder auch erworbenen (Vitamin K-Mangel durch Leberschädigung) Faktorenmangel entstehen. Auch kann ein erhöhter Faktorverbrauch zu Grunde liegen oder ein Thrombozytenmangel oder –defekt (Silbernagel et al., 2012).

Die bekannteste Gerinnungsstörung ist die Hämophilie, die sogenannte Bluterkrankheit. Es werden drei Arten unterschieden: Bei der Hämophilie A fehlt Faktor VIII oder ist inaktiv, bei der Hämophilie B fehlt Faktor IX oder ist inaktiv, bei Hämophilie C liegt ein Faktor XI-Mangel vor.

Ein weiterer bekannter Gerinnungsdefekt ist das Von-Willebrand-Jürgens (vWJ)-Syndrom. Dabei wird der Von Willebrand-Faktor nur in geringen Mengen (Typ I und II) oder gar nicht (Typ III) produziert. Beeinflusst wird dadurch sowohl die primäre als auch die sekundäre Hämostase (Behrends et al., 2010).

Es kann allerdings auch sein, dass die Gerinnung nicht gestört ist, sondern sogar unkontrolliert auftritt. So können sich Blutgerinnsel, sogenannte Thrombosen, bilden, die zu einem teilweisen oder kompletten Verschluss der Blutgefäße führen können.

Begünstigt wird die Entstehung solcher Thrombosen durch verlangsamte Fließgeschwindigkeiten des Blutes z.B. durch lange Liegezeiten nach einer Operation oder auch während eines Langstreckenfluges. Auch eine Hyperviskosität des Blutes, Hyperkoagulabilität oder Schädigungen der Gefäßwände (z.B. bei Arteriosklerose) können dies begünstigen (Behrends et al., 2010).

1.2.5. Die Thrombose

Wie bereits im vorherigen Abschnitt geschildert kann es aufgrund verschiedener Ursachen zur Bildung von Thromben kommen. In den meisten Fällen sind die Thrombosen in den unteren Extremitäten wie den Waden lokalisiert, wobei sich der deutlich größere Anteil der Thrombosen in venösen Gefäßen bildet. Eine der am häufigsten auftretenden Erkrankungen ist die tiefe Beinvenenthrombose (TBVT). Bereits 1856 beschrieb Rudolf Virchow die hauptsächlichen Ursachen, die eine Thrombose hervorrufen. Zu der Virchowschen Trias gehören drei Faktoren: 1. Eine Änderung der Blutströmungsgeschwindigkeit, 2. Veränderungen an der Gefäßwand und 3. Veränderungen in der Blutzusammensetzung (Esmon, 2009; Böcker et al., 2008).

Unter 1. versteht man die verlangsamte Blutströmung, auch Stase genannt. Diese kann hervorgerufen werden durch längere Bettruhe, Flugreisen, Dehydration oder auch durch eine Herzinsuffizienz.

Veränderungen der Gefäßwände können z.B. durch Traumata entstehen, aber auch Entzündungen der Gefäßwände und eine erhöhte mechanische Belastung durch Hypertonus unterstützen die Entstehung von Thrombosen.

Ändert sich die Blutzusammensetzung z.B. durch Hyperkoagulabilität oder liegt eine veränderte zelluläre Zusammensetzung des Blutes vor, z.B. bei Thrombozythämie, kann dies ebenfalls die Entstehung von Thrombosen begünstigen.

Es sind viele Risikofaktoren bekannt, die Thrombosen begünstigen. Das Alter, Herzerkrankungen wie eine Herzinsuffizienz oder Hypertonie, Übergewicht, Traumata und Immobilisierung nach einer Operation sind die häufigsten Ursachen. Auch eine hormonelle Veränderung durch eine Schwangerschaft oder die Einnahme von Kontrazeptiva sowie das Rauchen erhöhen das Risiko zu erkranken.

Mögliche Folge einer Thrombose ist unter anderem eine Lungenembolie, wobei sich der Thrombus löst und häufig durch die untere Hohlvene und das Herz in die Pulmonalarterie gelangt und dort zu einem teilweisen oder kompletten Gefäßverschluss führt. Im schlimmsten Fall kann diese Komplikation tödlich sein.

Um derartige Komplikationen zu vermeiden und bestehende Thrombosen aufzulösen, werden verschiedene medikamentöse Therapien angewandt. Durch die Gabe von Heparin wird, wie weiter vorne bereits erwähnt, die Bindungsaffinität von Antithrombin III sehr stark gesteigert. Es wird auch prophylaktisch postoperativ eingesetzt. Cumarinderivate inhibieren die Produktion der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X. Anwendung findet dieser Inhibitor vor allem bei tiefen Venenthrombosen oder bei Vorhofflimmern zur Prävention von Lungen- bzw. systemischen Embolien. Durch die Gabe von Hirudin wird Thrombin gebunden und so inaktiviert. Neben der medikamentösen Therapie sollten aber auch weitere vorbeugende Maßnahmen getroffen werden, wie die Verwendung von Antithrombosestrümpfen oder auch die möglichst frühe Mobilisierung von Patienten nach einer Operation (Behrends et al., 2010).

1.2.6. Die Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist eine systemische entzündliche Erkrankung, die die Intima von Arterien betrifft (Lemmer et al., 2010). Die Erkrankung verläuft in einem langsam voranschreitenden Prozess, der sich über Jahre ziehen kann und häufig symptomlos verläuft. Der genaue Ablauf der Arteriosklerose wird bis heute erforscht. Einige Risikofaktoren wie Hypertonie, Diabetes mellitus, Übergewicht, Rauchen, ein erhöhter Cholesterinspiegel und ein erhöhter LDL-(low-density lipoprotein) Plasmaspiegel tragen zur Entstehung und zum Fortlauf der Erkrankung bei.

Zur Entstehung der Arteriosklerose gibt es zwei Hypothesen. Zum einen die „Response-to-injury“-Hypothese von Russel Ross (Ross et al., 1973), zum anderen die „Lipoprotein-induced atherosclerosis“-Hypothese nach Goldstein (Goldstein et al., 1977). Nach der ersten Hypothese kommt es zu einer Endothelschädigung oder auch Dysfunktion der Intima durch mögliche Faktoren wie z. B. einem Trauma oder Hypertonie. Infolge dieser Schädigung können Zellen aus dem Blut in die Intima einwandern und sogenannte Schaumzellen bilden, die anschließend die

charakteristischen Plaques bilden. Nach Goldstein ist dagegen die Aufnahme von oxidiertem LDL durch Makrophagen und deren Umwandlung in Schaumzellen der entscheidende Schritt zur Manifestation der Arteriosklerose. Die Bildung von Schaumzellen und die dadurch hervorgerufene Entzündungsreaktion werden bei beiden Hypothesen als wichtig betrachtet. Im Folgenden sollen die Vorgänge genauer beschrieben werden.

Durch die Endotheldysfunktion oder -schädigung kann LDL in die Intimaschicht gelangen, wo es durch Oxidation chemisch modifiziert wird (oxLDL). Dieses oxLDL führt zur Aktivierung der Endothelzellen, welche infolgedessen verstärkt Adhäsionsmoleküle exprimieren (Pirillo et al., 2013). Zu den wichtigsten Adhäsionsmolekülen zählen P-, E- und L-Selektin, ICAM (intracellular adhesion molecule), VCAM (vascular cell adhesion molecule), PECAM (platelet/endothelial cell adhesion molecule) und Integrine (Metzner, 2006). Durch die Expression dieser Moleküle können Zellen wie Monozyten, T-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, Thrombozyten und dendritische Zellen in die Intima infiltrieren.

Eingewanderte Makrophagen oder auch aus Monozyten differenzierte Makrophagen internalisieren das oxLDL, was zu einer Lipidakkumulation innerhalb der Zelle und somit zur Bildung einer Schaumzelle führt (Pirillo et al., 2013). Aktivierte Makrophagen und Endothelzellen sekretieren proinflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1, IL-8, TNF- α (Tumor Nekrosis Factor- α), IFN- γ (Interferon- γ) und TGF- β (Tumor Growth Factor- β) (Metzner, 2006). Weiterhin werden von den Makrophagen auch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produziert und freigesetzt (Pirillo et al., 2013). Auch infiltrierte und aktivierte T-Lymphozyten sekretieren Zytokine, die die Inflammation fortschreiten lassen.

Durch die fortschreitende Entzündung und die Bildung der Schaumzellen kommt es zu einer Ausbildung der für die Arteriosklerose typischen Plaques. Initiiert durch die Freisetzung von VEGF (vascular endothelial growth factor) kommt es zu einer Einwanderung von Muskelzellen (smooth muscle cells, SMC) aus der Media in die Plaqueregion in der Intima (Celletti et al., 2001). Durch die Proliferation der SMC verfestigt sich der Plaque, und es bildet sich eine sogenannte Kappe aus. Durch die Plaquebildung in der Intima und deren Verdickung verringert sich das Lumen des Blutgefäßes. Dies kann im schlimmsten Fall zum kompletten Gefäßverschluss führen. Auf der anderen Seite können durch die aktivierten Endothelzellen Faktoren

wie z.B. Tissue Faktor freigesetzt werden, die zusammen mit dem verlangsamten Blutfluss die Blutgerinnung und somit die Entstehung von Thromben begünstigen. Die Ruptur der Plaqueregion oder auch die Bildung von Thromben kann zu schweren Erkrankungen führen wie z.B. einem Schlaganfall.

1.2.7. Dendritische Zellen und Arteriosklerose

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, spielen Makrophagen eine sehr große Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Arteriosklerose. Allerdings wurde in den letzten Jahren auch die Beteiligung von DCs beschrieben. So wurden z. B. in arteriotischen Plaques und in der Adventitia eine hohe Anzahl an dendritischen Zellen nachgewiesen (Koltsova et al., 2011; Manthey et al., 2011). Aber auch wenn diese Beobachtung einen Hinweis auf eine Beteiligung von DCs gibt, so ist immer noch nicht genau geklärt, welcher Subtyp von DCs vorliegt und welche Rolle genau die DCs bei der Erkrankung spielen (Koltsova et al., 2011). Eine mögliche Aufgabe der DCs ist die Beteiligung an der Regulation der Cholesterin-Homöostase (Gautier et al., 2009) oder auch - ähnlich wie Makrophagen - die Aufnahme und Speicherung von Lipiden und die Bildung von Schaumzellen (Paulson et al., 2010). Weiterhin können die aufgenommenen Lipide und oxLDL prozessiert werden und T-Lymphozyten und NKT-Zellen präsentiert werden (Koltsova et al., 2011). Die aktivierten DCs produzieren Zytokine wie TNF- α , IL-12 und IL-6, die proinflammatorisch wirken.

Die Antigenpräsentationsfunktion der DCs scheint sehr entscheidend zu sein für den Verlauf einer arteriotischen Inflammation, da ein Fehlen der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 zu einer verminderten Plaque-Bildung führt (Buono et al., 2004). Unterstützt wird dies durch den Nachweis von T-Lymphozyten in der Nähe von DCs in arteriotischen Plaques, was eine DC-T-Zell-Interaktion vermuten lässt (Koltsova et al., 2011; Manthey et al., 2011).

Allerdings können dendritische Zellen nicht nur mit T-Lymphozyten interagieren, auch Wechselwirkungen zwischen DCs und Thrombozyten wurden beschrieben.

Um zu erforschen, wie DCs zu arteriosklerotischen Läsionen rekrutiert werden, untersuchten Langer et al. (2007) *in vitro* die Adhäsion dendritischer Zellen an

immobilisierte Thrombozyten sowie die Aktivierung von DCs durch Thrombozyten und die Auswirkungen einer Koinkubation beider Zelltypen. Die Autoren fanden heraus, dass es durch PSGL-1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand-1) auf den DCs zu einem ersten initialen Kontakt zwischen DCs und Thrombozyten kommt. Die anschließende Adhäsion wurde vermittelt durch eine Bindung von CD11b/CD18 (Mac-1) auf DCs und JAM-C (junctional adhesion molecule) auf Thrombozyten. Die Koinkubation beider Zelltypen führte zu einer Aktivierung der DCs, welche durch eine erhöhte Expression von CD83 und durch eine erhöhte T-Zell-stimulatorische Kapazität charakterisiert wurde. Eine fortschreitende Koinkubation führte zur Phagozytose der Thrombozyten durch die DCs und als Folge dessen zur Apoptose der DCs (Langer et al., 2007).

Auch ein Einfluss von Thrombozyten auf das Zytokinprofil von DCs wurde beschrieben. So können Thrombozyten, welche durch Scherstress aktiviert wurden, die Produktion von IL-10 durch DCs induzieren (Hagihara et al., 2004).

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) während der Arteriosklerose ist ein entscheidender Vorgang, beispielsweise wird durch ROS LDL zu oxLDL oxidiert. Die reaktiven Sauerstoffspezies haben allerdings auch einen Einfluss auf an der Inflammation beteiligte Zellen. Zhu et al. konnten 2009 zeigen, dass vaskulärer oxidativer Stress bei dendritischen Zellen zu einer Aktivierung und somit zu Adhäsion und Transmigration führt (Zhu et al., 2009). Sheng et al. untersuchten den Einfluss intrazellulär gebildeter reaktiver Sauerstoffspezies auf die Differenzierung von Knochenmarksvorläuferzellen zu dendritischen Zellen. Sie zeigten, dass die Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von ROS während der Differenzierung wichtig ist für die Generierung dendritischer Zellen (Sheng et al., 2010).

ROS werden jedoch nicht nur von Makrophagen gebildet, es ist auch bekannt, dass Thrombozyten in der Lage sind reaktive Sauerstoffspezies zu generieren. Begonja et al. konnten zeigen, dass aktivierte Thrombozyten ROS produzieren und dass die Bildung der ROS nach Verwendung von NADPH-Oxidase-Inhibitoren reduziert war (Begonja et al., 2005).

Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von dendritischen Zellen mit Überständen von Thrombozytenkulturen zu einer Aktivierung der DCs führt, sowie zu einer Bildung reaktiver Sauerstoffspezies innerhalb der DCs.

Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertation sollten die Auswirkungen von intrazellulär gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf den Phänotyp und die Funktion von Knochenmarksabgeleiteten dendritischen Zellen (BM-DCs) untersucht werden. Dazu wurden BM-DCs mit verschiedenen Stimulanzen behandelt und die Generierung von ROS über eine Zeitspanne von bis zu zwei Stunden detektiert. Gleichzeitig wurde die Expression von MHCII analysiert. Auch der Einfluss der unterschiedlichen Stimulanzen und der hervorgerufenen ROS-Produktion auf die Maturierung der DCs nach einem Zeitraum von 24 Stunden wurde untersucht, sowie mögliche daraus resultierende Effekte auf die T-Zellstimulatorische Kapazität. Ein weiterer Aspekt war die Analyse der Auswirkungen einer Inhibition der ROS-Produktion. Dazu wurden zwei unterschiedliche ROS-Inhibitoren verwendet, sowie BM-DCs, die aufgrund eines knock-outs keine ROS mittels der NADPH-Oxidase produzieren können.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollten die Interaktionen zwischen dendritischen Zellen und Thrombozyten analysiert werden. Die Analyse erfolgte, im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung der DCs an einer Thrombusbildung, auf Basis der Aggregometrie. Untersucht wurden mögliche zugrunde liegende Mechanismen, welche eine Aggregation zwischen DCs und Thrombozyten ermöglichen. Da im Verlauf der Arbeit gezeigt werden konnte, dass DCs in der Lage sind Tissue Factor und Thrombin zu exprimieren bzw. zu generieren, wurden sowohl zwei verschiedene Tissue Factor-Inhibitoren, als auch drei verschiedene Thrombininhibitoren verwendet. Weiterhin wurde die Beteiligung von Oberflächenrezeptoren wie CD18 und PSGL-1 untersucht. Auch ein möglicher Einfluss von Fc-Rezeptoren auf die Aggregationsfähigkeit wurde in dieser Arbeit analysiert.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Aggregometer	APACT 4S Plus	DiaSys Greiner, Flacht
Analysenwaage	Precisa 120A	Otto Mild Waagen, Karlsruhe
Autoklav	V-150	Systec GmbH, Wetterberg
Brutschrank	CB 150, CB 210	Binder, Tutlingen
Digitalwaage	Basic Typ 1202	Sartorius, München
Dispenser	Multipette® 4780	Eppendorf, Hamburg
Durchflusszytometer	FACSCanto II	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA-Washer	Ultrawash plus	Dynex, Chantilly, USA
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX50WI	Olympus, Hamburg
Fluorometer/Luminometer	Fluoroskan Ascent FL	Thermo Scientific, Waltham, USA
Folien-Einschweiß-Gerät	Heat Sealer 1295-012	Audion Elektro, Kleve
Hämozytometer	Neubauer Improved, Bright Line, 0,1 mm	AO Spencer, Buffalo, USA
Magnetrührer	IKAMAG®Reo	Janke & Kunkel, Staufen
Mehrkanalpipetten	Finpipette, 8-Kanal-pipette 30 – 300 µl	Thermo Scientific, Waltham, USA
	Finpipette, 12-Kanal-pipette 50 – 300 µl	Labsystems, Helsinki, Finnland
Mikroskope	CK2	Olympus, Hamburg
	CH2	
pH-Meter	CG840 mit Einstabmesskette N2042	Schott, Hofheim a. Taunus

Gerät	Modell	Hersteller
Pipetten	0,5 – 10 µl 1 – 10 µl 100 – 1000 µl	Thermo Scientific, Waltham, USA
	20 – 200 µl	ErgoOne, Starlab GmbH, Ahrensburg
	Finpipette 5 – 40 µl	Labsystems, Helsinki, Finnland
Pipettierhilfen	Pipetus®A-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
	Pipetboy plus	Tecnomara, Zürich, Schweiz
Präparierbesteck	-	Hammacher, Solingen
Reagenzglasschüttler	Vortex Genie 2™	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Sterilwerkbank	HeraeusLamin Air®HB 2448	Heraeus, Hanau
Szintillationszähler	1205 Betaplate	LKB Wallac, Freiburg
Wasserbad	GFL Typ 1012	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wasserdeionisierungs- anlage	Purelab Classic DI	ELGA, Bucks, Großbritannien
Zählhilfe	Laboratory Counter	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellerntegerät	MACH II/SN 453	Tomtec, Hamden, USA
Zentrifugen	Sorvall RT 6000D Biofuge	Du Pont, Bad Homburg Heraeus, Wiesbaden
	Biofuge primo	Heraeus, Hanau
	Multifuge 1 L-R (300 g = 1.200 rpm)	Heraeus, Hanau

Gerät	Modell	Hersteller
Zentrifugen	Megafuge 40R	Heraeus, Hanau
	Allegra X-30R Centrifuge	Beckman Coulter™, Brea, USA
Zellzählgerät	KX-21N	Sysmex, Norderstedt

2.1.2. Labor- und Verbrauchsmaterial

Material	Modell	Hersteller
Alufolie	30u-Qualität	Roth, Karlsruhe
Bakteriologische Petrischalen	Ø 94 mm, Höhe 16 mm	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Dispensiergerätaufsatz	PD-Tips 2,5 ml und 5 ml	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim/Main
Einfrierbox	Cryo 1 Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Einfriereröhrchen	Nunc cryo Tube™ vials	Nunc, Roskilde, Dänemark
Einmalkanülen	0,7 x 30 mm Sterican®	Becton Dickinson, Heidelberg
	0,5 x 16 mm Sterican®	B/Braun, Melsungen
Einmalspritzen	Omnifix® 1 ml	B/Braun, Melsungen
	10ml Discardit™ II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einschweißfolien	102 x 258 mm	PerkinElmer, Waltham, USA

Material	Modell	Hersteller
FACS-Röhrchen	Falcon 5 ml Rundbodenröhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Glasfaserfilter	102 x 258 mm	PerkinElmer, Waltham, USA
Glaspipetten	Precicolor 5, 10 und 25 ml	Hilgenberg GmbH, Malsfeld
	Techcolor 5, 10 und 25 ml	Hischmann Laborgeräte, Eberstadt
	Silberbrand Eterna 5, 10 und 25 ml	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim/Main
Handschuhe	Sempercare®	Semperit, Wien, Österreich
Hautantiseptikum, alkoholisch	Octeniderm® farblos	Schülke, Norderstedt
Kanüle	Safety-Multifly®-Set	Sarstedt AG, Nümbrecht
Kulturplatten	Cellstar Gewebekulturplatte, 6-Loch, Flachboden	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
	Cellstar Gewebekulturplatte, 6-Loch, Flachboden, non-treated	
	Cellstar Gewebekulturplatte, 96-Loch, Flachboden	
Küvetten	Mikro-Planküvetten inkl. Mixer 1x4 mm	DiaSys Greiner, Flacht
Objektträger	76 x 26 cm Mattrand	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
S-Monovette ®	4,3 ml 9NC	Sarstedt AG, Nümbrecht
	10 ml 9NC	

Material	Modell	Hersteller
Nylonwolle	MKN-100 Nylon Wool Fiber	Kisker Biotech, Steinfurt
Parafilm	Parafilm N	Nationalcam™, Chicago, USA
Pasteurpipetten	150 mm	VWR GmbH, Darmstadt
Pipettenspitzen	Gelbe Spitzen: bis 200 µl	Sarstedt AG, Nümbrecht
	Blaue Spitzen: bis 1000 µl	Roth, Karlsruhe
	Kristallspitzen: Tip one 0,1 – 10 µl	Starlab GmbH, Ahrensburg
	Weißer Spitzen: bis 200 µl	Starlab International GmbH, Hamburg
Plastikpipetten	Cellstar 5, 10, 25 und 25 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen	15 ml und 50 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	0,5 ml; 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht
Reaktionsge- fäße ("Safe-Lock")	0,5 ml; 1 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Rundbodenreaktionsgefäß	13 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Spritzenvorsatzfilter	0,45 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
	0,2 µm	Sarstedt AG, Nümbrecht

Material	Modell	Hersteller
Transferpipette	3,5 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht
Zellsieb	Cell Strainer: Ø 40 µm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller/Vertrieb
2-Methyl-2-butanol (tert. Amylalkohol)	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Alkopharm 70 (Ethanol 70%)	Brüggemann, Heilbronn
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Roth, Karlsruhe
Apocynin	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Roth; Karlsruhe
BSA (Rinderserumalbumin)	PAA Laboratories, Cölbe
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Chelerythrin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylformamid (DMF)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulphoxide (DMSO) Hybri-max®	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol 96 %, vergällt	BD, Karlsruhe
Ethyldiamintetraessigsäure, Na ₂ -Salz x 2 H ₂ O (EDTA)	Roth, Karlsruhe
FCS (Fetal Calf Serum)	Gibco, Paisley, UK
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Forene® (Isofluran)	Abbott GmbH & Co. KG., Wiesbaden
Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutamin L(+) (C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃)	Roth, Karlsruhe
HBSS (Hank's balanced salt solution)	Sigma-Aldrich, Steinheim
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol (2-Propanol, C ₃ H ₈ O)	Hedinger, Stuttgart
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt

Substanz	Hersteller/Vertrieb
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)	Riedel-de Haën, Seelze
Lipopolysaccharid (LPS); E. coli	Calbiochem, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck, Darmstadt
Methanol	Mallinckrodt-Baker, Deventer, Niederlande
Natriumacetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN_3)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)	Roth, Karlsruhe
Natriumdisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
Phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure 37%, (HCl)	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Roth, Karlsruhe
Szintillationsflüssigkeit	Roth, Karlsruhe
Terralin liquid	Schülke, Norderstedt
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween®20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasser, pyrogenfrei, steril (Aqua B. Braun)	B/Braun, Melsungen
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Merck, Darmstadt

2.1.4. Lösungen, Puffer und Kulturmedien

Für die Herstellung der Puffer und Lösungen wurde das Wasser der hauseigenen Deionisierungsanlage (ELGA, Bucks, Großbritannien) verwendet. Die Kulturmedien, Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C gelagert.

2.1.4.1. Allgemein verwendete Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
DPBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline)	Gibco, Paisley, UK
Ethanol 70%	Hergestellt aus 96% Ethanol und entionisiertem Wasser
FACS-Fixierungslösung (0,7% PFA)	0,7g PFA wurden bei 56°C in 100 ml 1xPBS (pH 7,2) gelöst
FACS-Medium	In 1xPBS wurden 2% (v/v) FCS verdünnt (filtriert; 0,4 µm)
FACS-Puffer	In 1xPBS/2 mM EDTA wurden 2% (v/v) FCS verdünnt (filtriert; 0,4 µm)
Gey'scher Lysepuffer	0,25 g KHCO ₃ , 2,07 g Ammoniumchlorid und 0,0093 g EDTA wurden in 250 ml entionisiertem Wasser gelöst, pH 7,5 eingestellt und sterilfiltriert (0,2 µm)
HBSS(Hank's balanced salt solution)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetatlösung	4,1 g C ₂ H ₃ NaO ₂ wurden in 500 ml entionisiertem Wasser gelöst
1xPBS (Phosphate buffered saline)	40,2 g NaCl und 7,8 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O wurden in 5 Liter entionisiertem Wasser gelöst, pH 7,2 eingestellt mit 10 M NaOH und die Lösung anschließend autoklaviert
1xPBS/2mM EDTA	745 mg EDTA wurden in 1 Liter 1xPBS (pH 7,2) gelöst und anschließend autoklaviert

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
10xPBS	402 g NaCl und 78 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O wurden in 5 L entionisiertem H ₂ O gelöst, pH 6,6 eingestellt mit 10 M NaOH, anschließend wurde die Lösung autoklaviert
Trypanblau-Stammlösung (0,4% v/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau-Gebrauchslösung (0,1% v/v)	Verdünnung der Trypanblau-Stammlösung im Verhältnis 1:4 in 1xPBS
Tyrodes-Puffer	In destilliertem Wasser wurden gelöst: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,42 mM Na ₂ HPO ₄ , 12 mM NaHCO ₃ , 5,5 mM Glucose, 5 mM HEPES

2.1.5. Medien und Supplemente für Zellkulturen

Zur Kultivierung der steril aus den Versuchstieren entnommenen Organe bzw. der daraus gewonnenen Zellen wurden die Puffer, Kultur- und Waschmedien mit fötalem Kälberserum versetzt, welches als Nährstoffquelle für die Zellen dient und sehr entscheidend für das Wachstum der Zellen ist. Das FCS war mycoplasmenfrei und steril. Zur Langzeitaufbewahrung wurde es in Aliquoten bei –20°C und zur kurzzeitigen Verwendung bei 4°C gelagert.

Medium/Supplement	Zusammensetzung/Vertrieb
FCS	Gibco, Paisley, UK
Glutamin (200 mM)	Supplement in Kulturmedien; 5,84 g/L (+)-Glutamin (Roth, Karlsruhe) wurden in 200 ml 1xPBS gelöst und sterilfiltriert (0,2 µm), 1%ig eingesetzt in Kulturmedium

Medium/Supplement	Zusammensetzung/Vertrieb
β -Mercaptoethanol (5 mM)	40 μ l β -Mercaptoethanol wurden in 114 ml IMDM verdünnt und sterilfiltriert (0,2 μ m), 1%ig eingesetzt in Kulturmedien
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Mischung aus 10^4 IU/ml Penicillin und 10^4 μ g/ml Streptomycin; 1%ig eingesetzt in Kulturmedien und Waschmedien zum Schutz vor Verkeimung
Humanes Plasma	Das Plasma wurde durch 30 minütiges Erhitzen bei 56°C inaktiviert, es wurden 2% (v/v) autologes Plasma zu den Kulturen gegeben
Einfriermedium für humane PBMC	Pro Kryoröhrchen: 450 μ l Kulturmedium für humane DCs 450 μ l autologes Plasma 100 μ l DMSO
EMEM (Eagle's Minimum Essentiell Medium)	Sigma-Aldrich, Steinheim
IMDM (Iscoe's Modified Dilbecco's Medium)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kulturmedium für murine BM-DCs	IMDM mit folgenden Supplementen: 5% (v/v) FCS 1% (v/v) Pen/Strep 2 mM L-Glutamin 50 μ M β -Mercaptoethanol 5% (v/v) GM-CSF (Überstand der GM-CSF-produzierenden Zelllinie X63 GM-CSF)
Kulturmedium für humane DCs	IMDM mit folgenden Supplementen: 50 μ M β -Mercaptoethanol 1% (v/v) Pen/Strep
Waschmedium für murine BM-DCs	EMEM mit folgenden Supplementen: 2% (v/v) FCS 1% (v/v) Pen/Strep

2.1.6. Antikörper

2.1.6.1. Antikörper zum Absättigen freier Fc-Rezeptoren

Um unspezifische Bindungen der FACS-Antikörper an Fc-Rezeptoren der Zellen zu verhindern, wurden die Zellen vor der eigentlichen Antikörperfärbung mit einem blockierenden Antikörper inkubiert.

Bei den murinen BM-DCs wurde der Antikörper 2.4G2 verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Ratte-anti-Maus Fc γ RII/III (CD16/32) Antikörper des Isotyps Ratte-IgG2b (Unkeless, 1979), gewonnen aus dem Kulturüberstand des B-Zell-Hybridoms 2.4G2. Eingesetzt wurde der Antikörper in einer Konzentration von 0,25 μ g pro Probe.

Bei humanen DCs wurde das Fc-Rezeptor Blocking Reagent verwendet, welches von Miltenyi Biotec bezogen wurde. Eingesetzt wurde es in einer 1:10 Verdünnung.

2.1.6.2. Antikörper zur FACS-Färbung

Antikörper gegen	Isotyp	Klon	Markierung	Verdünnung	Firma
Maus CD11c	Hamster IgG	N418	FITC	1:50	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Maus CD11c	Hamster IgG	N418	PE	1:50	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Maus MHCII	Ratte IgG2b	M5/114	PE-Cy5	1:3000	eBioscience, San Diego, USA
Maus CD86	Ratte IgG2a	GL1	PE	1:100	eBioscience, San Diego, USA
Human HLA-DR	Maus IgG2a, κ	L243	FITC	1:100	BioLegend, San Diego, USA

Antikörper gegen	Isotyp	Klon	Markierung	Verdünnung	Firma
Human CD80	Maus IgG1, κ	2D10.4	PE-Cy5	1:200	eBioscience, San Diego, USA
Human CD83	Maus IgG1, κ	HB15e	PE	1:30	eBioscience, San Diego, USA
Human CD86	Maus IgG2b, κ	IT2.2	APC	1:200	BioLegend, San Diego, USA
Human Tissue Factor (CD142)	Maus IgG1	VIC7	FITC	1:20	Sekisui Diagnostics, LLC; Stamford, USA

2.1.6.3. Farbstoff zur Detektion von intrazellulär gebildetem ROS

Zur Detektion von intrazellulär gebildetem ROS wurde der Farbstoff CM-DCF-DA der Firma Invitrogen verwendet. Eingesetzt wurde der Farbstoff in einer Endkonzentration von 5 μM pro 1×10^6 Zellen in 1ml Medium und für eine halbe Stunde inkubiert. Dadurch kann der noch nicht fluoreszierende Farbstoff in die Zelle diffundieren. Nach Ablauf der halben Stunde wurden die Zellen entweder mit verschiedenen Substanzen stimuliert oder unstimuliert belassen. Kommt es in der Zelle zu einer Produktion von ROS, so wird der Farbstoff hydrolysiert und wird fluoreszent.

2.1.6.4. Isotypkontrollantikörper für die FACS-Färbung

Antikörper	Klon	Markierung	Verdünnung	Firma
Hamster IgG	eBio299Arm	FITC	1:100	eBioscience, San Diego, USA

Antikörper	Klon	Markierung	Verdünnung	Firma
Hamster IgG	A19-3	PE	1:100	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte IgG2a	eBR2a	PE	1:100	eBioscience, San Diego, USA
Ratte IgG2a	eBR2a	PE-Cy5	1:500	BD Biosciences, Heidelberg
Maus IgG1	203	PE	1:30	Immuno Tools, Friesoythe
Maus IgG1	MOPC-21	PE-Cy5	1:200	BioLegend, San Diego, USA
Maus IgG1	X39/X40	FITC	1:20	BD Biosciences, Heidelberg
Maus IgG2a	5.205	FITC	1:100	Caltag Laboratories, Buckingham, UK
Maus IgG2b	PLRV219	APC	1:200	Immuno Tools, Friesoythe

2.1.7. Allgemein verwendete Zytokine und Mediatoren

Rm GM-CSF X63

Das GM-CSF stammt aus dem Kulturüberstand der GM-CSF-produzierenden Zelllinie X63/GM-CSF. Der Kulturüberstand wurde 5%ig (v/v) im Kulturmedium der BM-DCs eingesetzt.

Rh IFN- γ

Das rekombinant humane IFN- γ wurde von der Firma BioLegend, San Diego, USA bezogen und zur Generierung von IFN- γ -DCs verwendet. Dazu wurden es den DC-Kulturen ab Tag 3 in einer Konzentration von 1000 IU/ml hinzugefügt.

Rh IL-4

Das rekombinante humane IL-4 wurde von der Firma ImmunoTools, Friesoythe bezogen und zur Kultivierung der humanen DCs in einer Konzentration von 10 ng/ml dem Kulturmedium hinzugefügt.

Rh IL-10

Das rekombinante humane IL-10 wurde von der Firma ImmunoTools, Friesoythe bezogen und zur Generierung tolerogener DCs verwendet. Dazu wurde es den DC-Kulturen ab Tag 0 in einer Konzentration von 20 ng/ml hinzugefügt.

Rh GM-CSF

Das rekombinante humane GM-CSF wurde von der Firma Genzyme, Cambridge, USA bezogen und zur Kultivierung der humanen DCs in einer Konzentration von 200 IU/ml dem Kulturmedium hinzugefügt.

Rh TNF- α

Das rekombinante humane TNF- α wurde von der Firma ImmunoTools, Friesoythe bezogen und zur Ausreifung der humanen DCs verwendet. Dazu wurde es in einer Konzentration von 10 ng/ml an Tag 6 dem Kulturmedium hinzugefügt.

Rh IL-1 β

Das rekombinante humane IL-1 β wurde von der Firma ImmunoTools, Friesoythe bezogen und zur Ausreifung der humanen DCs verwendet. Es wurde in einer Konzentration von 10 ng/ml an Tag 6 dem Kulturmedium hinzugefügt.

PGE₂

Das humane PGE₂ wurde von der Firma Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, USA bezogen und zur Ausreifung der humanen DCs verwendet. Dazu wurde es in einer Konzentration von 1 μ g/ml an Tag 6 dem Kulturmedium hinzugefügt.

2.1.8. In der Aggregometrie verwendete Substanzen

Thrombin

Das für die Aggregation verwendete bovine Thrombin (Sigma-Aldrich, Steinheim) hatte eine Ausgangskonzentration von 100 U/ml. Es wurde für die Messungen in 1xPBS verdünnt.

ADP

Das verwendete ADP (Sigma-Aldrich, Steinheim) hatte eine Stammkonzentration von 5 mM und wurde für die Versuche in 1xPBS verdünnt.

PPack

Der Thrombininhibitor PPack (Calbiochem, La Jolla, USA) hatte eine Ausgangskonzentration von 10 mM/ml.

Arixtra

Der Thrombininhibitor Arixtra (GlaxoSmithKline, London, UK) hatte eine Ausgangskonzentration von 125 µg/ml.

Fragmin

Der Thrombininhibitor Fragmin (Pfizer, New York City, USA) hatte eine Ausgangskonzentration von 250 U/ml.

Anti CD18

Für humane DCs wurde der Antikörper von der Firma BioLegend, San Diego, USA bezogen und in einer Konzentration von 62,5 µg/ml eingesetzt.

Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)

Der TFPI wurde von der Firma R&D Systems bezogen und hatte eine Konzentration von 100 µg/ml (entspricht 3230 nM/ml). Verdünnt wurde der Inhibitor mit HBSS.

Apyrase

Die Apyrase (Sigma-Aldrich, Steinheim) hatte eine Ausgangskonzentration von 500 U/ml und wurde in PBS verdünnt.

Anti Tissue Factor-Antikörper

Der anti Tissue Factor-Antikörper wurde freundlicherweise von PD Dr. Kerstin Jurk zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um ein F'ab-Fragment (Klon: CNTO859). Der Antikörper hatte eine Konzentration von 5 mg/ml und wurde in HBSS verdünnt (Endkonzentration: 50 µg/ml).

Anti PSGL-1

Der Antikörper wurde von der Firma BioLegend, San Diego, USA bezogen.

Anti FcγRIIb

Der Antikörper wurde von der Firma Adipogen, Liestal, Schweiz und in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt.

2.1.9. Substanzen für die Thrombin-Generierung mittels Calibrated-Automated-Thrombogram (CAT)

Thrombin-Kalibrator

Bezogen wurde der Kalibrator von der Firma Stago, Asnières sur Seine, Frankreich. Der Kalibrator dient als Referenz, um den Thrombingehalt in den jeweiligen Proben genau bestimmen zu können.

PRP-Reagenz

Das PRP-Reagenz wurde von der Firma Stago, Asnières sur Seine, Frankreich bezogen. Es enthält Tissue Faktor in einer Konzentration von 6 pM, so dass später im Test final eine Konzentration von 1 pM erreicht wurde.

FluCa-Substrat

Das FluCa-Substrat wurde von der Firma Stago, Asnières sur Seine, Frankreich bezogen. Das Substrat wird für jede Messung frisch angesetzt. Dabei werden das fluorogene Substrat und der Fluo-Puffer in einem Verhältnis von 1:40 vermischt. Das fluorogene Substrat wird durch das während der Messung entstehende Thrombin hydrolysiert und wird fluoreszent.

Bovines Thrombin

Das bovine Thrombin wurde von der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim bezogen und hatte eine Ausgangskonzentration von 100 U/ml. Es wurde für die

Thrombingenerierungsmessung mit Tyrodes-Puffer auf eine Gebrauchskonzentration von 0,5 U/ml verdünnt (final pro well: 0,1 U/ml).

2.1.10. Versuchstiere

Für die Versuche wurden 4 bis 12 Wochen alte Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 (Genotyp H-2^b) und Inzuchtmäuse des Stammes BALB/cJ (Genotyp H-2^d) verwendet sowie Mäuse des Stammes C57BL/6 gp91^{phox -/-}, die freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Daiber zur Verfügung gestellt wurden. Letzterer Mausstamm ist defizient für die Untereinheit gp91phox der NADPH-Oxidase. Die Versuchstiere wurden von der zentralen Versuchstiereinrichtung der Universität Mainz (ZVTE) bezogen und unter SPF-Bedingungen (specific pathogen free) gehalten.

2.1.11. Buffy Coats

Buffy Coats zur Generierung humaner Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen aus PBMCs wurden von der Transfusionszentrale Mainz bezogen. Buffy Coats enthalten eine höhere Konzentration an Leukozyten und Thrombozyten als Vollblut, da durch Zentrifugation der größte Teil der Erythrozyten und des Plasmas entfernt wurde.

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1. Allgemeine Bedingungen

Um eine Kontamination zu vermeiden, wurden alle Zellkulturarbeiten ausschließlich unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Alle verwendeten Substanzen und Lösungen waren autoklaviert, sterilfiltriert oder wurden vom Hersteller steril bezogen. Auch die verwendeten Verbrauchsmaterialien waren steril. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen (37°C, 10% CO₂, wasserdampfgesättigte Atmosphäre) in CO₂-begasten Brutschränken kultiviert.

2.2.2. Bestimmung der Lebendzellzahl

Durch eine Färbung mit Trypanblau wurde die Anzahl der lebenden Zellen in der Zellsuspension ermittelt. Durch das Trypanblau werden Zellen, deren Zellmembran nicht intakt ist, blau gefärbt und können so gut von lebenden Zellen unterschieden werden. Eine Probe der resuspendierten Zellsuspension wurde in Trypanblau verdünnt (1:2 ; 1:5 ; 1:10) und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Mit Hilfe der folgenden Formel konnte die Lebendgesamtzellzahl (LGZZ) ermittelt werden:

$$\text{LGZZ} = \text{Zellen in einem Großquadrant} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} \times 10^4 \times \text{Volumen (ml)}$$

2.2.3. Zellbiologische Methoden für murine Arbeiten

2.2.3.1. Präparation von Knochenmarkszellen

Für die Gewinnung der BM-DCs (**b**one **m**arrow derived **d**endritic **c**ells) wurde das von Scheicher *et al.* (1992) ursprünglich publizierte Verfahren, modifiziert nach Lutz *et al.* (2002) und Gisch *et al.* (2007), angewandt.

Dazu wurde das Knochenmark aus den Femuren und Tibien 4-12 Wochen alter C57BL/6 Mäuse isoliert. Die Tiere wurden getötet und die Femuren und Tibien beider Hinterbeine freipräpariert. Anschließend wurden die Knochen kurz in 70%igem Ethanol desinfiziert und in kaltem Waschmedium aufbewahrt. Noch am Knochen befindliche Muskelreste wurden durch Säubern mit einem in 70%igem Ethanol getränkten Tuch entfernt. Die Gelenkköpfe wurden mit einer Schere abgetrennt, und das Knochenmark wurde mit 1 ml kalter Waschlösung mit einer 1 ml Spritze mit aufgesetzter 0,5 mm (Tibia)- bzw. 0,7 mm (Femur)-Kanüle aus dem Knochen in eine frische Petrischale gespült. Durch mehrmaliges Aufziehen in die Spritze wurden die Zellen vereinzelt. Die Einzelzellsuspension wurde anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten bei 4°C und 300xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment aufgebrochen. Für die folgende Lyse der Erythrozyten wurde 1 ml Gey'scher Lyse-Puffer pro präparierter Maus zu den Zellen gegeben und für eine Minute unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 40 ml kaltem Waschmedium wurde die Lyse gestoppt.

Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (10 min, 4°C, 300xg) und anschließend zwei Mal mit je 30 ml kaltem Waschmedium gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 10 ml BM-DC-Kulturmedium je Maus aufgenommen und die Zellzahl wurde bestimmt.

2.2.3.2. Kultivierung von Knochenmarkszellen

Je 2×10^6 der frisch gewonnenen Knochenmarkszellen wurden in 10 ml BM-DC-Kulturmedium in bakteriologischen Petrischalen ausgesät und über einen Zeitraum von 7 Tagen bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. An Tag 3 und Tag 6 wurden die Zellen durch Zugabe von 5 ml BM-DC-Kulturmedium gefüttert.

2.2.3.3. Stimulation der BM-DC

An Tag 7 der Kultur wurden die BM-DCs geerntet. Dafür wurden die Zellen durch sanftes Spülen mit einer 10 ml Glaspipette resuspendiert und in 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei RT und 300xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment aufgebrochen und die Zellen vereint. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

Je 1×10^6 der geernteten BM-DC wurden in 2 ml Kulturmedium in ein Loch einer nicht-behandelten bakteriologischen 6-Loch-Platte ausgesät. Danach wurden die Zellen für weitere 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag (Tag 8) wurde das Volumen innerhalb der Löcher auf 1 ml reduziert.

Anschließend wurden die Zellen entweder mit LPS (1,5 µg/ml final), PDBu (0,1 µM bzw. 10 µM final) oder PMA (10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml) stimuliert. Um immature BM-DC zu erhalten, wurde der Zellkultur keine stimulierende Substanz hinzugefügt.

2.2.3.4. Ernten der BM-DC

Die Zellen wurden in bestimmten Zeitabständen (15 Minuten, 45 Minuten, 2 Stunden oder 24 Stunden) nach der Stimulierung geerntet. Dazu wurden die Zellen wieder

vorsichtig abgespült und in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (10 min, 300xg, RT), der Überstand verworfen und das Zellpellet aufgebrochen. Um die im Zellkulturüberstand enthaltenen Zytokine zu detektieren, wurde von den nach 24 Stunden geernteten BM-DCs ein Teil des Überstandes (500 µl) nach dem Zentrifugieren in 500 µl Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden noch zwei Mal mit je 10 ml DPBS gewaschen und anschließend entweder in FACS-Medium aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt oder für eine MLR in Kulturmedium aufgenommen.

2.2.3.5. Präparation von Milzzellen

Die Maus, bzw. die Mäuse wurden getötet, die Milzen steril entnommen und in einem 50 ml Polypropylenröhrchen gesammelt, das mit 5 ml eiskaltem Waschmedium gefüllt war. Für den Organaufschluss wurden die Milzen in eine 94 mm bakteriologische Petrischale überführt. Die Milzen wurden mit abgeflammt Objekträgern zerschnitten und anschließend zwischen den aufgerauten Enden zweier Mattrandobjekträger zerrieben. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit einer 10 ml Stangenpipette durch ein 40 µm Nylon-Zellsieb in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt. Die Petrischale und die Objekträger wurden mit weiteren 10 ml Waschmedium ausgespült und diese ebenfalls über das Zellsieb gegeben. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (4°C, 300xg, 10 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet aufgebrochen. Die Erythrozytenlyse erfolgte durch Zugabe von 1 ml Gey'schen Lysepuffer pro Milz für eine Minute bei RT. Die Lyse wurde durch Zugabe von 30 ml kaltem Waschmedium abgestoppt. Es folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte (4°C, 300xg, 10 min) mit je 10 ml Waschmedium pro Milz, um die Reste des Lysepuffers auszuwaschen. Anschließend wurden die Zellen von 1 - 2 Milzen in 1 ml warmem Waschmedium aufgenommen.

2.2.3.6. T-Lymphozyten-Aufreinigung aus Milzzellen über Nylonwolle-Säulen

Zur Herstellung der Nylonwolle-Säulen wurden pro Säule 0,6 g Nylonwolle abgewogen und mit Hilfe von zwei Hakenpinzetten von Knötchen befreit. Die Nylonwolle wurde anschließend in eine 10 ml Spritze überführt und diese in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und autoklaviert.

Für die Aufreinigung der T-Lymphozyten wurde die Nylonwolle-Säule zunächst äquilibriert. Dazu wurden 20 ml Waschmedium auf die Säule gegeben, mit einer sterilisierten Pinzette wurden vorhandene Luftblasen herausgedrückt und dabei das Volumen der Nylonwolle auf 6 ml reduziert. Das 50 ml Reaktionsgefäß wurde wieder verschlossen und für 45 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Säule mit 20 ml frischem, auf 37°C vorgewärmtem Waschmedium gespült. Die präparierten Milzzellen (siehe 2.2.3.5) wurden vorsichtig mittig auf die Säule getropft. Pro Säule können maximal Zellen von zwei Milzen aufgereinigt werden, das heißt auf jede Säule wurde 1 ml Zellsuspension gegeben. Damit die Zellen nicht austrocknen, wurden anschließend nochmals 500 µl warmes Waschmedium auf die Säule getropft. Die Säule wurde dann für 45 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnten die T-Lymphozyten eluiert werden. Dazu wurde der Deckel eines frischen 50 ml Reaktionsgefäßes mit 70%igem Alkohol desinfiziert und mit einer 0,7 x 30 mm Kanüle durchstoßen. Die Säule wurde mit einer sterilisierten Pinzette aus dem Reaktionsgefäß entnommen, auf eine frische 0,7 x 30 mm Kanüle gesteckt und in das vorgestochene Loch im Deckel des frischen 50 ml Reaktionsgefäßes gesteckt. Anschließend wurden die Zellen mit insgesamt 20 ml warmem Waschmedium eluiert, wobei die Durchflussschwindigkeit ungefähr einen Tropfen pro Sekunde betrug. Dies wurde durch Drehen des Deckels eingestellt. Nach dem Eluieren wurde ein neuer Deckel auf das Reaktionsgefäß aufgesetzt und die Zellen für 10 Minuten bei 4°C und 300xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet aufgebrochen. Anschließend wurden die Zellen in warmem Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl wurde bestimmt.

2.2.3.7. MLR (gemischte Lymphozyten Reaktion)

Mit Hilfe der MLR (**m**ixed **l**ymphocyte **r**eaction) wird die T-Zellstimulatorische Kapazität der dendritischen Zellen ermittelt. Die alloreaktiven T-Zellen werden durch Koinkubation mit den dendritischen Zellen zur Proliferation angeregt, wobei die Stärke der Proliferation unter anderem abhängig ist vom Aktivierungszustand der DC. Um die Stärke der Proliferation zu detektieren, wird der Kokultur Tritium-markiertes Thymidin ($^3\text{HTdR}$) zugegeben, welches in die DNA der sich teilenden Zellen eingebaut wird. Die anschließend gemessene Radioaktivität steht in direkter Relation zur Anzahl der proliferierten Zellen.

Durchführung:

Die wie unter 2.2.3.1 f. beschrieben generierten BM-DCs wurden auf eine Zellzahl von $5 \times 10^5/\text{ml}$ eingestellt, und die über Nylonwolle-Säulen aufgereinigten T-Lymphozyten (siehe 2.2.3.6.) wurden auf eine Konzentration von $3 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt. Die BM-DCs wurden in Triplikatansätzen über sieben Stufen in einer 96-Loch-Flachboden-Platte seriell 1:3 verdünnt aufgetragen. Die anfängliche Zellzahl betrug dabei 5×10^4 Zellen pro Loch. Von den aufgereinigten T-Zellen wurden 3×10^5 Zellen in jedes Loch pipettiert, lediglich in die letzten drei Vertiefungen jeder Titrationsreihe wurden keine T-Zellen hinzugefügt. Diese drei Ansätze dienten als Kontrolle, um die Eigenproliferation der BM-DCs zu detektieren. Als weitere Kontrolle wurde ein Triplikatansatz nur mit T-Zellen angelegt.

Die MLR wurde für 72 Stunden bei 37°C und 10% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde in jedes Loch $0,25 \mu\text{Ci } ^3\text{HTdR}$ zugegeben und die Platten für weitere 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die MLR gestoppt, indem die Platten bei -20°C weggefroren oder direkt geerntet wurden. Waren die Platten eingefroren, so wurden diese vor dem Ernten wieder aufgetaut. Mit Hilfe eines Zellerntegerätes wurden die Zellen mit destilliertem Wasser auf eine Filtermembran übertragen. Dabei lysieren die Zellen und die DNA wird auf der Filtermembran freigesetzt. Überschüssiges $^3\text{HTdR}$ und mögliche Zellreste wurden durch Spülen mit destilliertem Wasser entfernt. Die Filtermembran wurde anschließend in der Mikrowelle getrocknet und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in einer Plastikfolie eingeschweißt. Die in die DNA eingebundene Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Szintillationszählers als „counts per minute“ (cpm) gemessen.

2.2.3.8. Blutentnahme

Zur Generierung von plättchenreichem Plasma (PRP) und plättchenarmem Plasma (PPP) wurde den Mäusen Blut aus dem retro-orbitalen Plexus entnommen. Dazu wurden die Tiere zunächst mit Isofluran betäubt. Danach wurde mit einer silanisierten Pasteurpipette durch leichtes und vorsichtiges Drehen Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Anschließend wurde das Blut in ein mit 50µl Natriumcitrat gefülltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und vorsichtig invertiert.

2.2.3.9. Generierung von plättchenreichem und plättchenarmem Plasma

Das entnommene Natriumcitrat-haltige Blut wurde für 10 Minuten bei RT und 100xg ohne Bremse zentrifugiert. Der gelblich-trübe Überstand, das PRP, wurde vorsichtig mit einer Transferpipette abgenommen, ohne die Trennschicht aufzuwirbeln, und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das PRP der einzelnen Mäuse wurde vereint. Um das PPP zu erhalten, wurden die restlichen Zellen erneut zentrifugiert für 10 Minuten bei RT und 2400xg mit eingeschalteter Bremse. Der klare Überstand, das PPP, wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und vereint. Die Konzentration der Plättchen im PRP wurde mittels eines Zellzählgerätes (KX-21N, Sysmex) bestimmt.

2.2.4. Zellbiologische Methoden für humane Arbeiten

2.2.4.1. Isolierung von mononukleären Zellen aus Buffy Coats

Die Isolierung von mononukleären Zellen (PBMC, **p**eripheral **b**lood **m**ononuclear **c**ells) aus Buffy Coats erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurden zunächst in drei 50 ml Reaktionsgefäße je 15 ml Ficoll gegeben. Anschließend wurde das Ficoll mit je 25 ml des ankonzentrierten Blutes des Buffy Coats vorsichtig überschichtet, so dass sich zwei Phasen ergeben. Bei der folgenden Zentrifugation bei 700xg und RT für 20 Minuten ohne Bremse trennen sich die Bestandteile des

Blutes entsprechend ihrer Dichte auf. Ficoll ist ein synthetisches und stark verzweigtes Polysaccharid mit einer Dichte von 1,077 g/ml. Erythrozyten und Granulozyten weisen eine höhere Dichte als Ficoll auf, weswegen sie nach der Zentrifugation sedimentieren und in der untersten Phase zu finden sind. Oberhalb der Erythrozyten und Granulozyten befindet sich die Ficollschicht. Die mononukleären Zellen, wie Monozyten und Lymphozyten, weisen eine geringere Dichte auf als Ficoll und befinden sich daher in der Trennschicht oberhalb des Ficolls und bilden die sogenannte Interphase. Die oberste Phase wird vom Blutplasma gebildet, welches die geringste Dichte aufweist, und in der sich auch der größte Teil der Thrombozyten befinden. Vom Plasma werden 20 – 30 ml abgenommen und für 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert. Anschließend wurde das Plasma für 5 Minuten bei 1500xg bei RT zentrifugiert, um so die ausgefallenen Proteine zu sedimentieren. Das Plasma wurde anschließend bei 4°C gelagert und zum Supplementieren der jeweiligen Zellkulturen verwendet.

Um die mononukleären Zellen zu separieren, wurde die Interphase mit einer Transferpipette vorsichtig abgenommen und darauf geachtet, möglichst kein Ficoll oder Erythrozyten mit zu überführen, um eine Kontamination zu vermeiden. Um die gesamte Schicht der mononukleären Zellen zu erhalten, wurde das restliche Plasma zusammen mit den PBMC abgenommen und alles in ein frisches 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde mit DPBS auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt und bei 4°C und 600xg für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Zellpellet aufgebrochen. Um noch verbliebenen Ficoll zu entfernen, wurden die Zellen noch zwei weitere Male mit je 50 ml DPBS gewaschen und jeweils für 5 Minuten bei 4°C und 400xg zentrifugiert. Anschließend wurden die PBMCs in das Einfriermedium aufgenommen und bei -80°C eingefroren (s. 2.2.4.2).

2.2.4.2. Einfrieren und Auftauen der PBMCs

Die Kryokonservierung der PBMC erfolgte bei -80°C. Dazu wurden die frisch isolierten PBMCs für 5 Minuten bei 4°C und 400xg abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet aufgebrochen. Anschließend wurden die Zellen in dem Einfriermedium aufgenommen. Dieses setzt sich zusammen aus 450 µl humanem Kulturmedium, 450 µl autologem Plasma und 100 µl DMSO pro verwendetem

Kryoröhrchen. In einem Kryoröhrchen wurden ca. 1×10^8 Zellen weggefroren. Die Zellen und das Einfriermedium wurden gut durchmischt und schnellstmöglich eingefroren, da das enthaltene DMSO toxisch für Zellen ist, aber beim Gefrierprozess die Kristallbildung verhindert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur. Die Inhalte der einzelnen Röhrchen wurden in einem mit ca. 25 ml kaltem DPBS gefüllten 50 ml Reaktionsgefäß vereint und für 5 Minuten bei 4°C und 400g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet aufgebrochen. Um die Reste des DMSO zu entfernen, wurden die Zellen noch zwei weitere Male mit je 40 ml DPBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl wurde bestimmt.

2.2.4.3. Kultivierung humaner DCs aus PBMC

Zur Generierung von dendritischen Zellen aus PBMC wurde die Eigenschaft von Monozyten genutzt, dass diese im Gegensatz zu Lymphozyten und NK-Zellen an Kunststoffoberflächen in relativ kurzer Zeit adhärieren und so leicht von den anderen mononukleären Zellen isoliert werden können.

Dazu wurde pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte 2 ml Kulturmedium für humane DCs gegeben und dies mit 90 µl autologem Plasma versetzt. Das Plasma verhindert in diesem Fall, dass B-Zellen adhärieren. In jede Vertiefung wurden 13×10^6 PBMC pipettiert und die Zellen anschließend für 45 Minuten bei 10% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnten alle nicht-adhärerten Zellen abgespült werden. Dazu wurde das Medium aus den Vertiefungen der 6-Loch-Platte mittels einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und anschließend die Vertiefung mit 3 ml warmem DPBS sanft durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gewaschen. Die nicht-adhären Zellen konnten somit abgesaugt werden, und die Vertiefung wurde anschließend noch zwei weitere Male mit je 2 ml DPBS gewaschen.

Zur anschließenden Kultivierung der adhärerten Monozyten wurde in jede Vertiefung 3 ml Kulturmedium für humane DCs sowie 60 µl autologes Plasma gegeben. Um die Zellen zu DCs auszudifferenzieren, wurden sie zusätzlich mit Zytokinen behandelt. Das Kulturmedium wurde mit 10 ng/ml IL-4 und 200 IU/ml GM-CSF supplementiert.

Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 8 Tagen im Brutschrank bei 37°C und 10% CO₂. An Tag 3 wurden die Zellen gefüttert, indem ein Teil des Mediums erneuert wurde. Dazu wurden 800 µl des Kulturmediums vorsichtig aus der Vertiefung abgenommen und durch 1 ml frisches Kulturmedium, supplementiert mit 10 ng/ml IL-4, 200 IU/ml GM-CSF und 2% (v/v) autologem Plasma, ersetzt. An Tag 6 wurden die DCs ausgereift. Dazu wurden 800 µl des Kulturmediums pro Vertiefung entnommen und, wie an Tag 3 beschrieben, durch frisches Medium ersetzt. Zusätzlich wurden die DCs mit den proinflammatorischen Zytokinen bzw. Mediatoren IL-1 β (1000 IU/ml), TNF- α (10 ng/ml) und PGE₂ (1 µg/ml) stimuliert. DCs, die immatur bleiben sollten, wurden nur wie an Tag 3 beschrieben gefüttert. 48 Stunden nach der Stimulierung, an Tag 8, wurden die immaturen und die ausgereiften DCs geerntet. Die immaturen DCs sind zu diesem Zeitpunkt nur noch leicht adhären und können durch leichtes Abspülen der Vertiefung geerntet werden. Mature DCs sind nicht mehr adhären und können direkt mit dem Medium zusammen abgenommen werden. Die DCs wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei RT und 400xg zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschrirte mit je 40 ml DPBS. Anschließend wurden die DCs in 500 µl DPBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.2.4.4. Blutabnahme und Generierung von PRP und PPP

Zur Gewinnung von plättchenreichem Plasma und plättchenarmem Plasma diente Blut aus der Armvene eines Probanden. Um eine direkte Aktivierung und Aggregation der Plättchen zu verhindern, wurde das Blut in mit Natriumcitrat gefüllte Monovetten abgenommen. Die Monovetten wurden für 10 Minuten bei RT und 200xg ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde der gelblich-trübe Überstand, das PRP, bis ca. einen halben Zentimeter oberhalb der Trennschicht abgenommen und in ein frisches 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die restlichen Zellen wurden erneut zentrifugiert für 10 Minuten bei RT und 2000xg. Der gelblich-kla-re Überstand, das PPP, wurde bis ca. einen halben Zentimeter oberhalb der Trennschicht abgenommen und in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Konzentration der Plättchen im PRP mittels eines Zellzählgerätes ermittelt.

2.3. Analytische Methoden

2.3.1. Durchflusszytometrie (FACS)

Bei der Durchflusszytometrie oder auch FACS-Analyse (Fluorescence-activated cellsorting) werden Zellen anhand ihres Phänotyps, also der Expression ihrer Oberflächenmoleküle oder auch intrazellulärer Moleküle, quantifiziert. Weiterhin werden auch Größe und Granularität gemessen. Bei dieser Methode werden die Zellen mit Antikörpern inkubiert, die spezifisch an bestimmte Proteine binden. Diese Antikörper sind mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt, so dass die Stärke der Expression des Markers direkt detektiert werden kann. Dazu werden die Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren dabei einen Laserstrahl. Die Zellen streuen einen Teil des Lichtes, wobei unterschieden wird zwischen der Vorwärtsstreuung, die die Größe der Zellen wiedergibt (Forward Scatter, FSC), und der Seitwärtsstreuung, die die Granularität der Zellen widerspiegelt (Side Scatter, SSC). Die an die Zelle gebundenen Fluoreszenz-markierten Antikörper werden durch den Laser angeregt und emittieren als Folge Licht bestimmter Wellenlängen, welches detektiert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Maturierung sowohl von BM-DCs als auch von humanen DCs mittels spezifischer Expression bestimmter Oberflächenmoleküle untersucht. Weiterhin wurde die intrazelluläre ROS-Produktion in BM-DCs untersucht sowie die Expression von Tissue Factor auf der Oberfläche von humanen DCs. Zur Kontrolle wurde für jeden gemessenen Marker eine Isotypkontrolle mitgeführt. Gemessen wurden zwischen 20.000 und 100.000 lebende Zellen je Probe. Analysiert wurde die Messung mit Hilfe der FlowJo Software (FlowJo, Ashland, USA).

Durchführung:

In jedes FACS-Röhrchen kamen 5×10^5 (human) oder 1×10^6 (murin) Zellen. 1 ml FACS-Medium wurde hinzugegeben und die Zellen bei 300xg für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und 25 µl des jeweiligen Absättigungsantikörpers hinzugegeben. Jede Probe wurde mit Hilfe eines Vortex gemischt und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden zu jeder Probe 25 µl des entsprechend in FACS-Puffer verdünnten Antikörpers gegeben. Die Zellsuspension wurde wieder gemischt und für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert, wobei nach der Hälfte der Zeit die Zellen noch einmal

durchmischt wurden. Anschließend wurde der überschüssige Antikörper durch Zugabe von 1 ml FACS-Medium und Zentrifugation der Proben (300xg, 10 min, 4°C) ausgewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 300 – 500 µl Fixiermedium (Maturierung, Tissue Factor-Färbung) oder in 300 µl DPBS aufgenommen (ROS-Messung). Die unfixierten Proben wurden direkt gemessen, während die fixierten Proben bis zur Messung im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt wurden.

2.3.2. Aggregometrie

Zur Messung der Thrombozytenaggregation wurde das Verfahren nach BORN (Born, 1962), die Licht-Transmissions-Aggregometrie, angewandt. Dabei handelt es sich um ein turbidimetrisches Verfahren, bei dem die sich ändernde Lichtdurchlässigkeit, also die optische Dichte, des PRP detektiert wird. Der Messaufbau sieht folgendermaßen aus: In der Mitte der Messapparatur befindet sich die mit der Zellsuspension gefüllte Küvette. In der Küvette befindet sich ein Magnetrührer, der die Zellsuspension vermischt. Auf der einen Seite befindet sich eine Lichtquelle und auf der gegenüberliegenden Seite der dazugehörige Detektor, der das ankommende Lichtsignal quantifiziert. Das nicht aggregierte PRP ist trüb, so dass ein durchscheinender Lichtstrahl nicht bis an die Detektoren gelangen kann. Kommt es nun zu einer Aggregation des PRP, so entstehen kleine Flocken oder auch größere Thromben. Gleichzeitig wird das restliche Plasma klarer. Als Folge daraus kann mehr Licht zu den Detektoren gelangen, die Lichttransmission erhöht sich also. Diese Änderung der Transmission wird vom Detektor gemessen und direkt in eine Messkurve übertragen.

Durchführung:

In einem ersten Schritt wurde das Aggregometer kalibriert, indem reines PPP gemessen wurde. Das frisch aufgereinigte PRP wurde mit PPP auf eine Konzentration von 2×10^8 /ml eingestellt bzw. für einige Versuche auch auf 1×10^8 /ml. Die Messung wurde in einem Volumen von 100 µl durchgeführt. Zuerst wurde die Thrombozytenfunktion bzw. die Aggregationsfähigkeit untersucht. Dazu wurde das reine PRP mit einem Stimulus, wie z.B. Thrombin oder ADP, versetzt. Sind die Thrombozyten voll funktionsfähig, so ändern sie auf den Stimulus hin ihre Form, der

sogenannte „shape change“, bevor sie aufgrund der geänderten Morphologie und der geänderten Expression von Oberflächenmolekülen miteinander aggregieren. Dies ist durch die sich ändernde Lichttransmission in der Messkurve ersichtlich. Anschließend wurden die DCs zusammen mit den Thrombozyten und je nach Versuchsansatz mit verschiedenen Substanzen getestet. Die DCs waren dabei jeweils auf eine Konzentration von $5 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt und wurden für die jeweiligen Versuche mit PPP auf die entsprechende Konzentration eingestellt. Gemessen wurde die Aggregation für mindestens 7 Minuten. Für die Auswertung wurden zwei Parameter bestimmt: Die maximale Aggregation und die Steigung der Messkurve. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software V1.21c 13.04.08.

2.3.3. Messung der Thrombingenerierung - CAT (Calibrated Automated Thrombography)

Zur Messung des Thrombingenerierungspotentials der DCs wurde die von Hemker et al. 2003 beschriebene Methode verwendet, die auf der Umsetzung eines fluorogenen thrombinspezifischen Substrats basiert. Dazu wird zu den zu messenden Proben ein fluorogenes Substrat hinzugegeben (Z-Gly-Gly-Arg-Aminomethylcumarin), welches durch das Enzym Thrombin hydrolysiert wird und dann fluoresziert. Die Hydrolyserate wird mittels Fluoreszenzmessung detektiert.

Durchführung:

Die Messung wurde in einer 96-Loch-Platte in einem Volumen von 120 μl durchgeführt. Es wurden einfache Ansätze oder auch Duplikatansätze gemessen. Fünf verschiedene Messansätze wurden gewählt: In einem Ansatz wurde nur das PPP gemessen (pro Loch 50 μl PPP und 30 μl Tyrodes-Puffer). In einem weiteren Ansatz wurde nur das PRP, eingestellt auf eine finale Konzentration von $1 \times 10^5/\mu\text{l}$, gemessen (pro Loch 50 μl PRP und 30 μl Tyrodes-Puffer). Als dritter Ansatz wurden die DCs alleine gemessen; diese wurden in eine finale Konzentration von $2 \times 10^5/\text{ml}$ eingestellt (4 μl DCs und 76 μl Tyrodes-Puffer). Im vierten Ansatz wurden die DCs zusammen mit PPP gemessen (50 μl PPP + 4 μl DCs + 26 μl Tyrodes-Puffer). Im letzten Ansatz wurden die DCs zusammen mit dem PRP gemessen (50 μl PRP +

4 μ l DCs + 26 μ l Tyrodes-Puffer). Zur Messung der basalen Thrombingenerierung wurden zu jedem Ansatz 20 μ l Tyrodes-Puffer pipettiert. Um die mit Tissue Factor aktivierte Thrombingenerierung zu detektieren, wurden zu jedem Ansatz 20 μ l PRP-Reagenz hinzugegeben. Zur Messung der Thrombin-aktivierten Generierung wurden zu jedem Ansatz 20 μ l Thrombin pipettiert (finale Konzentration 0,1 U/ml). Für jeden Ansatz wurde eine Kalibratorkontrolle mitgeführt. Die Messung erfolgte mit dem Fluorometer Fluoroskan Ascent FL der Firma Thermo Scientific, Waltham, USA. Bei diesem Gerät wird die fertig pipettierte Platte eingelegt und das Substrat automatisch in jedes Loch zupipettiert (Volumen: 20 μ l), wenn die Messung gestartet wird. Insgesamt wird die Messung über einen Zeitraum von 60 Minuten aufgezeichnet, wobei alle 20 Sekunden ein Messpunkt gesetzt wurde. Die Daten wurden anschließend mit der Thrombinoscope Software bearbeitet und in Excel übertragen. Es wurden drei Parameter zur Interpretation der Daten herangezogen: Die „Lag time“, also die Zeit, bis eine Hydrolyse des Substrats messbar war; die Amplitude des Peaks („Peak height“) und „AUC (Area under the curve)“, die Fläche unterhalb der Kurve, was auch dem endogenen Thrombinpotential entspricht. Die Messungen wurden freundlicherweise durchgeführt von AG PD Dr. Kerstin Jurk.

2.3.4. Statistik

Die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Sigma Plot Version 12.3. Zur Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede ($p < 0,05$; $p < 0,01$ und $p < 0,001$) wurde der Student-t-Test verwendet. Die Unterschiede wurden in den Abbildungen entsprechend gekennzeichnet. Wurde gruppenweise ein Mittelwert berechnet, so wurde dieser mit der Standardabweichung SEM (standard error of the mean) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Analysen zur Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für den Phänotyp und die Funktion Knochenmarksabgeleiteter dendritischer Zellen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden bei Inflammationen reaktive Sauerstoffspezies, kurz ROS, freigesetzt. Dies wurde auch im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben (Bassenge et al., 2005). Durch Vorarbeiten innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von BM-DCs mit Thrombozyten-haltigem Kulturüberstand zu einer Aktivierung der DCs führt und weiterhin zu einer vermehrten Bildung von ROS (unveröffentlichte Daten). Um diesen Effekt zu simulieren, wurden BM-DCs mit Phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu) behandelt. PDBu führt zu einer Proteinkinase C (PKC) vermittelten Aktivierung der NADPH-Oxidase und somit zu einer verstärkten ROS-Produktion. In Abbildung 1 ist der Aufbau der NADPH-Oxidase dargestellt. Es handelt sich dabei um einen Multienzymkomplex, der aus einem membrangebundenen Komplex (bestehend unter anderem aus gp91^{phox}) und einem zytosolischen Komplex besteht. Im inaktiven Zustand sind beide Komplexe getrennt. Bei Aktivierung, z. B. durch die PDBu vermittelte Aktivierung von PKC, lagern sich beide Komplexe aneinander und sind als zusammenhängender Multienzymkomplex in der Lage NADPH zu reduzieren. Durch die freigewordenen Elektronen können so reaktive Sauerstoffspezies (z. B. O₂⁻) generiert werden.

Zur Validierung der mit PDBu gewonnenen Ergebnisse wurde als Kontrolle ein zweiter PKC-Aktivator, der Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), zur Stimulierung von BM-DCs verwendet. Detektiert wurde die Bildung von ROS innerhalb der Zelle mit dem Farbstoff DCF-DA. Dieser in seiner Ausgangsform nicht fluoreszierende Farbstoff kann in die Zelle diffundieren und wird durch zelluläre Esterasen hydrolysiert. Der nun polare Farbstoff kann durch intrazelluläre ROS-Generierung oxidiert werden und beginnt zu fluoreszieren. Somit wird eine Detektion mittels Durchflusszytometrie ermöglicht.

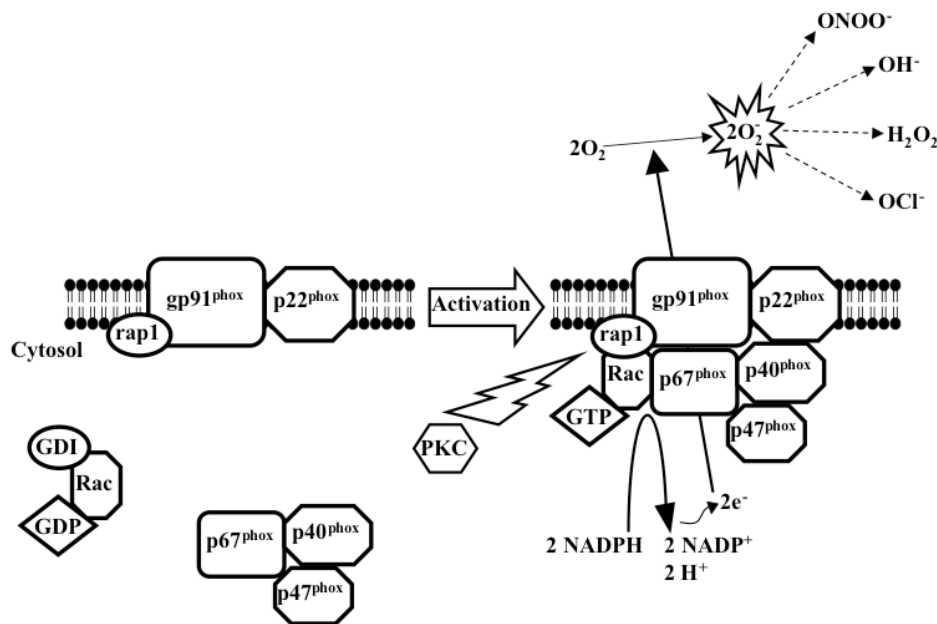


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Aktivierung der NADPH-Oxidase

Quelle: Grayfer, L und Belosevic, M (2012). Cytokine Regulation of Teleost Inflammatory Responses, Intech.

Bei Inkubationen über einen kurzen Zeitraum hinweg (bis 2 Stunden) wurden bei der Analyse zuerst die CD11c⁺-Zellen ausgewählt, anschließend wurden zwei Populationen unterschieden: eine MHCII hoch (MHCII high) und eine MHCII niedrig exprimierende Population (MHCII low). Da zwei deutlich voneinander abgegrenzte Populationen erkennbar waren, wurden diese getrennt betrachtet und analysiert, um mögliche Effekte genauer bestimmen zu können. Nach dieser Auswahl wurde der ROS-Gehalt in beiden Populationen vergleichend analysiert (Abb. 2).

Zusätzlich wurde die Auswirkung der gebildeten ROS auf die Expression des Moleküls MHCII selbst analysiert. Auch ein möglicher Einfluss auf die Maturierung der DCs sowie auf die T-Zellstimulatorische Kapazität wurde untersucht. Ein weiterer Aspekt waren die Auswirkungen verschiedener ROS-Inhibitoren auf die zuvor genannten phänotypischen und funktionalen Eigenschaften der BM-DCs. Dazu wurden BM-DCs zusätzlich zur Stimulation mit PDBu mit den Inhibitoren Apocynin oder Chelerythrin behandelt. Auch BM-DCs von knockout-Mäusen, die eine nicht funktionale Untereinheit gp91^{phox} der NADPH-Oxidase besitzen, wurden zur Analyse verwendet.

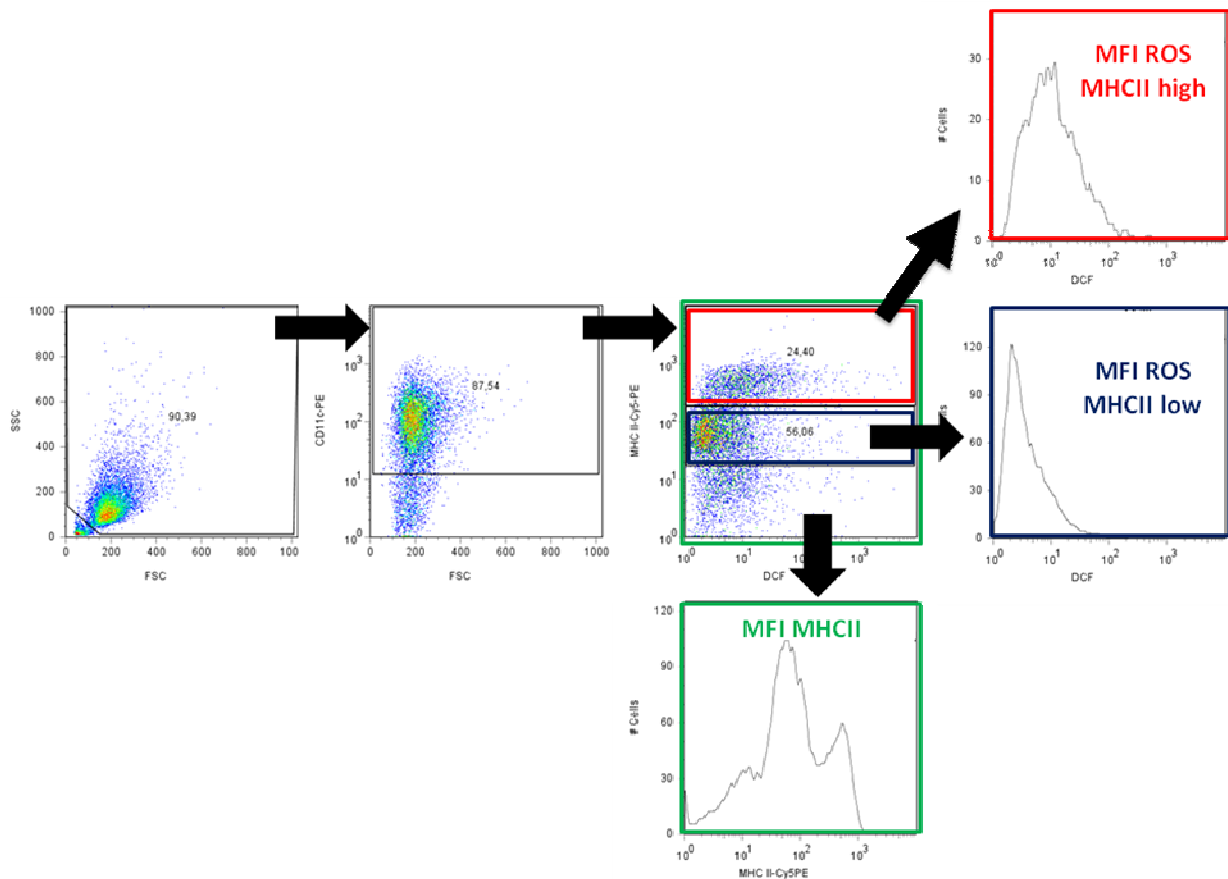


Abb. 2: Gating- und Auswahlstrategie

Die verwendeten BM-DCs wurden durch Kultur von Knochenmarkszellen aus C57BL/6-Mäusen in GM-CSF-haltigem Kulturmedium wie in 2.2.3.2. ff. beschrieben generiert. An Tag acht wurde den Zellen entweder frisches Medium zugegeben (unstimulierte, immature BM-DCs), oder sie wurden mit 1,5 $\mu\text{g/ml}$ LPS (Standardmaturierung) oder mit unterschiedlichen Dosen PDBu bzw. in weiteren Experimenten mit unterschiedlichen Konzentrationen PMA stimuliert. Die entsprechenden Inhibitoren wurden vor der Stimulierung mit PDBu in den angegebenen Dosen den BM-DC-Kulturen hinzugefügt.

3.1.1. Stimulierung von DCs mit dem NADPH-Oxidase-Aktivator PDBu

3.1.1.1. Vergleichende Analyse der durch Stimulierung mit unterschiedlichen Dosen PDBu hervorgerufenen intrazellulär gebildeten ROS-Menge

Als Ausgangspunkt für die vergleichende Analyse der durch Stimulierung mit unterschiedlichen Dosen PDBu hervorgerufenen intrazellulär gebildete ROS-Menge, wurde die basale ROS-Produktion in unstimulierten, immaturren BM-DCs ermittelt. In einem zweiten Versuchsansatz wurden BM-DCs mit LPS stimuliert, um so die ROS-Produktion während einer Standardmaturierung zu detektieren. Eine dritte Versuchsgruppe wurde zur Generierung hoher intrazellulärer ROS-Mengen mit ansteigenden Dosen PDBu behandelt. Detektiert wurde der ROS-Gehalt nach drei verschiedenen Zeiträumen: nach 15, 45 und 120 Minuten. Wie in Abbildung 3 erkennbar, zeigen immature BM-DCs nur eine geringe Anzahl ROS produzierender Zellen. Dies ist erkennbar an den relativ niedrigen Werten der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) sowohl in der MHCII stark (Abb. 3 A), als auch in der MHCII schwach (Abb. 3 B) exprimierenden Population. Ähnliche Werte zeigen auch die mit LPS stimulierten BM-DCs. Im Vergleich dazu kann wie erwartet durch die Stimulation mit PDBu eine sehr viel höhere ROS-Generierung erreicht werden. Deutlich erkennbar ist der zunehmende MFI nach der Behandlung der Zellen mit höheren Dosen von PDBu sowie in der MHCII hoch exprimierenden Gruppe ein Peak nach 15-minütiger Inkubation (Abb. 2 A&B).

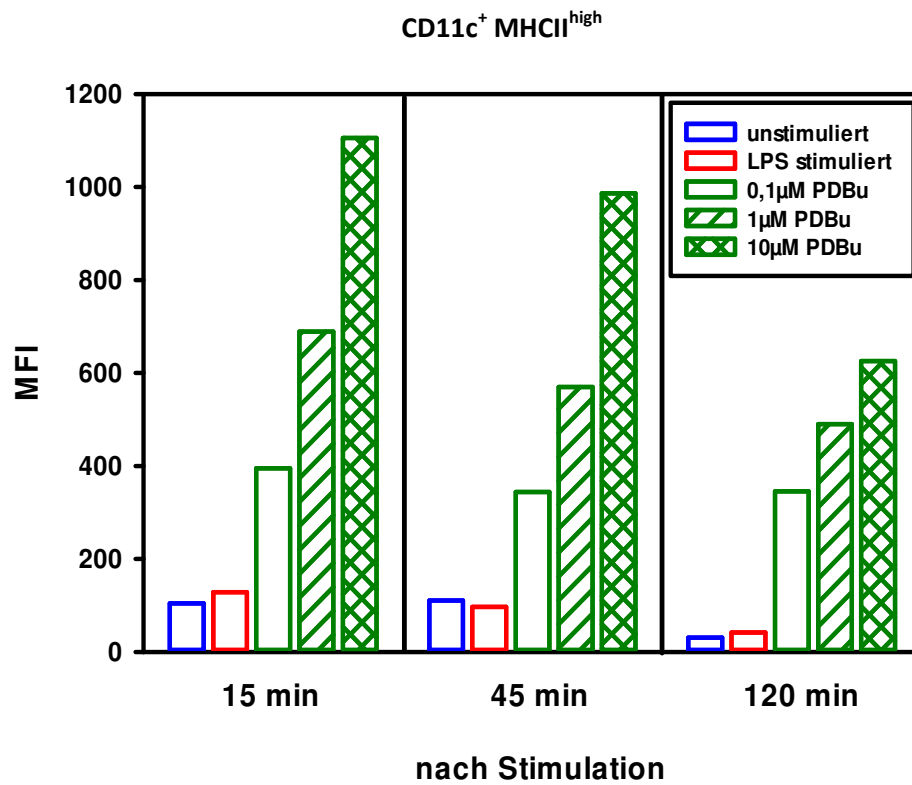
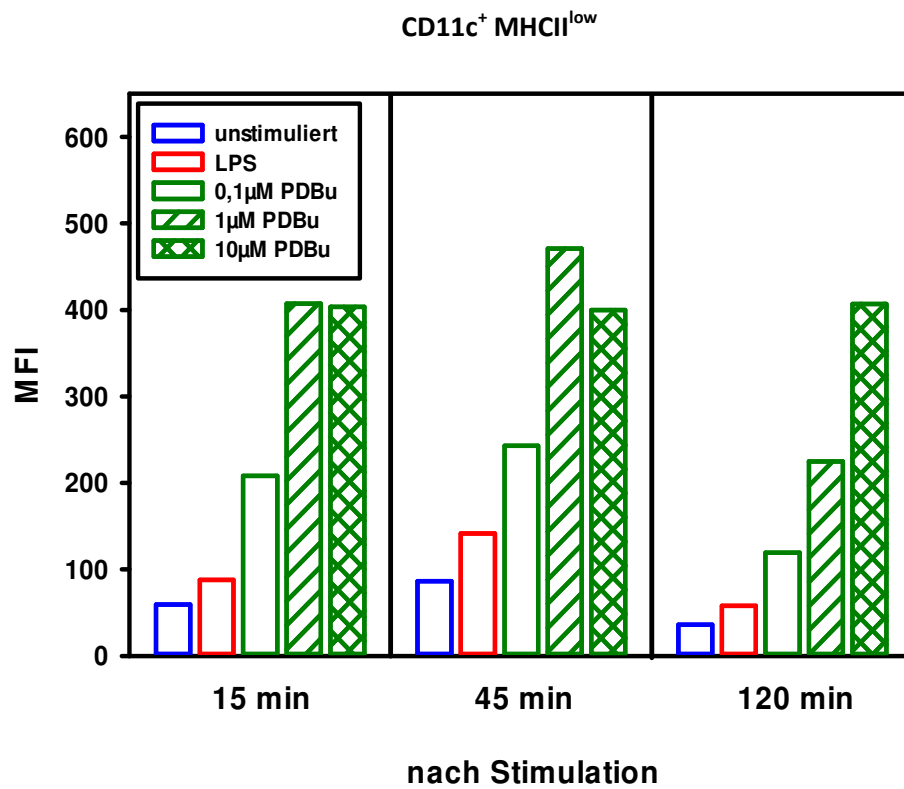
A**B**

Abb. 3: ROS-Produktion in CD11c⁺ BM-DCs im zeitlichen Verlauf

Tag 8 BM-DCs wurden entweder im immaturren Zustand belassen oder mit 1,5 µg/ml LPS bzw. ansteigenden Dosen PDBu (0,1 µM; 1 µM und 10 µM) stimuliert und über verschiedene Zeiträume inkubiert (15 Minuten, 45 Minuten und 120 Minuten). Anschließend wurde per Durchflusszytometrie die Menge der generierten ROS untersucht. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzaktivität (MFI) der (A) CD11c⁺ MHCII stark exprimierenden BM-DCs, sowie (B) der CD11c⁺ MHCII schwach exprimierenden BM-DCs. Gezeigt wird hier ein repräsentatives Experiment von 3 Experimenten.

3.1.1.2. Auswirkungen der Stimulation mit PDBu auf die Expression von MHCII nach kurzen Zeitintervallen

Neben der Analyse der produzierten ROS-Menge wurde untersucht, ob und inwiefern diese einen Einfluss auf die Expression von Moleküls MHCII haben. Dazu wurden die wie zuvor beschriebenen Versuchsansätze gewählt sowie die Expression von MHCII mittels Oberflächenfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. Wie in Abbildung 4 erkennbar ist, tragen immature BM-DCs nur moderate Mengen MHCII auf ihrer Oberfläche. Mit LPS stimulierte BM-DCs zeigen nach diesen kurzen Zeitintervallen eine ähnliche Expressionsdichte. Im Vergleich dazu führt die Behandlung mit ansteigenden Dosen PDBu zu einer erhöhten Anzahl von MHCII-Molekülen auf der Oberfläche. Aufgrund der größeren Unterschiede zu den Kontrollen wurden für die Analyse der Maturierung und der T-Zellstimulatorischen Kapazität nach 24 Stunden BM-DCs, die mit der höchsten Konzentration PDBu behandelt worden waren, verwendet.

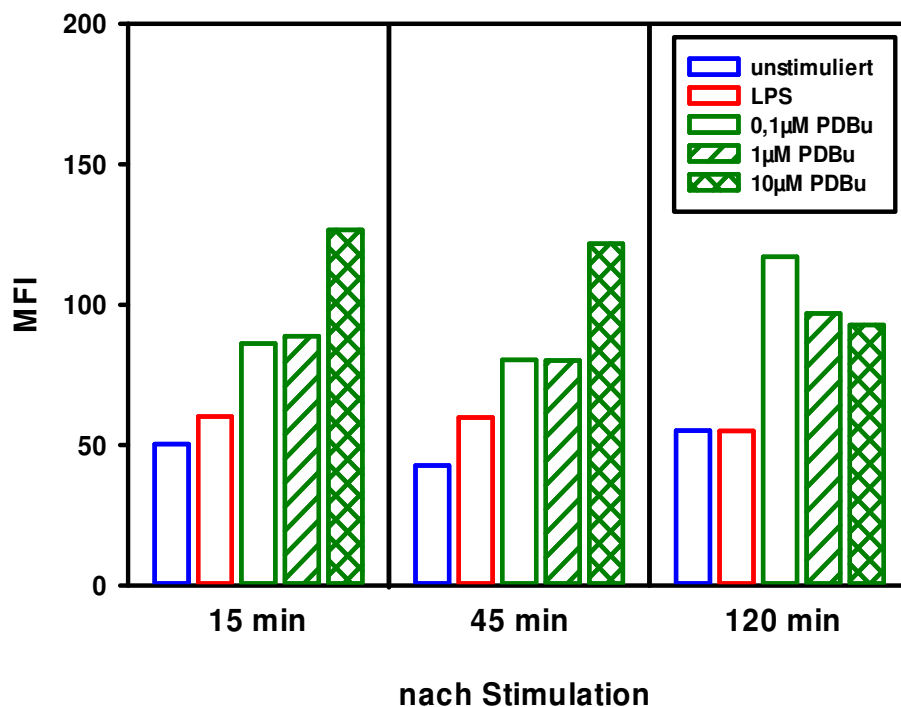


Abb. 4: Expression von MHCII auf der Oberfläche von immaturren und mit LPS bzw. mit PDBu stimulierten CD11c⁺-BM-DCs

Tag 8 BM-DCs wurden entweder im immaturren Zustand belassen oder mit 1,5 μg/ml LPS bzw. ansteigenden Dosen PDBu (0,1 μM; 1 μM und 10 μM) stimuliert und über verschiedene Zeiträume inkubiert (15 Minuten, 45 Minuten und 120 Minuten). Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression des Oberflächenmoleküls MHCII untersucht. Dargestellt wird hier ein repräsentatives Experiment von 3 Experimenten.

3.1.1.3. Auswirkungen einer PDBu-Behandlung auf die Maturierung von DCs nach 24-stündiger Inkubation

Weiterhin wurden die Auswirkungen der Stimulation von DCs mit PDBu nach 24-stündiger Inkubation untersucht. In Abbildung 5 A ist die Auswahl der Zellen bei der durchflusszytometrischen Analyse dargestellt. Es wurden zuerst die CD11c⁺ Zellen ausgewählt und anschließend die Expression von MHCII gegen CD86 dargestellt. Es wurden zwei Populationen unterschieden: eine MHCII und CD86 niedrig und eine MHCII und CD86 hoch exprimierende Population. Als Kontrollen dienten auch hierbei

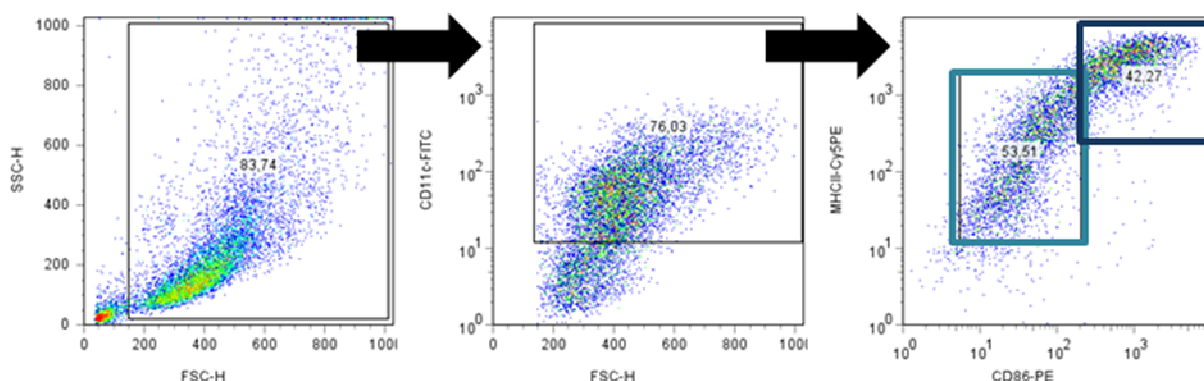
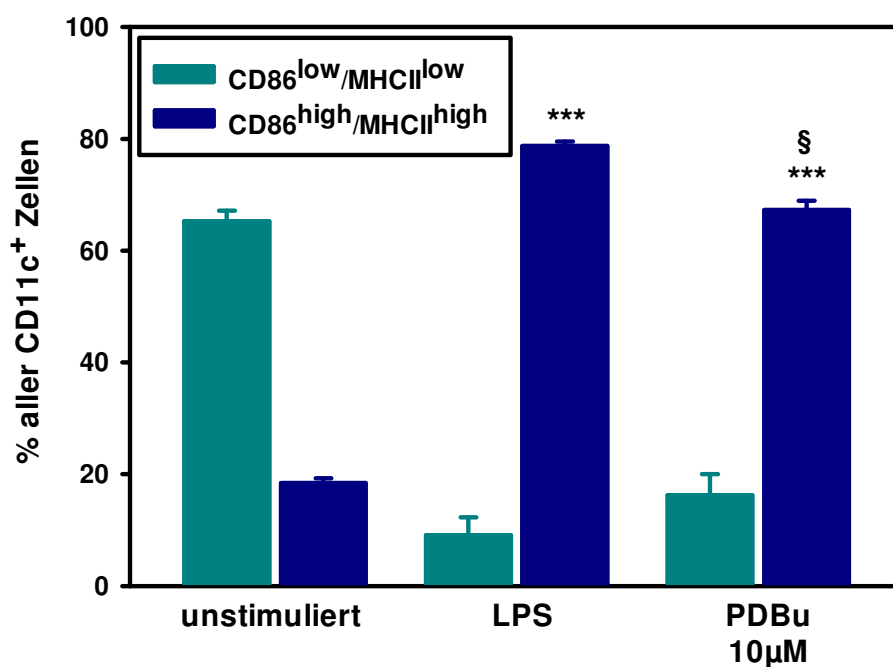
A**B**

Abb. 5: Gating- und Auswahlstrategie der Messung der Maturierung 24 Stunden nach Stimulation und Maturierung der CD11c⁺-BM-DCs

Tag 8 BM-DCs wurden mit 1,5 µg/ml LPS oder 10 µM PDBu stimuliert bzw. blieben als Kontrolle unbehandelt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden (Tag 9) wurde die Maturierung anhand der Expression der Oberflächenmarker MHCII und CD86 untersucht, beispielhaft gezeigt in (A). In (B) dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Versuchen +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unter-schied zur unstimulierten Gruppe; § Unterschied zur LPS behandelten Gruppe.

immature bzw. mit LPS stimulierte BM-DCs. Wie in Abbildung 5 B ersichtlich, zeigen unbehandelte BM-DCs einen immaturren Phänotyp. Dieser wird charakterisiert durch eine geringe Expression von MHCII und CD86. Im Gegensatz dazu zeigen die mit LPS stimulierten BM-DCs wie erwartet einen stark matten Phänotyp, welcher durch eine signifikant erhöhte Expression von MHCII und CD86 gekennzeichnet ist. Die mit der hohen Dosis von 10 μ M PDBu behandelten BM-DCs zeigen einen ebenfalls stark ausgereiften, matten Phänotyp, wobei allerdings die Moleküle MHCII bzw. CD86 nicht so stark aufreguliert wurden wie nach der LPS-Behandlung.

3.1.1.4. T-Zellstimulatorische Kapazität von BM-DCs nach Stimulierung mit PDBu

Um den Einfluss der Stimulierung mit PDBu auf die T-Zellstimulatorische Kapazität der DCs zu untersuchen, wurden BM-DCs wie zuvor beschrieben generiert und für 24 Stunden mit PDBu bzw. LPS stimuliert. Als Kontrolle diente auch hierbei eine unstimulierte, immature Gruppe. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die BM-DCs geerntet und mit allogenen T-Zellen aus BALB/c-Mäusen über einen Zeitraum von 88 Stunden kokultiviert. Während der letzten 16 Stunden der Kultur wurde die induzierte T-Zell-Proliferation gemessen. Aus Abbildung 6 wird ersichtlich, dass unstimulierte BM-DCs lediglich ein sehr geringes T-Zellstimulatorisches Potential haben. Die mit LPS stimulierten BM-DCs zeigen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein hoch signifikant stärkeres T-Zellstimulatorisches Potential. Im Vergleich dazu liegt die Kapazität der mit PDBu behandelten BM-DCs auf einem niedrigeren Niveau, allerdings signifikant über der immaturren Kontrolle.

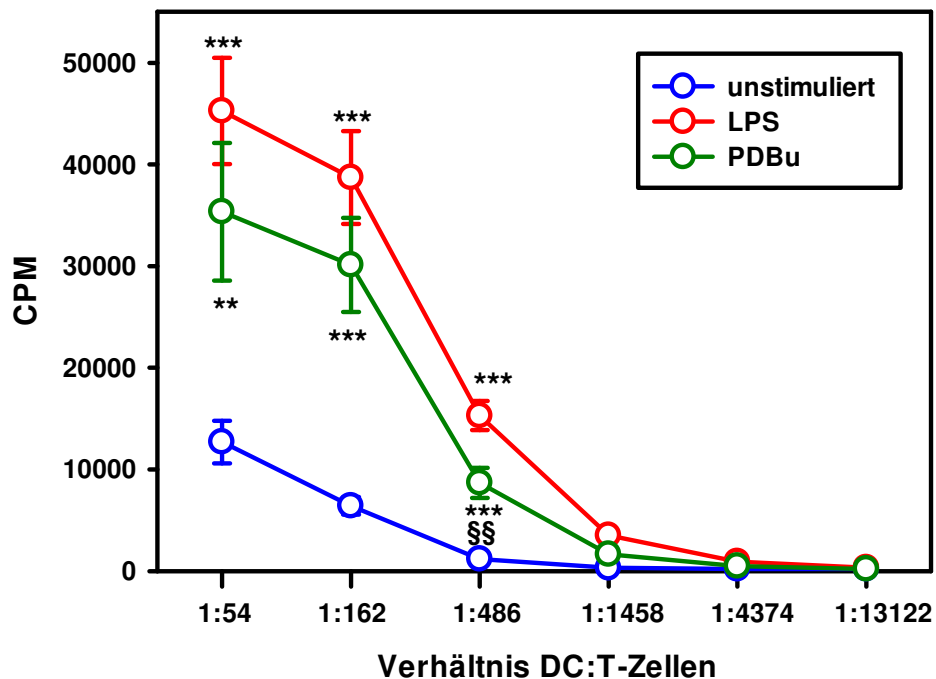


Abb. 6: Untersuchung der T-Zellstimulatorischen Kapazität von unterschiedlich behandelten BM-DCs

Acht Tage alte BM-DCs wurden für 24 Stunden mit 1,5 µg/ml LPS oder 10 µM PDBu stimuliert bzw. unbehandelt belassen. Anschließend wurden sie in einer seriellen Verdünnung mit allopathen T-Zellen für 72 Stunden kokultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde den Kulturen $^3\text{HTdR}$ hinzugefügt und die Inkubation für weitere 16 Stunden fortgesetzt. Durch Messung der Radioaktivität kann die Proliferation der T-Zellen dargestellt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM von 3 Experimenten.

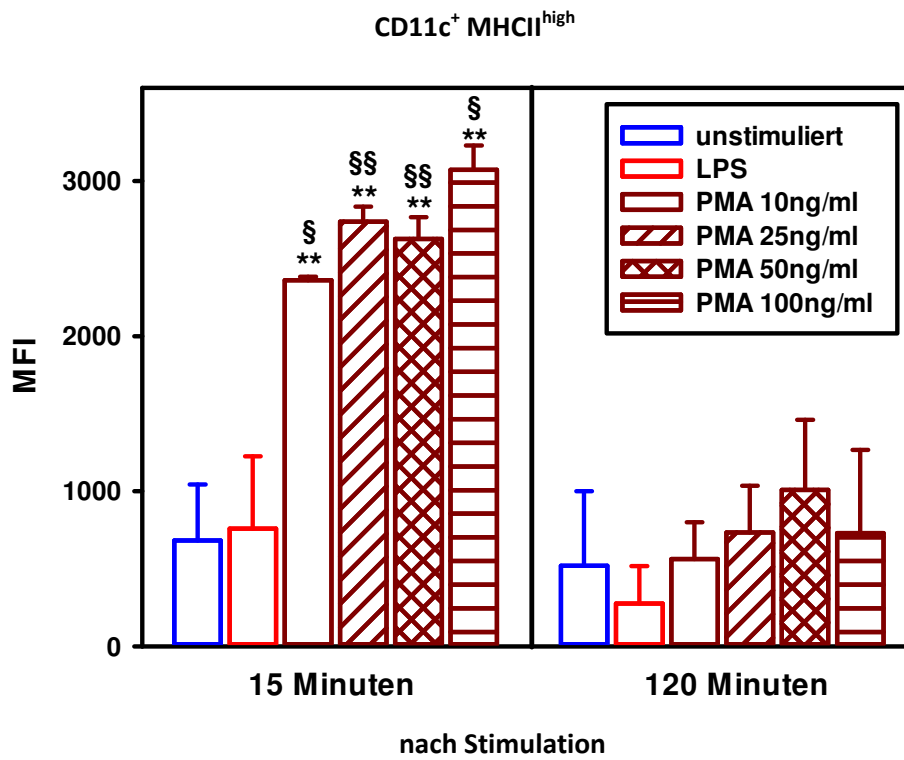
Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur unstimulierten Gruppe; § Unterschied zur LPS behandelten Gruppe.

3.1.2. Stimulierung von BM-DCs mit dem NADPH-Oxidase-Aktivator PMA

3.1.2.1. ROS-Generierung nach Stimulation mit PMA für kurze Zeitintervalle

Um die Ergebnisse nach Stimulierung mit PDBu zu verifizieren, wurden BM-DCs in einem gleichen Versuchsaufbau wie zuvor beschrieben generiert. Anstatt die BM-DCs mit PDBu zu behandeln, wurden sie mit dem Phorbolster und PKC-Aktivator PMA stimuliert. Gemessen wurden hier verschiedene Konzentrationen über zwei Zeiträume - 15 und 120 Minuten - und die ROS-Produktion in den MHCII hoch und niedrig exprimierenden Populationen analysiert. In Abbildung 7 ist ersichtlich, dass wie zuvor die unstimulierten und die mit LPS stimulierten BM-DCs nur niedrige Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies generieren. Dies trifft auf beide MHCII⁺-Populationen zu. Die mit PMA stimulierten Gruppen, MHCII hoch und niedrig exprimierend, zeigen nach 15 Minuten signifikant höhere Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Nach einer längeren Inkubation von 45 Minuten relativiert sich dieser Unterschied deutlich (Abb. 7 A und B).

A



B

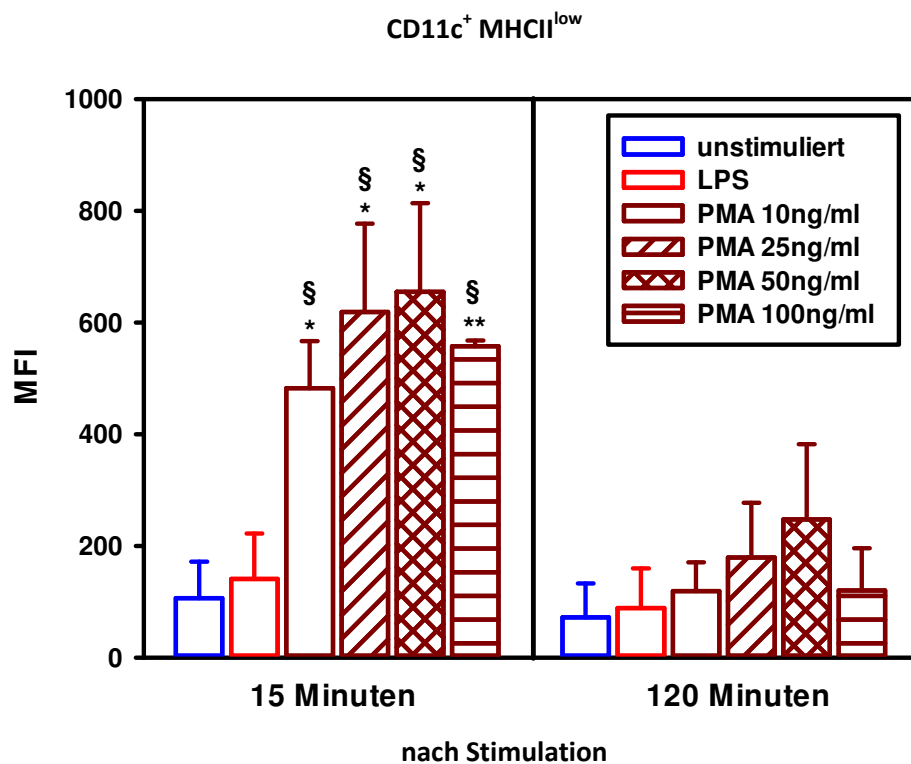


Abb. 7: Vergleich der ROS-Produktion in CD11c⁺-BM-DCs nach Stimulation mit PMA im zeitlichen Verlauf

Acht Tage alte BM-DCs wurden entweder im immaturren Zustand belassen oder mit 1,5 µg/ml LPS bzw. ansteigenden Dosen PMA (10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml oder 100 ng/ml) stimuliert und über verschiedene Zeiträume inkubiert (15 Minuten und 120 Minuten). Anschließend wurde per Durchflusszytometrie die Menge der generierten ROS untersucht. Dargestellt ist hier die mittlere Fluoreszenzaktivität (MFI) der (A) CD11c⁺ MHCII stark exprimierenden BM-DCs sowie (B) der CD11c⁺ MHCII schwach exprimierenden BM-DCs. Gezeigt wird hier der Mittelwert von drei Experimenten +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur unstimulierten Gruppe; § Unterschied zur LPS behandelten Gruppe.

3.1.2.2. Expression von MHCII nach Stimulation mit PMA

Auch nach der Stimulation mit PMA wurde der Einfluss auf die Expression des Oberflächenmoleküls MHCII untersucht. Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, führt die 15-minütige Inkubation mit PMA zu einer signifikant erhöhten Expression von MHCII verglichen mit immaturren oder LPS-stimulierten BM-DCs. Diese befinden sich auf einem ähnlichen Niveau. Der Unterschied zwischen den PMA-stimulierten Proben und den Kontrollen vergrößert sich nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten noch weiter. Mit PMA stimulierte CD11c⁺-Zellen zeigen eine hoch signifikant erhöhte MHCII-Expression. Innerhalb der verschiedenen eingesetzten Konzentrationen ist jedoch kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen (Abb. 8).

3.1.2.3. Vergleichende Analyse der Maturierung nach Behandlung mit PMA

Mit PMA stimulierte BM-DCs zeigen sowohl eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies als auch eine erhöhte Expression von MHCII auf ihrer Oberfläche nach kurzen Inkubationszeiten. Um zu untersuchen, ob die Behandlung ebenfalls eine Auswirkung auf die Maturierung der BM-DCs hat, wurde diese nach 24-stündiger Inkubation mittels Durchflusszytometrie gemessen. Wie bereits zuvor gezeigt wurde, weisen unbehandelte BM-DCs einen immaturren Phänotyp auf,

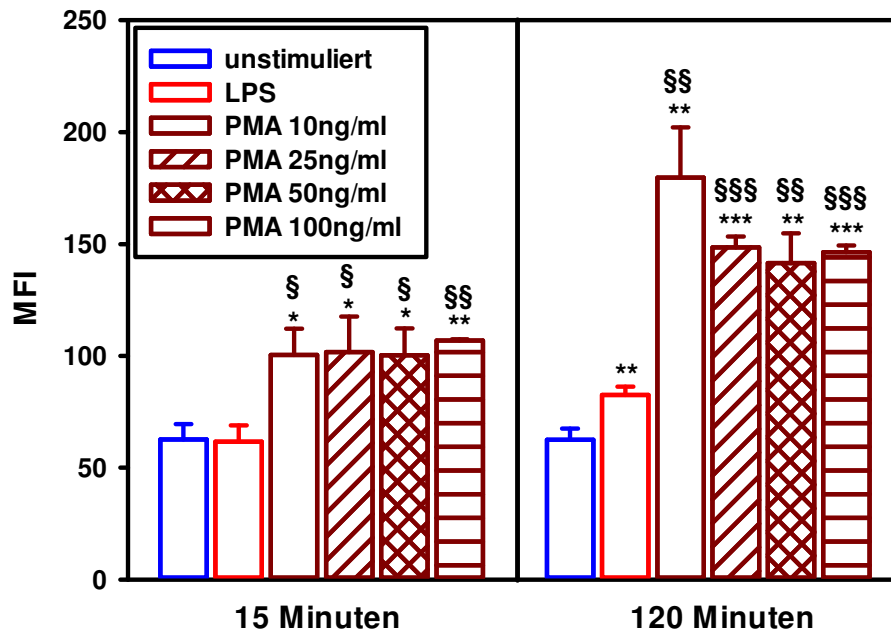


Abb. 8: Expression von MHCII auf der Oberfläche von immaturren, mit LPS bzw. PMA stimulierten CD11c⁺-BM-DCs

Tag acht BM-DCs wurden entweder im immaturren Zustand belassen oder mit 1,5 µg/ml LPS bzw. ansteigenden Dosen PMA (10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml oder 100 ng/ml) stimuliert und über verschiedene Zeiträume inkubiert (15 Minuten und 120 Minuten). Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression des Oberflächenmoleküls MHCII untersucht. Dargestellt werden hier die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur unstimulierten Gruppe; § Unterschied zur LPS behandelten Gruppe.

während mit LPS behandelte DCs eine hoch signifikant erhöhte Expression von CD86 und MHCII zeigen. Betrachtet man nun die mit PMA behandelten BM-DCs, so ist erkennbar, dass diese ebenfalls wie LPS-stimulierte BM-DCs einen matten Phänotyp aufweisen. Allerdings ist die Expressionsstärke der Moleküle CD86 und MHCII schwächer als nach LPS-Behandlung (Abb. 9).

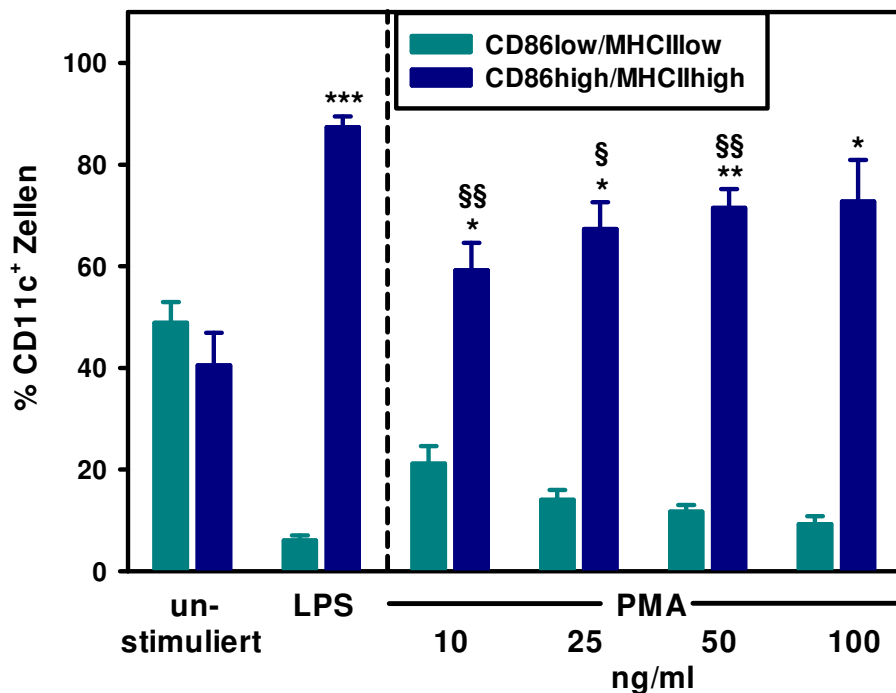


Abb. 9: Maturierung der CD11c⁺ BM-DCs 24 Stunden nach Stimulation mit PMA

Tag 8 BM-DCs wurden mit 1,5 µg/ml LPS oder ansteigenden Dosen PMA (10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml oder 100 ng/ml) stimuliert bzw. blieben als Kontrolle unbehandelt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die Maturierung anhand der Expression der Oberflächenmarker MHCII und CD86 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Versuchen +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur unstimulierten Gruppe; § Unterschied zur LPS behandelten Gruppe.

3.1.2.4. Auswirkung der PMA-Behandlung auf die T-Zell-stimulatorische Kapazität

Zur Analyse der T-Zellstimulatorischen Kapazität der mit PMA behandelten BM-DCs wurde, wie zuvor mit PDBu, die Proliferation der T-Zellen in einer Kokultur ermittelt. Dazu wurden BM-DCs immatur belassen oder für 24 Stunden mit LPS bzw. PMA stimuliert. Anschließend wurden diese BM-DCs für 88 Stunden mit allogenen T-Zellen zusammen kokultiviert. Die resultierende Proliferation der T-Zellen gibt einen Hinweis auf die T-Zellstimulatorische Kapazität der unterschiedlich behandelten BM-

DCs. Wie bereits gezeigt, besitzen immature DCs lediglich ein sehr geringes Potential, T-Zellen zu stimulieren (Abb. 10). Im Gegensatz dazu zeigen T-Zellen, die mit LPS-behandelten DCs kokultiviert wurden, eine sehr stark erhöhte Proliferationsrate. Mit PMA behandelte BM-DCs zeigen ein ähnliches, etwas geringeres Potential wie DCs nach LPS-Behandlung. DCs, die mit 10 ng/ml PMA stimuliert wurden, zeigen das niedrigste T-Zellstimulatorische Potential aller mit PMA behandelten BM-DCs. Es ist ein leichter dosisabhängiger Effekt zu beobachten.

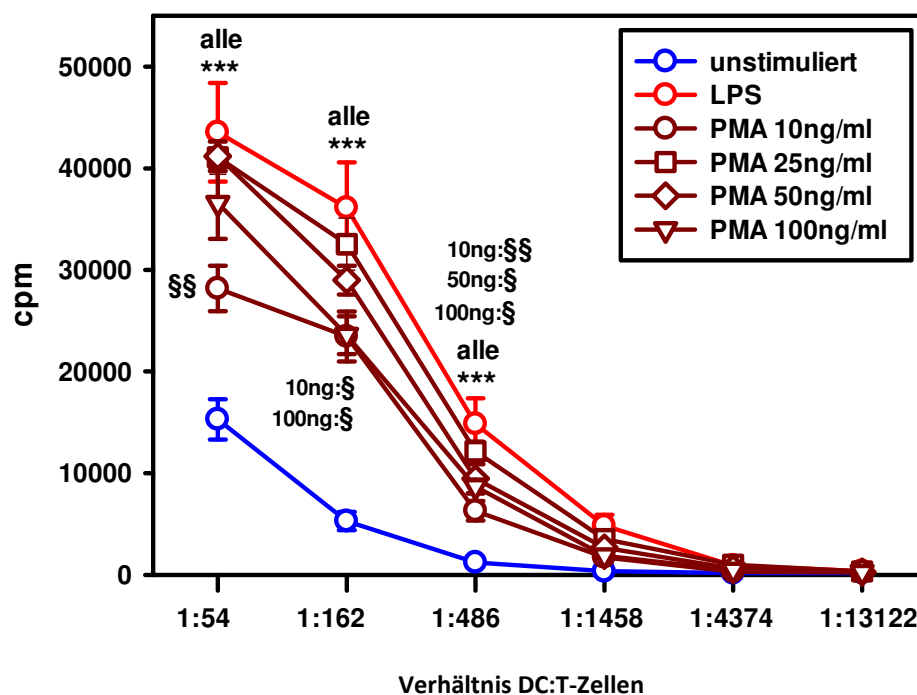


Abb. 10: Untersuchung der T-Zellstimulatorischen Kapazität von differentiell behandelten BM-DCs

BM-DCs (Tag 8) wurden für 24 Stunden mit 1,5 µg/ml LPS oder ansteigenden Dosen PMA (10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml oder 100 ng/ml) stimuliert bzw. unbehandelt belassen. Anschließend wurden sie in einer seriellen Verdünnung mit allogenen T-Zellen für 72 Stunden kokultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde den Kulturen ³HTdR hinzugefügt und die Inkubation für weitere 16 Stunden fortgesetzt. Durch Messung der Radioaktivität kann die Proliferation der T-Zellen dargestellt werden. Gezeigt sind die Mittelwerte +/- SEM von 2 unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur unstimulierten Gruppe; § Unterschied zur LPS behandelten Gruppe.

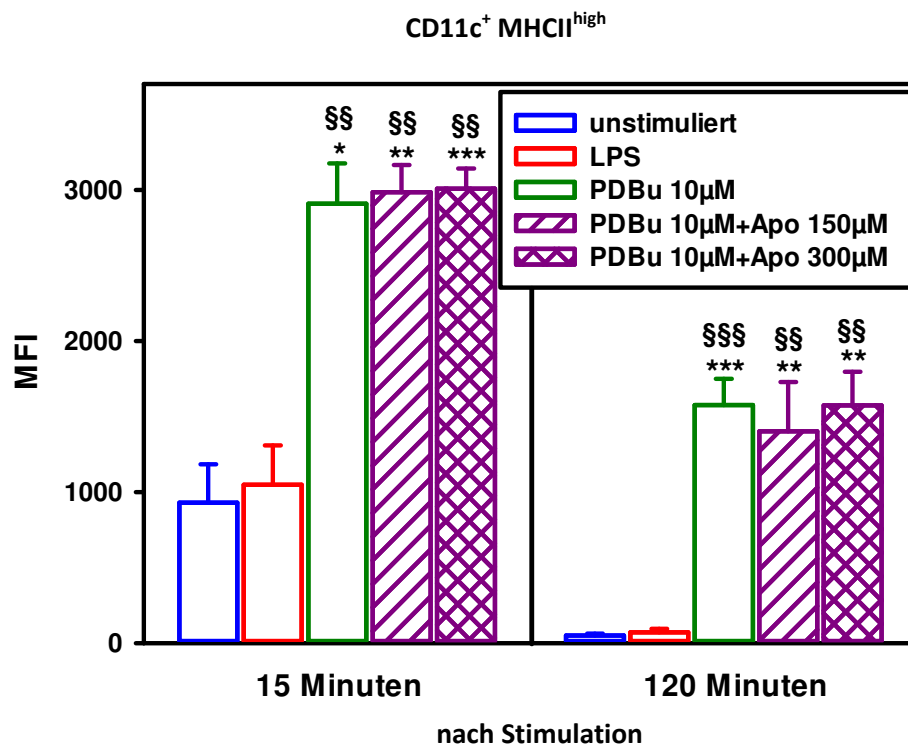
3.1.3. Auswirkungen der Inhibition der NADPH-Oxidase mit Apocynin auf mit PDBu stimulierte BM-DCs

3.1.3.1. Einfluss auf die ROS-Produktion und die MHCII-Expression nach kurzen Zeitintervallen

Im Folgenden soll der Einfluss des NADPH-Oxidase-Inhibitors Apocynin auf mit PDBu stimulierte BM-DCs untersucht werden. Im Fokus standen hierbei wie in den vorangegangenen Experimenten die ROS-Produktion selbst sowie der Einfluss der Apocynin-Behandlung auf das Oberflächenmolekül MHCII. Als Kontrollen wurden wie zuvor unbehandelte, immature BM-DCs sowie mit LPS stimulierte verwendet. Wie in Abbildung 11 ersichtlich, führt die Behandlung mit PDBu zu der bereits beschriebenen signifikant gesteigerten ROS-Produktion. Werden die BM-DCs vor der Stimulierung mit PDBu mit dem Inhibitor Apocynin behandelt, so ist trotzdem eine gesteigerte ROS-Produktion zu erkennen. Dies trifft sowohl in der MHCII hoch (Abb. 11 A), als auch in der MHCII niedrig exprimierenden Population (Abb. 11 B) zu beiden gemessenen Zeitpunkten zu. Weder bei der Verwendung der Dosis 150 μM Apocynin, noch bei einer Konzentration von 300 μM kann ein Unterschied zur PDBu-Gruppe in Abwesenheit von Apocynin detektiert werden.

Betrachtet man die Auswirkungen auf das Oberflächenmolekül MHCII (Abb. 12) nach 15 Minuten, so kann auch hier kein Unterschied zwischen dem nur mit PDBu behandelten Versuchsansatz und der zusätzlichen Behandlung mit Apocynin festgestellt werden. Betrachtet man allerdings die MHCII-Expression nach 120 Minuten, so kann eine verminderte Aufregulierung von MHCII festgestellt werden. Sowohl nach der Verwendung von 150 μM Apocynin, als auch mit einer Dosis von 300 μM liegt der ermittelte Wert der mittleren Fluoreszenz auf Niveau der mit LPS stimulierten Kontrolle und somit signifikant unterhalb der PDBu-Probe.

A



B

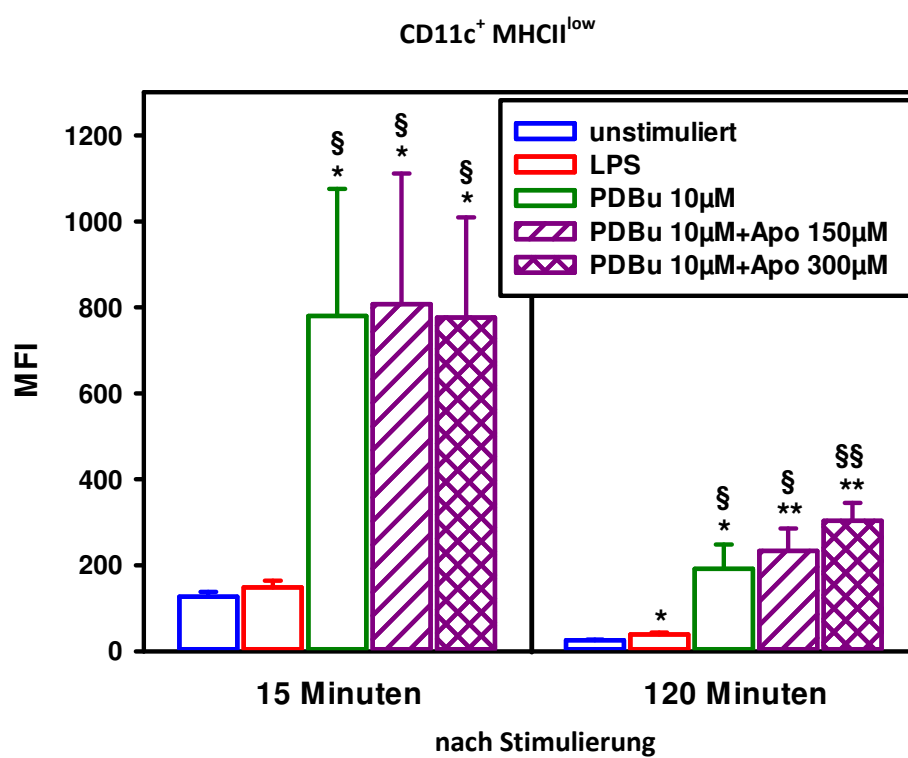


Abb. 11: Vergleich der ROS-Produktion in CD11c⁺-BM-DCs nach Behandlung mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin im zeitlichen Verlauf

BM-DCs (Tag 8) wurden entweder im immaturren Zustand belassen oder mit 1,5 µg/ml LPS bzw. 10 µM PDBu stimuliert und über verschiedene Zeiträume inkubiert (15 Minuten und 120 Minuten). Zusätzlich wurden zwei weitere Gruppen vor der Stimulierung mit PDBu mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin (Apo) behandelt (150 µM bzw. 300 µM). Anschließend wurde per Durchflusszytometrie die Menge der generierten ROS untersucht. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzaktivität (MFI) der (A) CD11c⁺ MHCII stark exprimierenden BM-DCs sowie (B) der CD11c⁺ MHCII schwach exprimierenden BM-DCs. Gezeigt wird der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur unstimulierten Gruppe; § Unterschied zur LPS behandelten Gruppe.

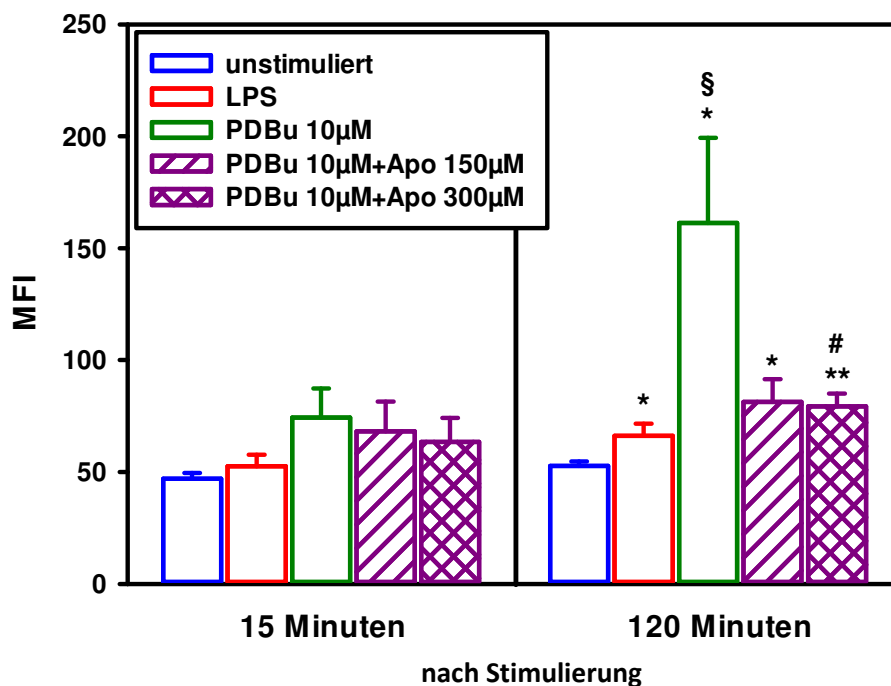


Abb. 12: Expression von MHCII auf der Oberfläche von CD11c⁺-BM-DCs nach Behandlung mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin im zeitlichen Verlauf

Tag acht BM-DCs wurden entweder im immaturren Zustand belassen oder mit 1,5 µg/ml LPS bzw. 10 µM PDBu stimuliert und über verschiedene Zeiträume inkubiert (15 Minuten und 120 Minuten). Zusätzlich wurden zwei weitere Versuchsansätze mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin (Apo) vor der Stimulierung mit PDBu behandelt (150 µM bzw. 300 µM). Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression des Oberflächenmoleküls MHCII untersucht. Dargestellt werden hier die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur unstimulierten Gruppe; § Unterschied zur LPS behandelten Gruppe; # Unterschied zur PDBu behandelten Gruppe.

3.1.3.2. Einfluss auf die Maturierung und die T-Zellstimulatorische Kapazität

Um den Einfluss und mögliche Auswirkungen des NADPH-Oxidase-Inhibitors Apocynin auf die Maturierung und die T-Zellstimulatorische Kapazität der BM-DCs zu untersuchen, wurden erneut die unter 3.9. erwähnten Versuchsansätze gewählt. 24 Stunden nach der Behandlung mit Apocynin und der anschließenden Stimulierung mit PDBu wurde die Expression der Oberflächenmoleküle CD86 und MHCII analysiert. Obwohl nach zweistündiger Inkubation in Gegenwart von Apocynin eine verminderte Expression von MHCII zu erkennen war (vgl. Abb. 12), ist dies nach 24 Stunden nicht mehr der Fall. Die Behandlung mit Apocynin zeigt keine signifikanten Unterschiede zu dem nur mit PDBu behandelten Versuchsansatz (Abb. 13). Dies trifft sowohl für die niedrige Apocynin-Dosis zu, als auch für die hohe von 300 μ M.

Um auch mögliche Auswirkungen der Behandlung mit Apocynin auf die T-Zellstimulatorische Kapazität der BM-DCs zu untersuchen, wurde erneut ein Proliferationstest mit allogenen T-Zellen durchgeführt (Abb. 14). Wie in vorangegangenen Experimenten auch, führt die Stimulation mit PDBu zu einer leicht verminderten Proliferation, verglichen mit LPS stimulierten BM-DCs. Obwohl die zusätzlich mit Apocynin behandelten BM-DCs bei der Maturierung keinen Unterschied zu den mit PDBu stimulierten BM-DCs aufweisen (Abb. 13), zeigen sie im Proliferationstest ein vermindertes T-Zellstimulatorisches Potential, verglichen mit den PDBu stimulierten BM-DCs (Abb. 14).

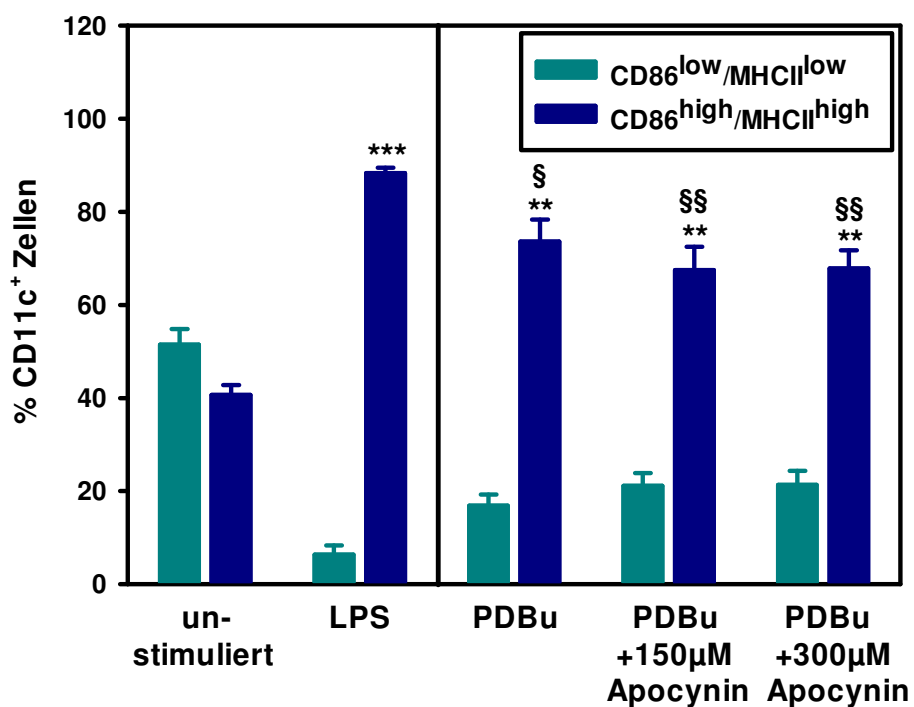


Abb. 13: Maturierung der CD11c⁺-BM-DCs 24 Stunden nach Stimulation und Behandlung mit Apocynin

BM-DCs (Tag 8) wurden mit 1,5µg/ml LPS oder 10 µM PDBu stimuliert bzw. blieben als Kontrolle unbehandelt. Zwei Versuchsansätze wurden zusätzlich mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin behandelt (150 µM bzw. 300 µM). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die Maturierung anhand der Expression der Oberflächenmarker MHCII und CD86 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Versuchen +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur unstimulierten Gruppe; § Unterschied zur LPS behandelten Gruppe.

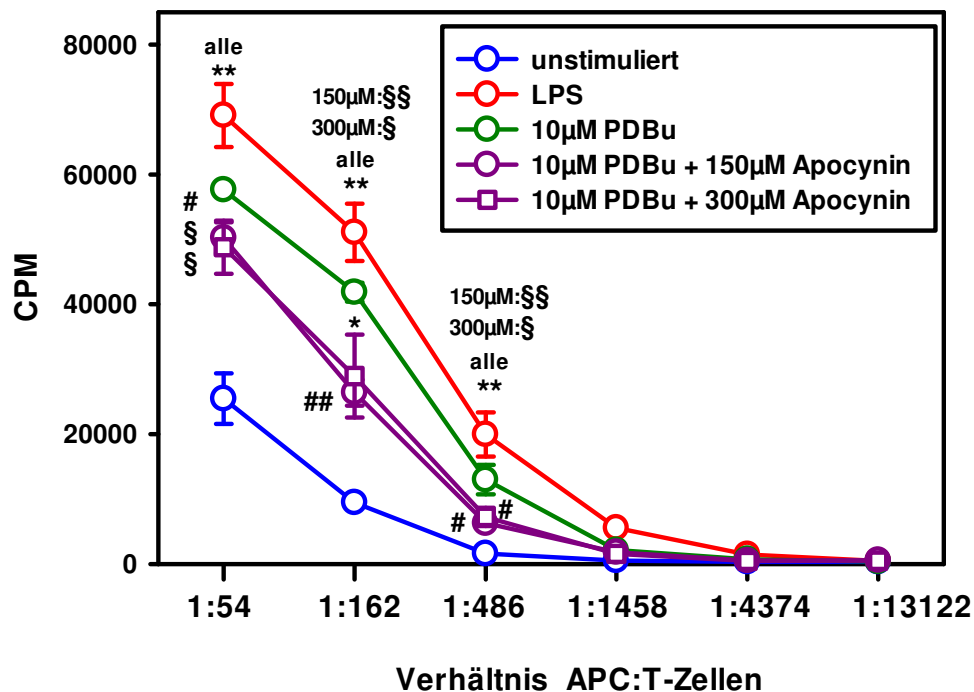


Abb. 14: Untersuchung der T-Zellstimulatorischen Kapazität von differentiell mit Apocynin behandelten BM-DCs

BM-DCs (Tag 8) wurden für 24 Stunden mit 1,5 µg/ml LPS oder 10 µM PDBu stimuliert bzw. unbehandelt belassen. In zwei weiteren Versuchsansätzen wurden BM-DCs vor der Stimulierung mit PDBu zusätzlich mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin (Apo) behandelt (Konzentration: 150 µM bzw. 300 µM). Anschließend wurden die BM-DCs in einer seriellen Verdünnung mit allogenen T-Zellen für 72 Stunden kokultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde den Kulturen ³HTdR hinzugefügt und die Inkubation für weitere 16 Stunden fortgesetzt. Anschließend wurde die Radioaktivität gemessen. Gezeigt ist hier ein repräsentatives Experiment von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten. Werte sind Mittelwerte der Triplikatansätze +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur unstimulierten Gruppe; § Unterschied zur LPS behandelten Gruppe; # Unterschied zur PDBu behandelten Gruppe.

3.1.4. Auswirkungen der Inhibition der NADPH-Oxidase mit Chelerythrin auf mit PDBu stimulierte BM-DCs

3.1.4.1. Einfluss auf die ROS-Produktion und die MHCII-Expression nach kurzen Zeitintervallen

Da die Verwendung von Apocynin nicht zu einer in gewünschtem Maße verminderten ROS-Produktion führte, wurde in einem weiteren Versuchsansatz ein weiterer Inhibitor verwendet. Das Alkaloid Chelerythrin, welches natürlicherweise im Schöllkraut (*Chelidonium majus*) zu finden ist, ist ein Proteinkinase C-Inhibitor. In höheren Dosen hat Chelerythrin starke Auswirkungen auf die Zellteilung, weswegen es therapeutisch als Zytostatikum eingesetzt werden soll (Patent EP 1309350 A2). Aus diesem Grund wurde vor Versuchsbeginn eine Bestimmung der Viabilität der BM-DCs mittels MTT-Test durchgeführt. Dazu wurden wie zuvor beschrieben ansteigende Dosen des Alkaloids zu den BM-DCs hinzugegeben und nach 24 Stunden die Überlebensrate der Zellen ermittelt (Daten hier nicht gezeigt). Aus diesem Test wurde ersichtlich, dass Konzentrationen höher als 10 μ M die Viabilität der BM-DCs stark einschränkten. In den folgenden Versuchen wurde daher eine Dosis von 10 μ M verwendet, um möglichst starke inhibitorische Effekte zu erhalten.

In Abbildung 15 ist die Auswirkung der Behandlung von BM-DCs mit Chelerythrin vor Stimulation mit PDBu gezeigt. Nach einer kurzen Inkubation von 15 Minuten ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nicht beeinträchtigt. Die Probe, die zuvor mit Chelerythrin behandelt wurde, zeigt sogar gerade in der MHCII niedrig exprimierenden Population einen stark erhöhten Wert. Nach 2-stündiger Inkubation ändert sich allerdings der Effekt. Hier ist ersichtlich, dass in der MHCII stark exprimierenden Population (Abb. 15 A) die ROS-Produktion sehr stark abnimmt. In der MHCII niedrig exprimierenden Population (Abb. 15 B) hingegen ist kaum ein Einfluss der Chelerythrin-Behandlung erkennbar. Die MFI-Werte liegen gleichauf mit den Werten der mit PDBu behandelten Probe.

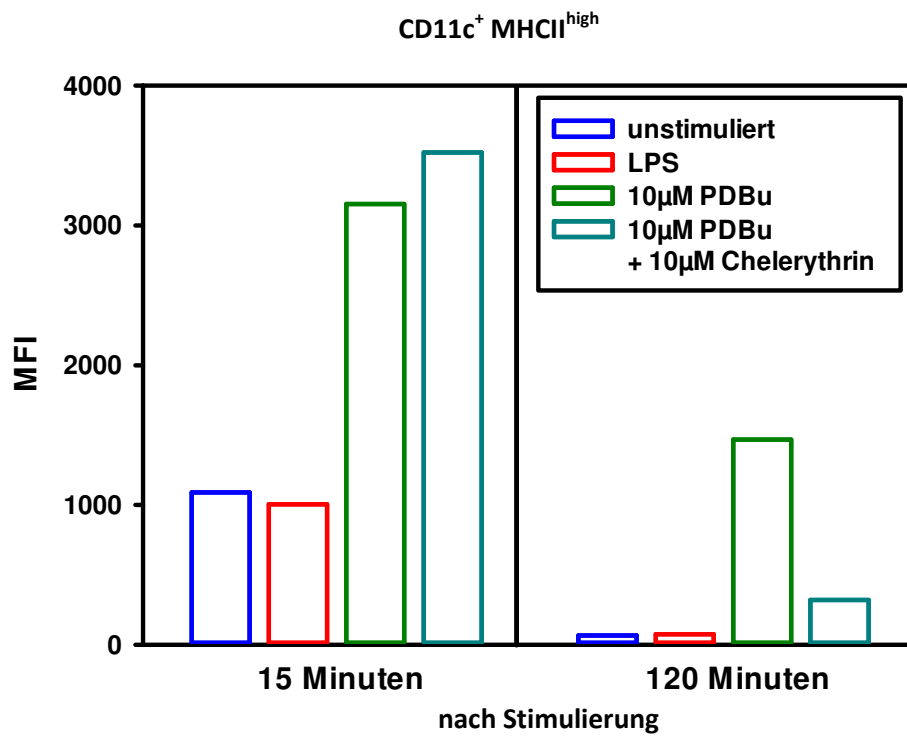
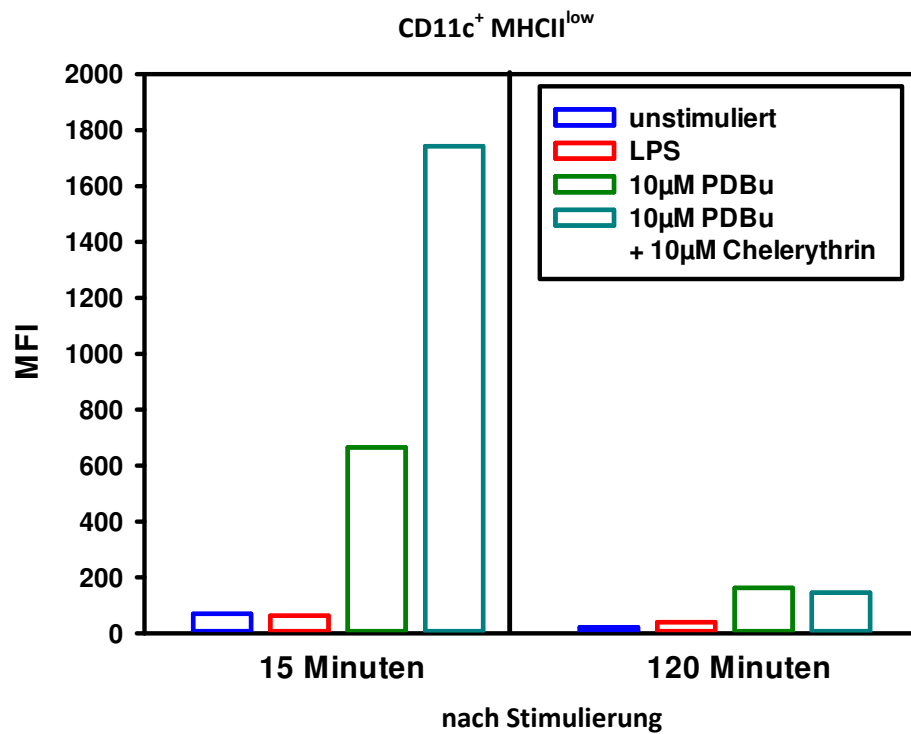
A**B**

Abb. 15: Vergleich der ROS-Produktion in CD11c⁺-BM-DCs nach Behandlung mit dem PKC-Inhibitor Chelerythrin im zeitlichen Verlauf

Tag acht BM-DCs wurden entweder im immaturren Zustand belassen oder mit 1,5 µg/ml LPS bzw. PDBu stimuliert und über verschiedene Zeiträume inkubiert (15 Minuten und 120 Minuten). Zusätzlich wurde eine weitere Gruppe vor der Stimulierung mit PDBu mit dem PKC-Inhibitor Chelerythrin behandelt (Dosis: 10 µM). Anschließend wurde per Durchflusszytometrie die Menge der generierten ROS untersucht. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzaktivität (MFI) der (A) CD11c⁺ MHCII stark exprimierenden BM-DCs sowie (B) der CD11c⁺ MHCII schwach exprimierenden BM-DCs. Gezeigt wird hier ein repräsentatives Experiment von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten.

Betrachtet man die Expression des Oberflächenmoleküls MHCII (Abb. 16), so ist ersichtlich, dass die Vorbehandlung mit Chelerythrin zu einer verminderten Expression führt. Dies trifft sowohl auf eine Inkubationszeit von 15 Minuten zu, als auch auf eine Inkubationszeit von 120 Minuten.

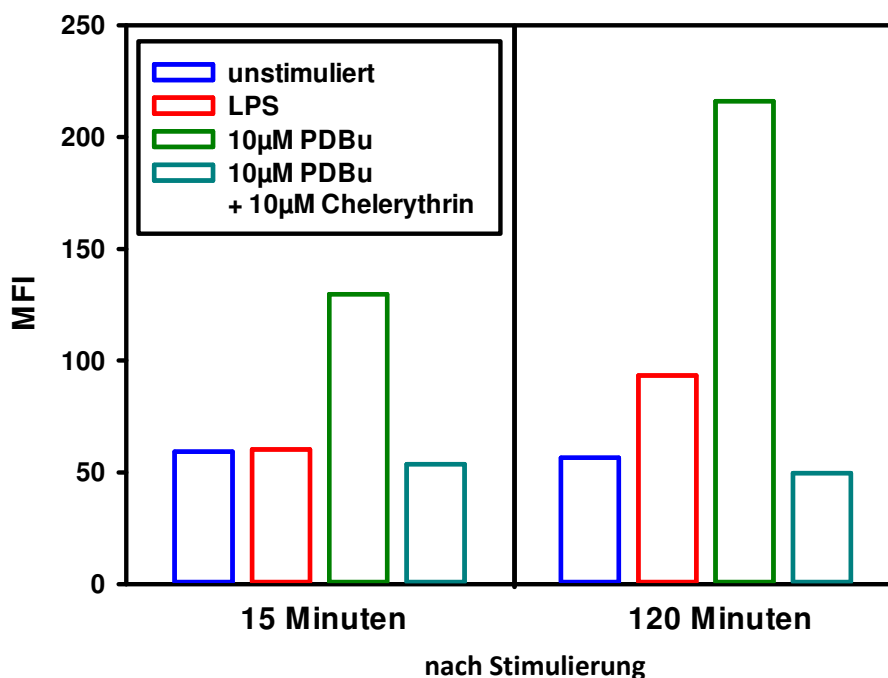


Abb. 16: Expression des Moleküls MHCII auf der Oberfläche von CD11c⁺-BM-DCs nach Behandlung mit Chelerythrin

BM-DCs (Tag 8) wurden entweder im immaturren Zustand belassen oder mit 1,5 µg/ml LPS bzw. 10 µM PDBu stimuliert und über verschiedene Zeiträume inkubiert (15 Minuten und 120 Minuten). Zusätzlich wurde ein weiterer Versuchsansatz mit dem PKC-Inhibitor Chelerythrin (10 µM) vor der Stimulierung mit PDBu behandelt. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression des Oberflächenmoleküls MHCII untersucht. Dargestellt ist hier ein repräsentatives Experiment von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten.

3.1.4.2. Auswirkung der Behandlung mit dem PKC-Inhibitor Chelerythrin auf PDBu-stimulierte BM-DCs nach 24-stündiger Inkubation

Wie schon im vorherigen Abschnitt dargestellt, zeigen BM-DCs, die sowohl mit PDBu als auch mit Chelerythrin behandelt wurden, eine verminderte Expression des Oberflächenmoleküls MHCII (Abb. 16) verglichen mit DCs, die nur mit PDBu stimuliert wurden. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung zeigen BM-DCs, die sowohl mit PDBu als auch mit Chelerythrin behandelt wurden, nach 24-stündiger Inkubation einen sehr unreifen Phänotyp (Abb. 17). Die Moleküle MHCII und CD86 werden ähnlich schwach exprimiert, wie in der unbehandelten Probe. Die Stimulation mit PDBu allein hingegen führt zu einer Ausreifung ähnlich der nach LPS-Stimulation, wie es auch in vorherigen Experimenten gezeigt werden konnte.

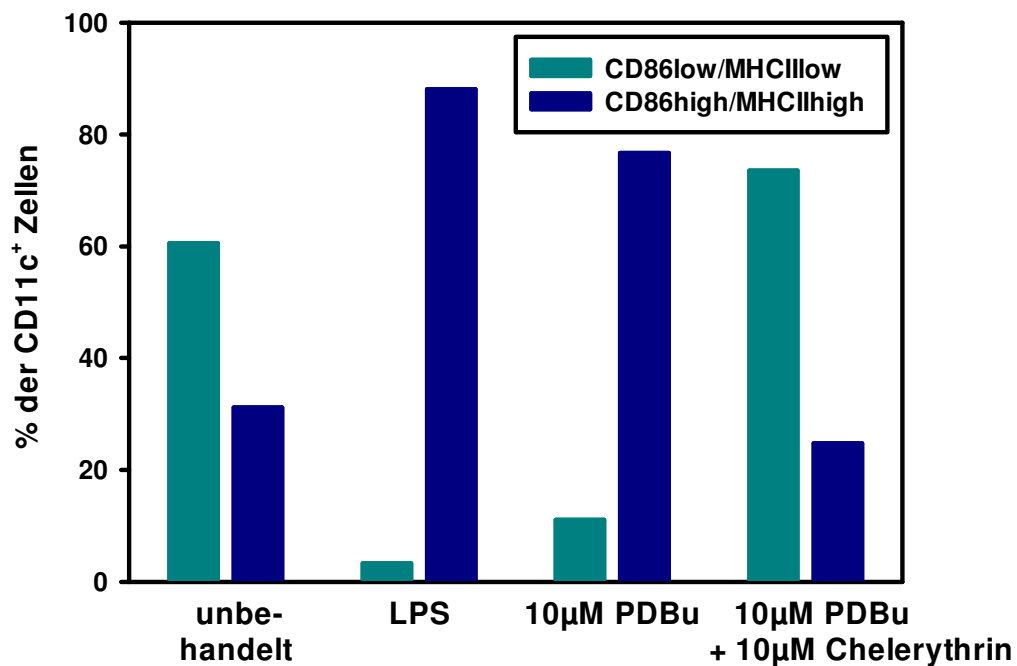


Abb. 17: Maturierung der CD11c⁺-BM-DCs 24 Stunden nach Stimulation und Behandlung mit Chelerythrin

BM-DCs wurden mit 1,5 µg/ml LPS oder 10 µM PDBu stimuliert bzw. blieben als Kontrolle unbehandelt. Ein Versuchsansatz wurde zusätzlich mit 10 µM Chelerythrin behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die Maturierung anhand der Expression der Oberflächenmarker MHCII und CD86 untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten.

Obwohl die BM-DCs, die mit Chelerythrin und PDBu behandelt wurden, nach der 24-stündigen Inkubation noch viabel waren, so war mikroskopisch bereits erkennbar, dass die Zellen beeinträchtigt waren. Dies führte dazu, dass kein Proliferationstest durchgeführt werden konnte. Nach einer zusätzlichen Inkubationszeit war erkennbar, dass die BM-DCs die Behandlung nicht überlebten.

3.1.5. Analyse der Effekte einer Stimulation mit PDBu auf die ROS-Generierung und den Phänotyp bei Verwendung von gp91^{phox -/-} knockout-BM-DCs

3.1.5.1. Auswirkungen auf die ROS-Produktion und die MHCII-Expression nach kurzen Zeitintervallen

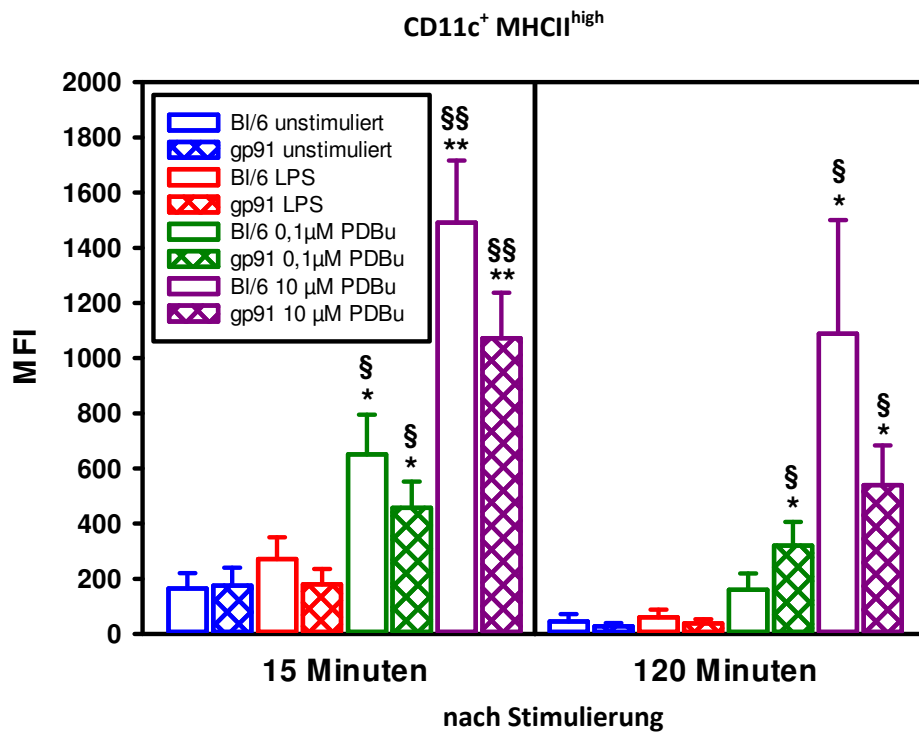
Um die durch die Verwendung der Inhibitoren gewonnenen Ergebnisse zu validieren, wurden in einem weiteren Versuchsansatz BM-DCs verwendet, die von gp91^{phox -/-} knockout-Mäusen stammten. Diese Mäuse besitzen eine nicht-funktionale Untereinheit gp91^{phox} der NADPH-Oxidase (siehe auch Abb. 1) und sind daher nicht in der Lage über die NADPH-Oxidase reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren.

Wie in den vorangegangenen Experimenten wurden auch hier BM-DCs mit 10 µM PDBu bzw. 1,5 µg/ml LPS stimuliert oder zur Kontrolle unbehandelt belassen. Von jeder Gruppe gab es zwei Versuchsansätze: Zum einen wurden BM-DCs von gp91^{phox -/-} knockout Mäusen (gp91^{phox -/-} BM-DCs) verwendet, zum anderen BM-DCs aus den entsprechenden Wildtyp-Mäusen (WT BM-DCs).

In Abbildung 18 ist die ROS-Produktion vergleichend dargestellt. In der MHCII hoch exprimierenden Population ist eine leicht geringere ROS-Generierung bei allen gp91^{phox -/-} BM-DCs im Vergleich zu den Wildtyp-BM-DCs zu beobachten. In der MHCII niedrig exprimierenden Population ist nach 15 minütiger Inkubation der Unterschied deutlicher sichtbar. Hier zeigen die mit 10 µM PDBu stimulierten gp91^{phox -/-} BM-DCs eine signifikant geringere ROS-Generierung als die entsprechende Wildtypkontrolle.

Betrachtet man die Auswirkungen auf das Molekül MHCII, so zeigen die gp91^{phox -/-} BM-DCs eine vergleichbare Expressionsdichte (Abb. 19). Weder nach einem kurzen Inkubationszeitraum von 15 Minuten noch nach 120 minütiger Inkubation ist ein Unterschied zur jeweiligen Wildtypkontrolle detektierbar.

A



B

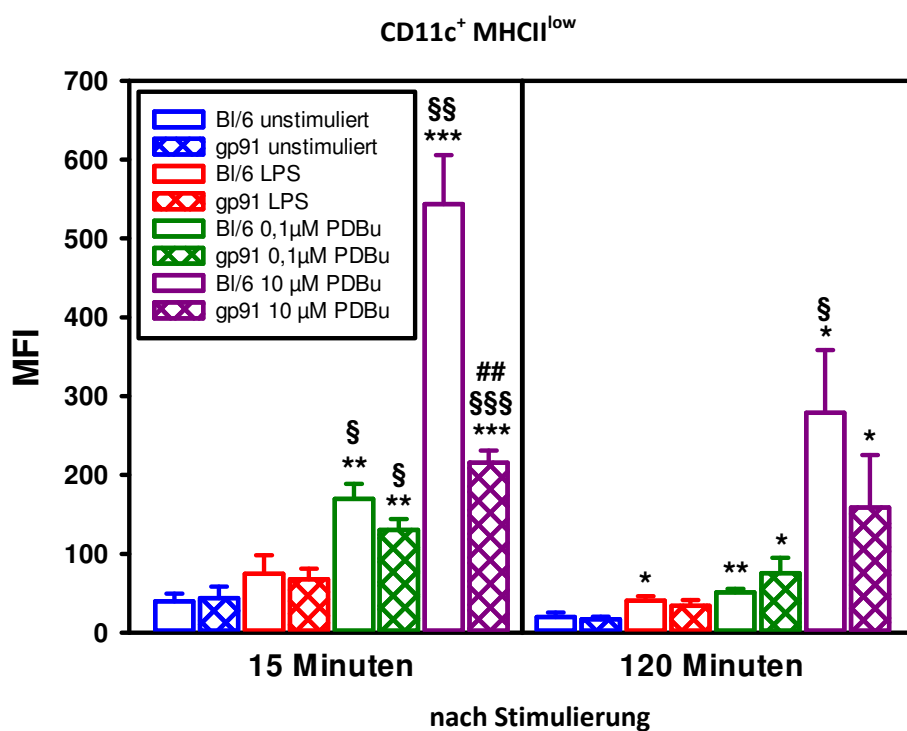


Abb. 18: Vergleich der ROS-Produktion in CD11c⁺-BM-DCs aus gp91^{phox}^{-/-} knockout Mäusen bzw. den entsprechenden Wildtypen

BM-DCs wurden aus dem Knochenmark von gp91^{phox}^{-/-} knockout Mäusen (gp91) gewonnen oder aus den entsprechenden Wildtypen (B1/6). Die DCs wurden an Tag 8 entweder im immaturren Zustand belassen oder mit 1,5 µg/ml LPS bzw. PDBu (0,1 µM bzw. 10 µM) stimuliert und über verschiedene Zeiträume inkubiert (15 Minuten und 120 Minuten). Die generierte ROS-Menge wurde anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzaktivität (MFI) der (A) CD11c⁺ MHCII stark exprimierenden BM-DCs sowie (B) der CD11c⁺ MHCII schwach exprimierenden BM-DCs. Gezeigt wird der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur jeweiligen unstimulierten Kontrolle; § Unterschied zur jeweiligen LPS behandelten Kontrolle; # Unterschied zur jeweiligen Wildtyp Gruppe.

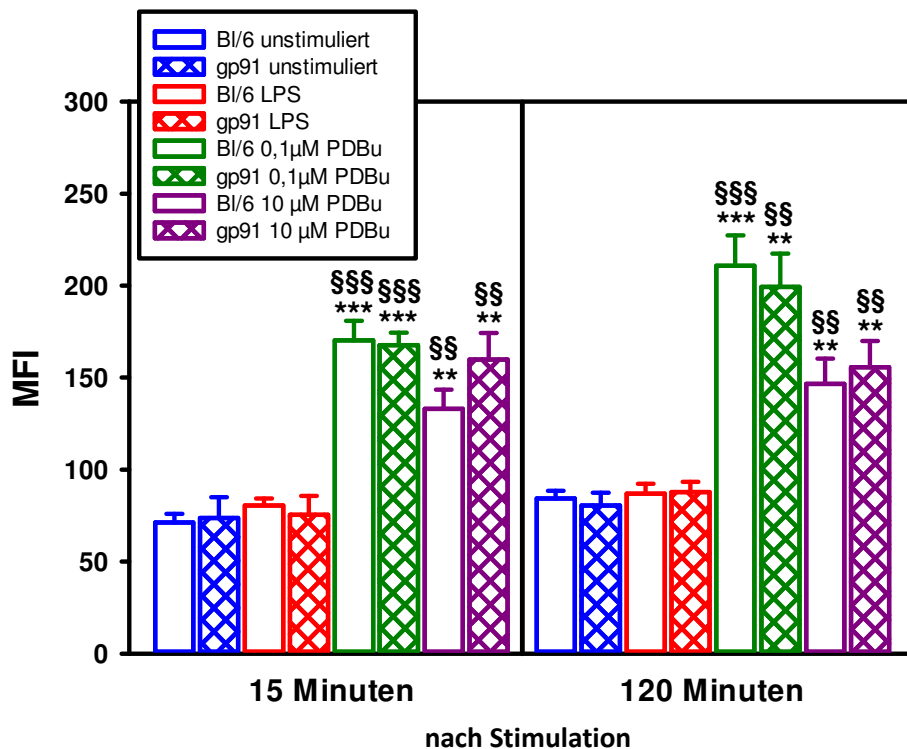


Abb. 19: Expression von MHCII auf der Oberfläche von CD11c⁺-BM-DCs aus gp91^{phox}^{-/-} knockout Mäusen bzw. den entsprechenden Wildtypen

BM-DCs von gp91^{phox}^{-/-} knockout Mäusen (gp91) bzw. ihren entsprechenden Wildtypen (B1/6) wurden entweder im immaturren Zustand belassen oder mit 1,5 µg/ml LPS bzw. PDBu (0,1 µM bzw. 10 µM) stimuliert und über verschiedene Zeiträume inkubiert (15 Minuten und 120 Minuten). Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression des Oberflächenmoleküls MHCII untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur jeweiligen unstimulierten Kontrolle; § Unterschied zur jeweiligen LPS behandelten Kontrolle.

3.1.5.2. Analyse der phänotypischen und funktionalen Auswirkungen der Stimulation mit PDBu bei der Verwendung von gp91^{phox -/-} knockout BM-DCs nach langen Inkubationszeiträumen

Zusätzlich zu den Analysen nach kurzen Zeitabständen wurden auch Untersuchungen zu den Auswirkungen der reduzierten ROS-Produktion auf den Phänotyp und die Funktion der BM-DCs angefertigt.

Wie in Abbildung 20 erkennbar, hat die Inaktivierung der NADPH-Oxidase keine Auswirkung auf die phänotypische Maturierung der BM-DCs. In beiden Versuchsansätzen (Wildtyp und knockout) weisen unbehandelte DCs einen stark immaturren Phänotyp mit einer geringen Expression von MHCII und CD86 auf. Mit 1,5 µg/ml LPS stimulierte BM-DCs zeigen sowohl bei der Wildtyp-Gruppe eine starke Ausreifung, als auch bei der gp91^{phox -/-} knockout-Gruppe. Auch nach Stimulierung mit 10 µM PDBu ist die Maturierung in beiden Gruppen auf einem ähnlichen Niveau.

Ähnliche Ergebnisse ergeben sich bei der Messung der T-Zellstimulatorischen Kapazität. Die ermittelten Werte der gleich behandelten Gruppen (immatur, LPS-bzw. PDBu-stimuliert) sind ähnlich (Abb. 21), unabhängig davon, ob die NADPH-Oxidase funktional ist oder nicht. Lediglich in den mit LPS stimulierten Versuchsansätzen ist ein leichter, jedoch nicht signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und knockout zu erkennen.

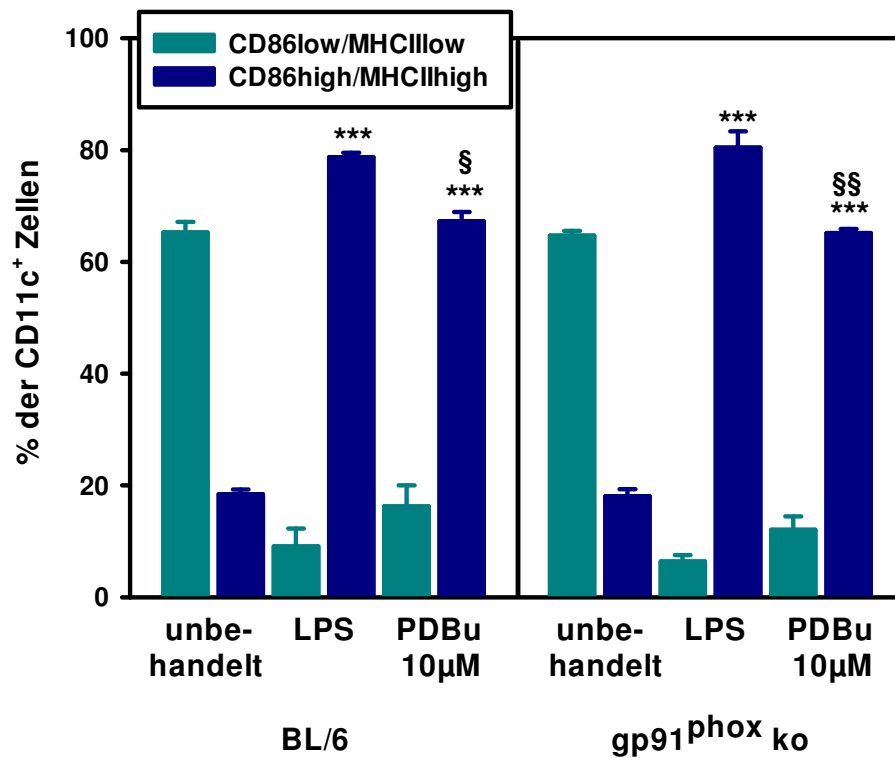


Abb. 20: Maturierung der CD11c⁺-BM-DCs 24 Stunden nach Stimulation mit PDBu

BM-DCs von gp91^{phox} ^{-/-} knockout-Mäusen und ihren entsprechenden Wildtypen wurden mit 1,5 µg/ml LPS oder 10 µM PDBu stimuliert bzw. blieben als Kontrolle unbehandelt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die Maturierung anhand der Expression der Oberflächenmarker MHCII und CD86 untersucht. Dargestellt ist hier der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten +/- SEM.

Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur jeweiligen unstimulierten Kontrolle; § Unterschied zur jeweiligen LPS behandelten Kontrolle.

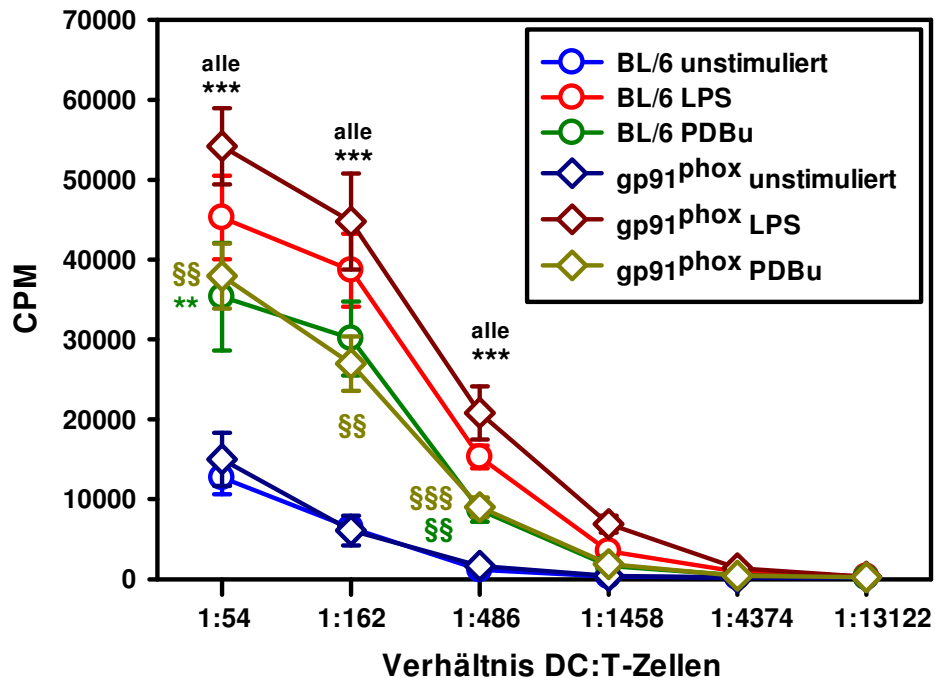


Abb. 21: Untersuchung der T-Zellstimulatorischen Kapazität von differentiell behandelten BM-DCs

BM-DCs von gp91^{phox} ^{-/-} knockout-Mäusen bzw. dem entsprechenden Wildtyp (BL/6) wurden für 24 Stunden mit 1,5 µg/ml LPS oder 10 µM PDBu stimuliert bzw. unbehandelt belassen. Anschließend wurden die BM-DCs in einer seriellen Verdünnung mit allogenen T-Zellen für 72 Stunden kokultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde den Kulturen 3HTdR hinzugefügt und die Inkubation für weitere 16 Stunden fortgesetzt. Durch Messung der Radioaktivität wurde die Proliferation der T-Zellen bestimmt. Gezeigt sind hier die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur jeweiligen unstimulierten Kontrolle; § Unterschied zur jeweiligen LPS behandelten Kontrolle.

3.2. Versuche zur Aggregation zwischen dendritischen Zellen und Thrombozyten

Wie bereits einleitend beschrieben, ist mittlerweile bekannt, dass dendritische Zellen an der Entstehung und dem Fortschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt sind, z.B. bei Thrombose und Arteriosklerose. Im Folgenden sollen mögliche Interaktionen zwischen DCs und Thrombozyten im humanen System genauer untersucht werden. Diese Untersuchungen wurden in einem Lichttransmissions-Aggregometer durchgeführt im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung der DCs bei einer Thrombusbildung. Weiterhin stellt dieses System eine gute Vergleichsmöglichkeit zum physiologischen Geschehen dar, da die Zellen während der Messung gerührt und somit ein Zell-Zell-Kontakt induziert wird, was auch im Blutstrom passiert.

Für die nachfolgenden Versuche wurden humane Monozyten-abgeleitete DCs wie unter 2.2.4.1.ff. beschrieben generiert. An Tag acht wurden die DCs für die folgenden Analysen verwendet. Zur Gewinnung humaner Thrombozyten wurde wie unter 2.2.4.4. beschrieben am jeweiligen Versuchstag den Probanden Zitrat-antikoagulierte Blut entnommen und durch Zentrifugation Plättchenreiches Plasma (PRP) bzw. Plättchenarmes Plasma (PPP) aufgereinigt.

3.2.1. Titration von DCs und Thrombozyten für eine optimale Aggregation

Um eine möglichst starke Aggregation der Zellen zu erlangen, wurden zuerst unterschiedliche Konzentrationen und Mengenverhältnisse getestet. Die Stärke der Aggregation wurde anhand zweier Parameter beurteilt: der maximalen Aggregation und der prozentualen Steigung der Aggregationskurve als Wert für die Geschwindigkeit der Aggregation. In Abbildung 22 A ist beispielhaft ein Diagramm zur Verdeutlichung der Aggregation und der entsprechenden Messkurven dargestellt. Gezeigt wird in diesem Beispiel das Aggregationsverhalten von DCs in ansteigender Konzentration bei konstanter Thrombozytenanzahl. Als Kontrolle wurden bei jedem Experiment die DCs allein nur mit PPP gemessen (Abb. 22 B). Hier war in

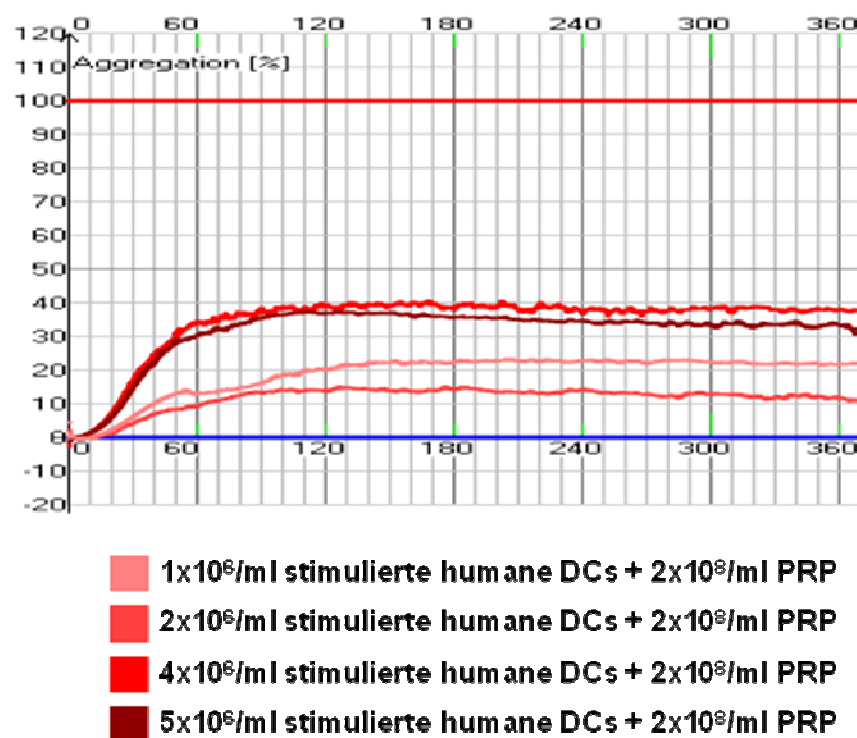
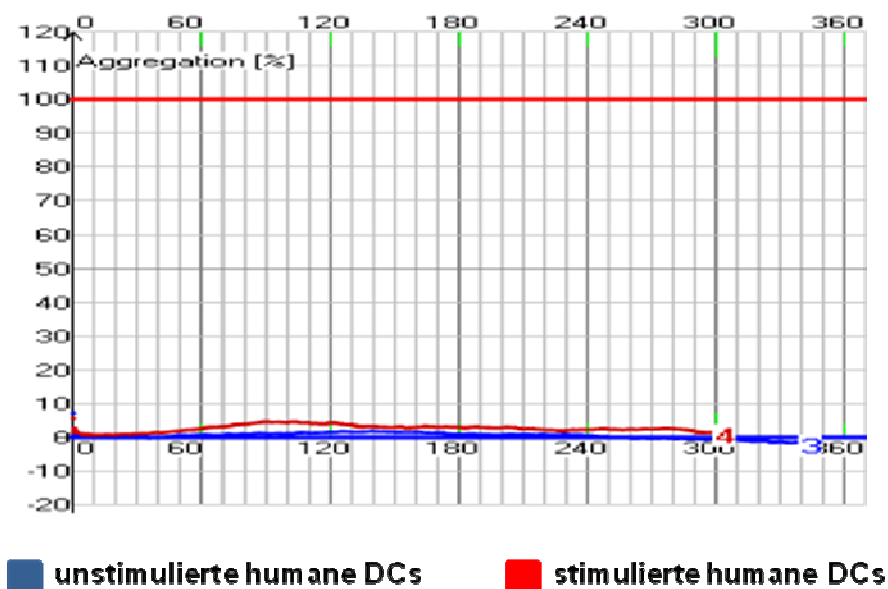
A**B**

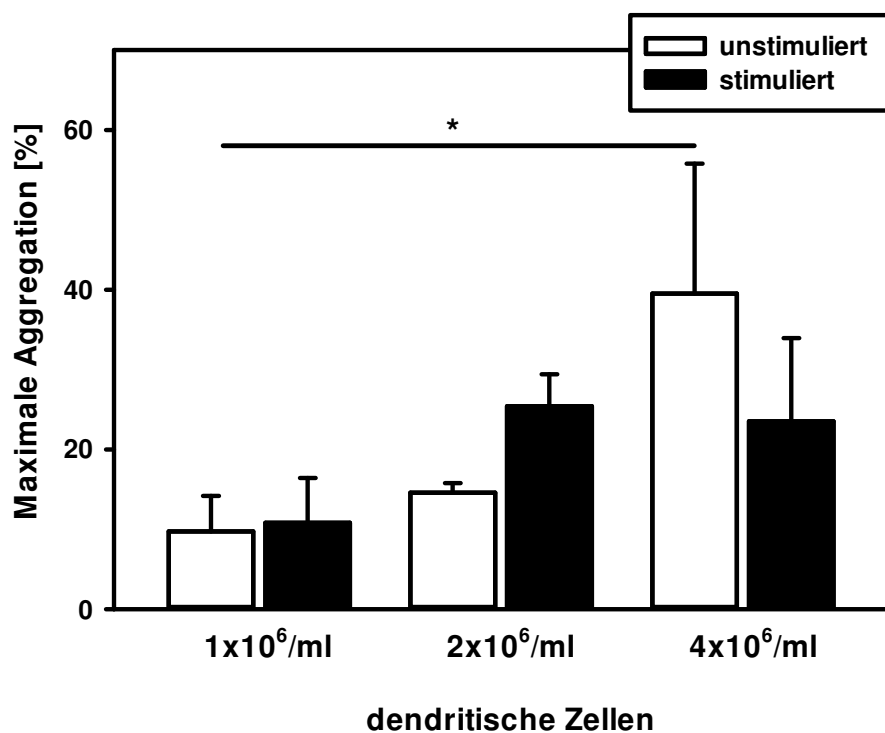
Abb. 22: Beispielhafte Darstellung einer Aggregationsmessung

(A) Zur beispielhaften Darstellung einer Aggregationsmessung wurden 2x10⁸/ml PRP zusammen mit ansteigenden Konzentrationen stimulierter humaner DCs über einen Zeitraum von 6 Minuten im Aggregometer gemessen. (B) Als Kontrolle wurden 4x10⁶/ml humane DCs (unstimuliert in blau, stimuliert in rot) zusammen mit PPP im Aggregometer gemessen.

keinem der durchgeführten Experimente eine Aggregation messbar. Ebenso verhielt es sich mit den Thrombozyten allein. Auch bei dieser Kontrollmessung war zu keinem Zeitpunkt eine Aggregation messbar (Daten nicht gezeigt). Zur Überprüfung der Funktionalität der Plättchen wurde zusätzlich getestet, ob sich diese aktivieren lassen, z. B. mittels Thrombin. Bei diesen Untersuchungen konnte immer eine Aggregation des PRP allein festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 23 dargestellt sind die Ergebnisse bei Verwendung von 1×10^8 /ml Thrombozyten im plättchenreichen Plasma (PRP) und variierenden Konzentrationen von immaturren und maturaen DCs. Gut zu erkennen ist, dass die stärkste Aggregation bei immaturren DCs bei Verwendung der höchsten DC-Konzentration von 4×10^6 /ml erreicht wird (Abb. 23 A). Passend dazu weisen diese DCs auch in der Steigung einen Peak bei Verwendung der höchsten Konzentration auf (Abb. 23 B). Im Gegensatz dazu ist die Steigung bei stimulierten DCs bei einer Konzentration von 2×10^6 /ml höher als bei einer Konzentration von 4×10^6 /ml (Abb. 23 B). Betrachtet man sich die Aggregationsstärke der stimulierten DCs, so ist die stärkste Aggregation bei den Konzentrationen von 2×10^6 /ml und 4×10^6 /ml messbar (Abb. 23 A).

A



B

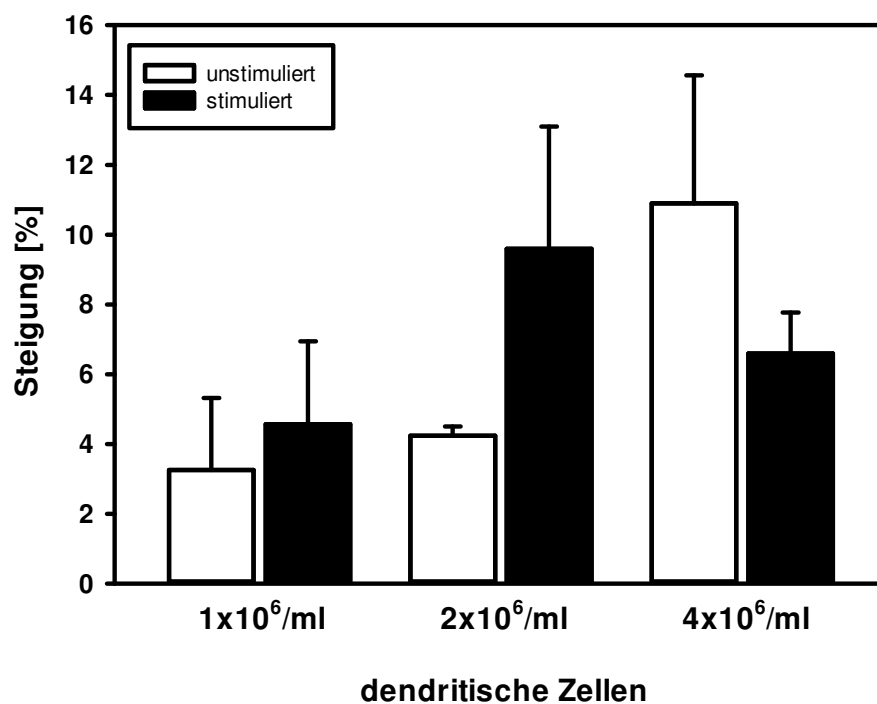
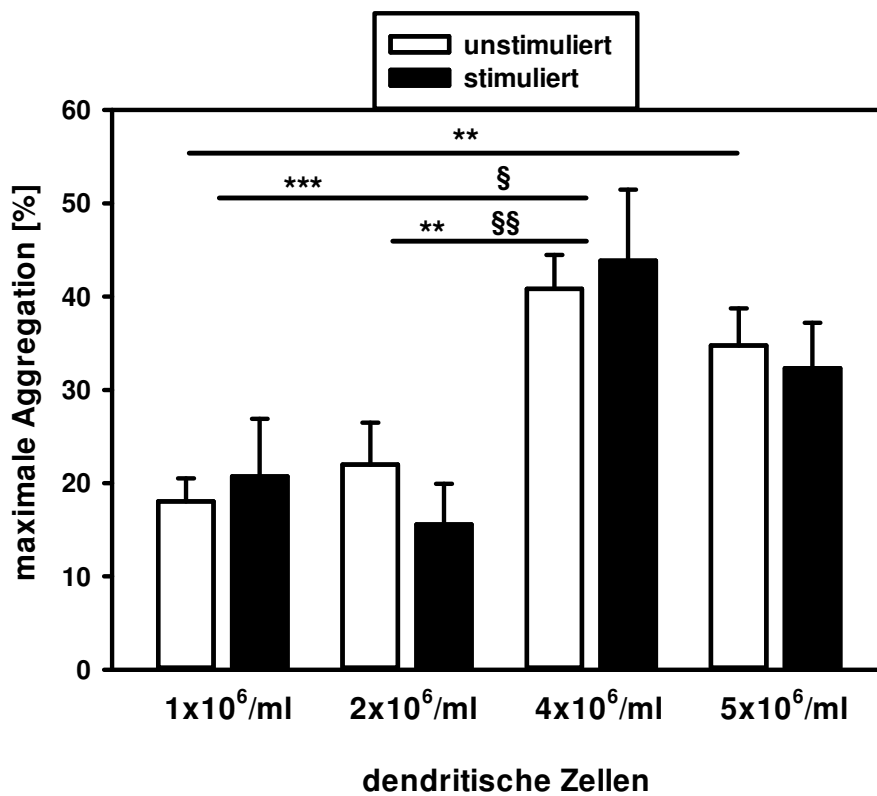


Abb. 23: Maximale Aggregation und Steigung der Aggregationskurve bei Koinkubation von $1 \times 10^8/\text{ml}$ PRP mit DCs in ansteigenden Konzentrationen

$1 \times 10^8/\text{ml}$ PRP wurden zusammen mit ansteigenden Konzentrationen humaner DCs im Aggregometer inkubiert. Die DCs waren entweder unstimuliert und immatur (weiße Balken) oder wurden mit einem Zytokincocktail stimuliert (mature DCs, schwarze Balken). Dargestellt ist (A) die maximale Aggregation und (B) die Steigung der Aggregationskurve. N= 2-4 , Mittelwerte $\pm$ SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * versus unstimuliert

Weiterhin wurde eine zweite Thrombozytenkonzentration von $2 \times 10^8/\text{ml}$ ausgetestet (Abb. 24).

A



B

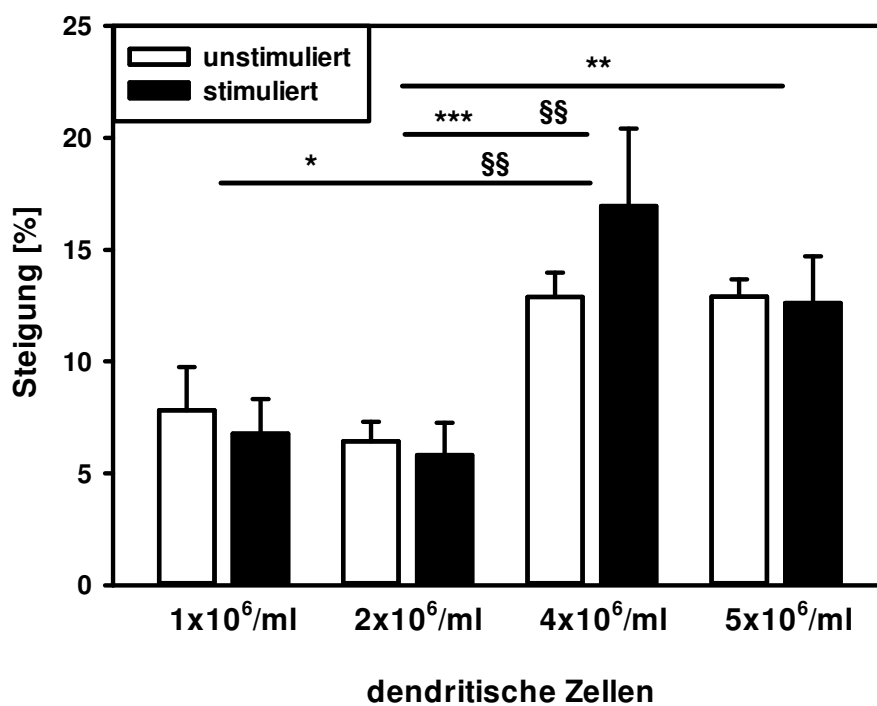


Abb. 24: Maximale Aggregation und Steigung der Aggregationskurve bei Koinkubation von 2×10^8 /ml PRP mit ansteigenden DC-Konzentrationen

2×10^8 /ml PRP wurden zusammen mit ansteigenden Konzentrationen humaner DCs im Aggregometer gemessen. Die DCs waren entweder unstimuliert und immatur (weiße Balken) oder wurden mit einem Zytokincocktail stimuliert (mature DCs, schwarze Balken). Dargestellt ist (A) die maximale Aggregation und (B) die Steigung der Aggregationskurve. N= 2-5 , Mittelwerte +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * versus unstimuliert; § versus stimuliert

Wie zuvor bei der Verwendung einer Plättchenkonzentration von 1×10^8 /ml (Abb. 23) ist auch bei der Verwendung von 2×10^8 /ml PRP eine konzentrationsabhängige Steigerung der maximalen Aggregation erkennbar. Allerdings erreicht diese sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten DCs einen höchsten Punkt bei 4×10^6 /ml DCs und fällt bei einer höheren Konzentration wieder ab (Abb. 24 A). Dies ist ebenfalls der Fall, wenn man sich die Steigung der jeweiligen Aggregationskurven betrachtet (Abb. 24 B). Weder bei der maximalen Aggregation, noch beim Grad der Steigung ist ein signifikanter Unterschied zwischen unstimulierten und maturaen DCs zu erkennen.

Für weitergehende Versuche wurde aufgrund der vorliegenden Befunde eine Konzentration von 2×10^8 /ml Thrombozyten im plättchenreichen Plasma und 4×10^6 /ml DCs gewählt.

3.2.2. Einfluss von Tissue Factor auf die Aggregation

Tissue Factor (TF) ist eines der Schlüsselmoleküle der Blutgerinnung. Es ist der Ausgangspunkt des extrinsischen Weges der Gerinnungskaskade. Die in dieser Arbeit generierten Monozyten-abgeleiteten DCs sind in der Lage, TF auf ihrer Oberfläche zu exprimieren (Abb. 25). Zum Nachweis wurden DCs an Tag acht mit einem anti-TF Antikörper gefärbt und die Expression durchflusszytometrisch bestimmt. In Abbildung 25 ist ersichtlich, dass sowohl unstimulierte DCs als auch mit Zytokinen ausgereifte mature DCs in der Lage sind, Tissue Factor in moderaten Mengen auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Zur Kontrolle wurde eine Isotyp-Färbung der DCs durchgeführt.

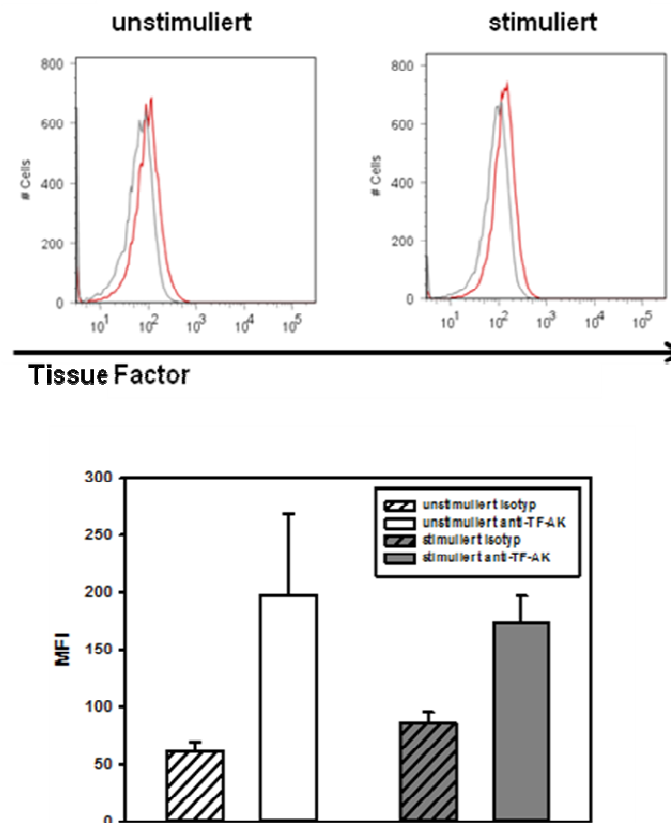


Abb. 25: Expression von Tissue Factor auf der Oberfläche dendritischer Zellen

Acht Tage alte DCs wurden mit einem anti-TF-Antikörper (anti-TF-AK) gefärbt (15 min bei 4°C) und die Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Zur Kontrolle wurden Aliquote der DCs mit dem entsprechenden Isotyp-Antikörper gefärbt. In der oberen Hälfte der Abbildung ist das Ergebniss der FACS-Analyse eines Spenders beispielhaft als Histogramm dargestellt. Die untere Darstellung zeigt die Zusammenfassung der mittleren Fluoreszenzintensität zweier unabhängiger Messungen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM.

Diese Expression von Tissue Factor durch dendritische Zellen kann potentiell den extrinsischen Pfad der Gerinnungskaskade aktivieren und so möglicherweise eine Aggregation hervorrufen. Um dies zu untersuchen, wurden die DCs vor der Inkubation mit Thrombozyten für zehn Minuten mit einem funktionsblockierenden anti-TF-Antikörper präinkubiert. Dieser bindet an den Tissue Factor bzw. den TF/Faktor VII-Komplex und verhindert so zum einen die katalytische Funktion des Komplexes, bewirkt aber zudem auch die Spaltung des TF/Faktor VII-Komplexes (Ruf et al., 1991). Außerdem wurde ein Serin-Proteasen-Inhibitor verwendet, der Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor (TFPI). Dieser inhibiert die Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade durch Interaktion mit dem TF/Faktor VII-Komplex

(http://www.charite.de/fileadmin/user_upload/microsites/m_cc05/ilp/referenzdb/10568074.htm).

In Abbildung 26 sind die Ergebnisse der Verwendung des anti TF-Antikörpers dargestellt.

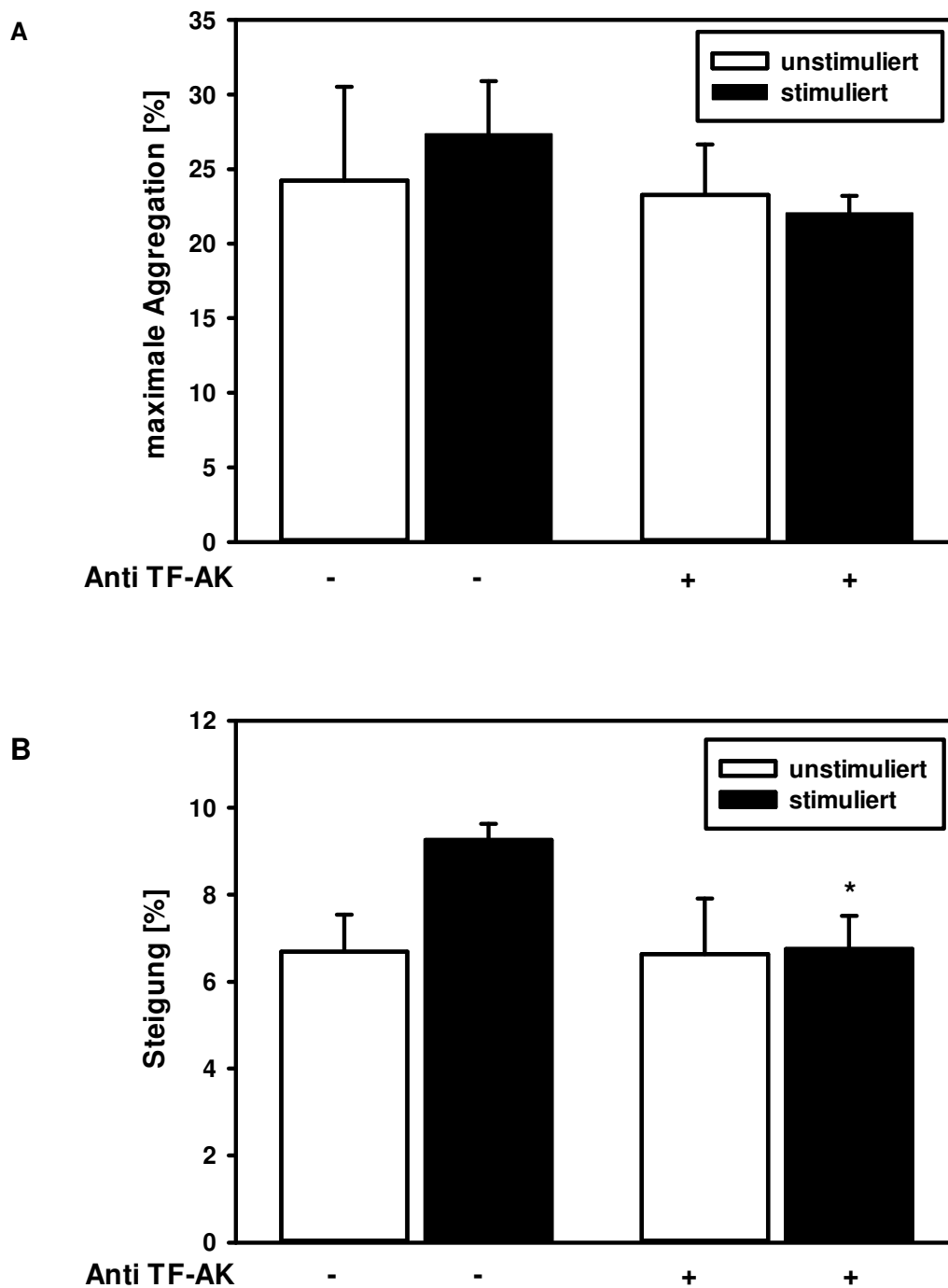


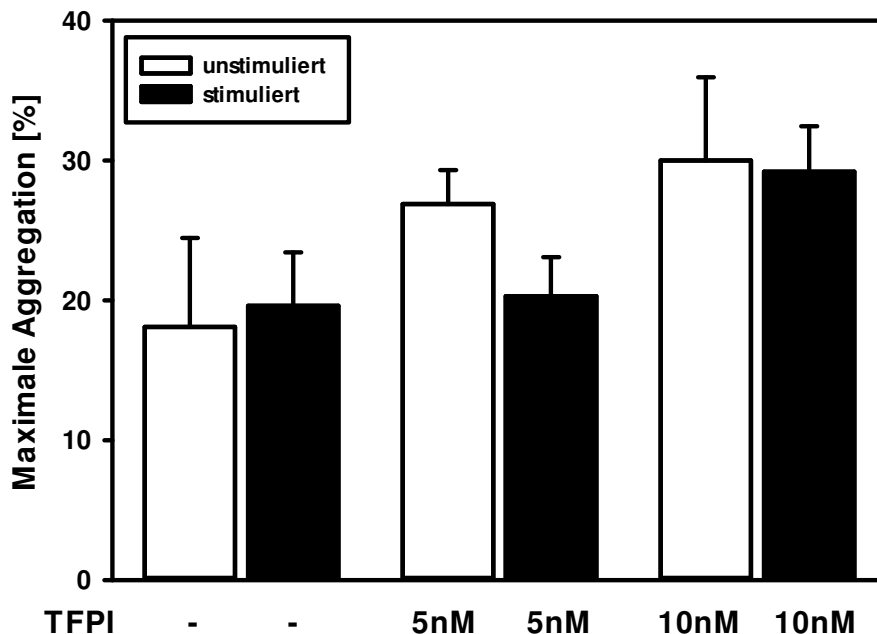
Abb. 26: Maximale Aggregation und Steigung der Aggregationskurve bei Koinkubation von PRP zusammen mit DCs, die zuvor mit dem inhibierenden anti-Tissue-Factor-Antikörper präinkubiert wurden

2×10^8 /ml PRP wurden zusammen mit 4×10^6 /ml humanen DCs im Aggregometer inkubiert. Die DCs waren entweder unstimuliert und immatur (weiße Balken) oder wurden mit einem Zytokincocktail stimuliert (mature DCs, schwarze Balken). Vor der Koinkubation mit den Thrombozyten wurden jeweils ein Aliquot der DCs für 10 Minuten bei 4°C mit 50 µl/ml anti-Tissue-Factor-Antikörper behandelt. Dargestellt ist (A) die maximale Aggregation und (B) die Steigung der Aggregationskurve. N= 3 , Mittelwerte +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: *
Unterschied zur jeweiligen Kontrolle ohne Antikörper.

Die Stärke der Aggregation wurde bei unstimulierten DCs nicht inhibiert durch die Verwendung des anti-TF-Antikörpers. Bei stimulierten DCs ist eine leicht geringere Aggregation messbar, allerdings ist diese nicht statistisch signifikant (Abb. 26 A). Ähnlich ist das Ergebnis in Hinsicht auf die Steigung der Aggregationskurve. Bei den unstimulierten DCs ist auch hier kein Unterschied zur Verwendung des anti-TF-Antikörpers zu detektieren, wohingegen bei den stimulierten DCs ein signifikanter Rückgang der Steigung messbar ist (Abb. 26 B).

Verwendet man den Serin-Proteasen-Inhibitor Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor (TFPI) so ist ersichtlich, dass die Vorinkubation der DCs weder mit einer Konzentration von 5 nM, noch von 10 nM zu einer Inhibition der Aggregation führt (Abb. 27 A). Weder bei unstimulierten DCs, noch bei stimulierten DCs konnte ein Rückgang der Aggregation erzielt werden. Sowohl die Stärke der Aggregation (Abb. 27 A) als auch die Steigung der Messkurven nimmt sogar bei Verwendung des TFPI zu (Abb. 27 B). Aufgrund der vorliegenden Resultate scheint der von DCs exprimierte Tissue Factor nicht entscheidend an der Aggregation zwischen DCs und Thrombozyten beteiligt zu sein.

A



B

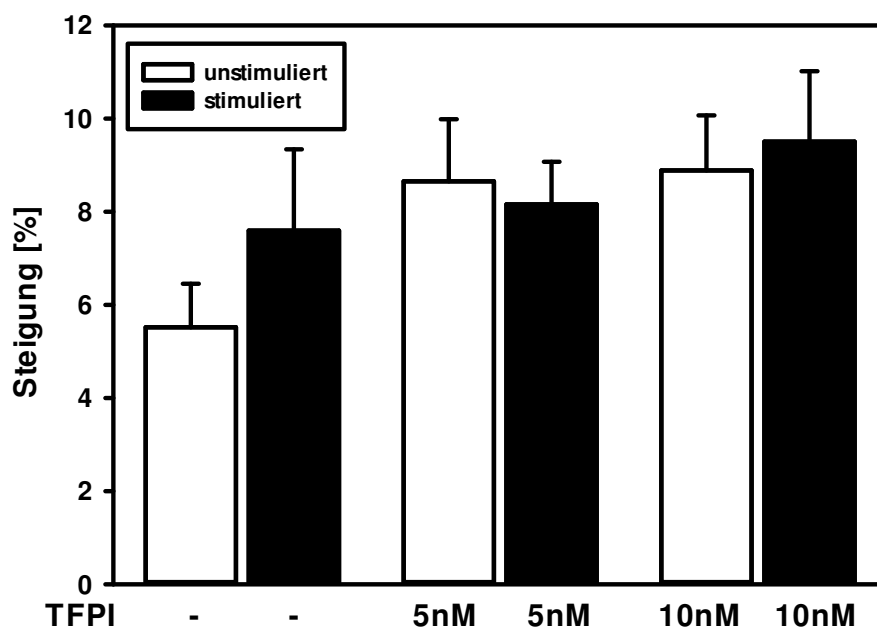


Abb. 27: Maximale Aggregation und Steigung der Aggregationskurve bei Koinkubation von 2×10^8 /ml PRP zusammen mit 4×10^6 /ml DCs, die zuvor mit Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor präinkubiert wurden

2×10^8 /ml PRP wurden zusammen mit 4×10^6 /ml humanen DCs im Aggregometer gemessen. Die DCs waren entweder unstimuliert und immatur (weiße Balken) oder wurden mit einem Zytokincocktail stimuliert (mature DCs, schwarze Balken). Vor der Koinkubation mit den Thrombozyten wurde jeweils ein Aliquot der DCs für 5 Minuten bei 4°C mit dem Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor präinkubiert. Dargestellt ist (A) die maximale Aggregation und (B) die Steigung der Aggregationskurve. N= 4 , Mittelwerte +/- SEM.

3.2.3. Rolle von Thrombin bei der Aggregation

Thrombin ist der Schnittpunkt der extrinsischen und der intrinsischen Gerinnungskaskade. Dendritische Zellen sind in der Lage, Thrombin zu generieren, wie durch eigene Messungen gezeigt werden konnte (Abb. 28). In diesem Experiment wurde das PPP durch einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt von Thrombozyten depletiert, so dass plättchenfreies Plasma (PFP) entsteht. Gut zu erkennen ist, dass die DCs in Medium kein Thrombin generieren (grüne Kurve), während sie zusammen mit PFP in der Lage sind, Thrombin zu generieren (lila Kurve).

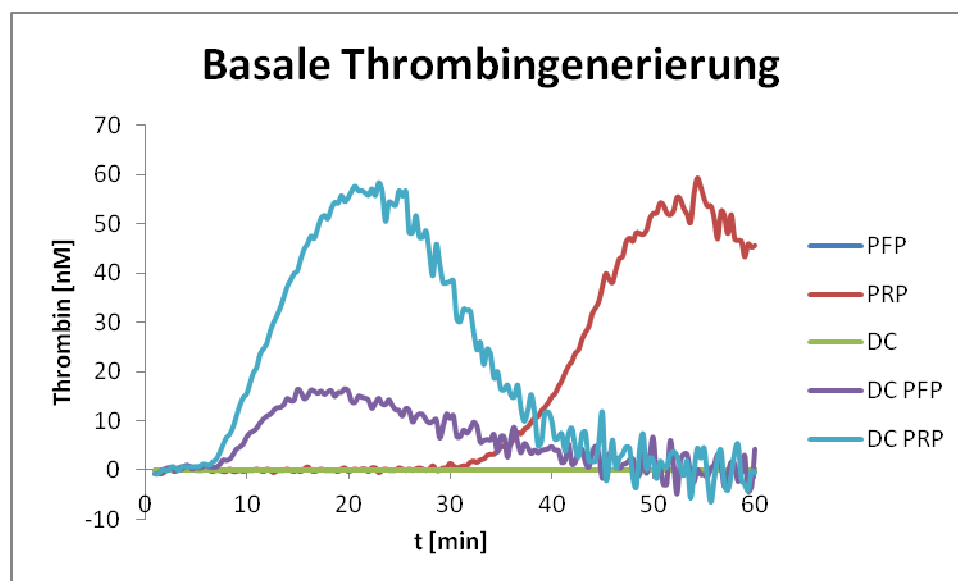


Abb. 28: Thrombingenerierung durch dendritische Zellen bzw. PRP allein oder in Kombination

Mittels der CAT-Methode (Calibrated Automated Thrombography) wurde die Thrombingenerierung von 2×10^5 /ml unstimulierten humanen DCs entweder allein oder zusammen mit 5×10^4 /ml PRP gemessen. Auch PRP allein wurde gemessen (rote Kurve). Zur Detektion der Thrombingenerierung wurde die Umsetzung eines fluorogenen thrombinspezifischen Substrats gemessen. Als Kontrolle diente plättchenfreies Plasma (PFP), welches kein Thrombin generierte (die Kurve ist in der Abbildung verdeckt). Gemessen wurde die Menge des generierten Thrombins über einen Zeitraum von 60 Minuten. Dargestellt wurde hier beispielhaft ein repräsentatives Experiment. (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von AG PD Dr. Kerstin Jurk)

Dieser Effekt wird durch die Anwesenheit der Thrombozyten noch verstärkt (hellblaue Kurve). Thrombozyten selbst sind ebenfalls in der Lage Thrombin zu generieren (rote Kurve). Allerdings setzt die Thrombingenerierung von Plättchen allein bedeutend später ein als zusammen mit DCs, die in diesem Fall eine Art katalytische Funktion zu haben scheinen.

Um nun zu untersuchen, inwiefern das von den DCs generierte Thrombin an der Bildung der DC-Thrombozyten-Aggregate beteiligt ist, wurden drei unterschiedlich wirkende Inhibitoren verwendet. Nach der Inkubation der DCs mit je einem Inhibitor wurde untersucht, ob die Aggregation eingeschränkt oder sogar inhibiert wurde. Zur Anwendung kamen folgende Inhibitoren: D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone (PPack), Fondaparinux (Handelsname: Arixtra) und Fragmin.

PPack inhibiert direkt den Faktor Xa und hemmt so den Prothrombinasekomplex, der Prothrombin in Thrombin spaltet. Diese Inhibition ist sehr selektiv und irreversibel. Arixtra, ein synthetisch hergestelltes Heparin-Pentasaccharid, hingegen wirkt indirekt durch die Bindung an Antithrombin III (AT III) auf das aktive Thrombin. Durch die Bindung an AT III kommt es zu einer Inhibition des Faktors Xa. Fragmin ist ein niedermolekulares Heparin. Es bindet wie Arixtra an AT III und hemmt so indirekt Faktor Xa, kann aber auch im Gegensatz zu Arixtra bereits generiertes Thrombin indirekt hemmen.

Die inhibitorische Wirkung auf die Thrombingenerierung in ihren angewandten Konzentrationen wurde durch CAT-Messungen bestätigt. Es war keine Thrombingenerierung mehr messbar (Daten hier nicht gezeigt). Betrachtet man die Auswirkungen der drei Substanzen auf die Aggregation, so kann festgestellt werden, dass weder PPack (Abb. 29), noch Arixtra (Abb. 30) oder Fragmin (Abb. 31) zu einer signifikanten Reduktion der Aggregation führt (jeweils Abb. A). Weder bei den unstimulierten DCs noch bei den maturen DCs ist eine Einschränkung der hervorgerufenen Aggregation erkennbar. Auch im Hinblick auf die Steigung der Messkurven kann keine signifikante Änderung bei Verwendung der unterschiedlichen Inhibitoren festgestellt werden (Abb. 29 B, 30 B, 31 B). Nach den vorliegenden Ergebnissen läuft die Aggregation zwischen DCs und Thrombozyten unabhängig von potentiell generiertem Thrombin ab.

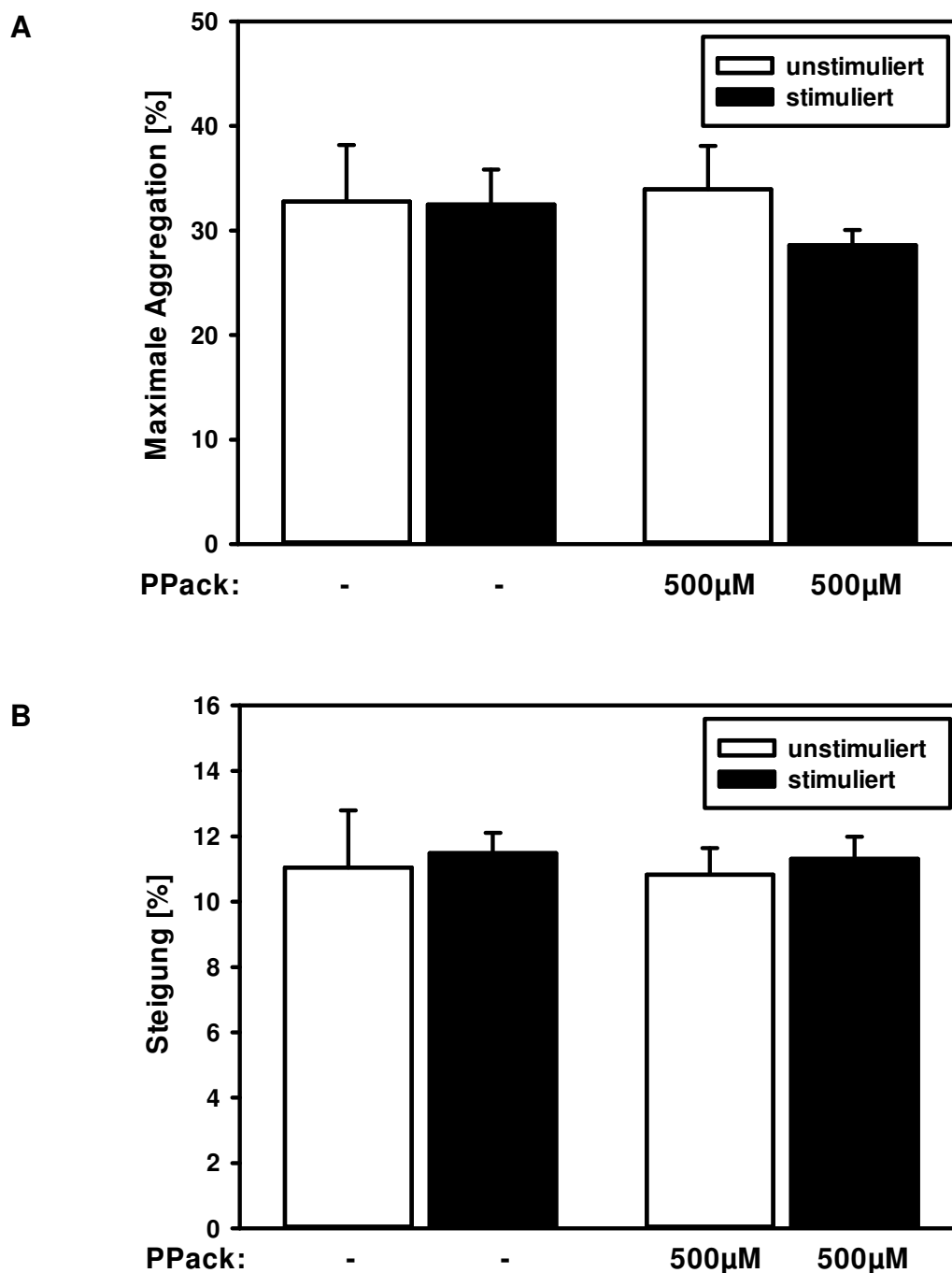


Abb. 29: Aggregationsverhalten von Thrombozyten und DCs, nachdem letztere mit PPack behandelt wurden

2×10^8 /ml PRP wurden zusammen mit 4×10^6 /ml humanen DCs im Aggregometer gemessen. Die DCs waren entweder unstimuliert und immatur (weiße Balken) oder wurden mit einem Zytokincocktail stimuliert (mature DCs, schwarze Balken). Vor der Koinkubation mit den Thrombozyten wurden die DCs mit dem Thrombin-Inhibitor PPack behandelt (5 min, 4°C). Dargestellt ist (A) die maximale Aggregation und (B) die Steigung der Aggregationskurve. N= 5 , Mittelwerte +/- SEM.

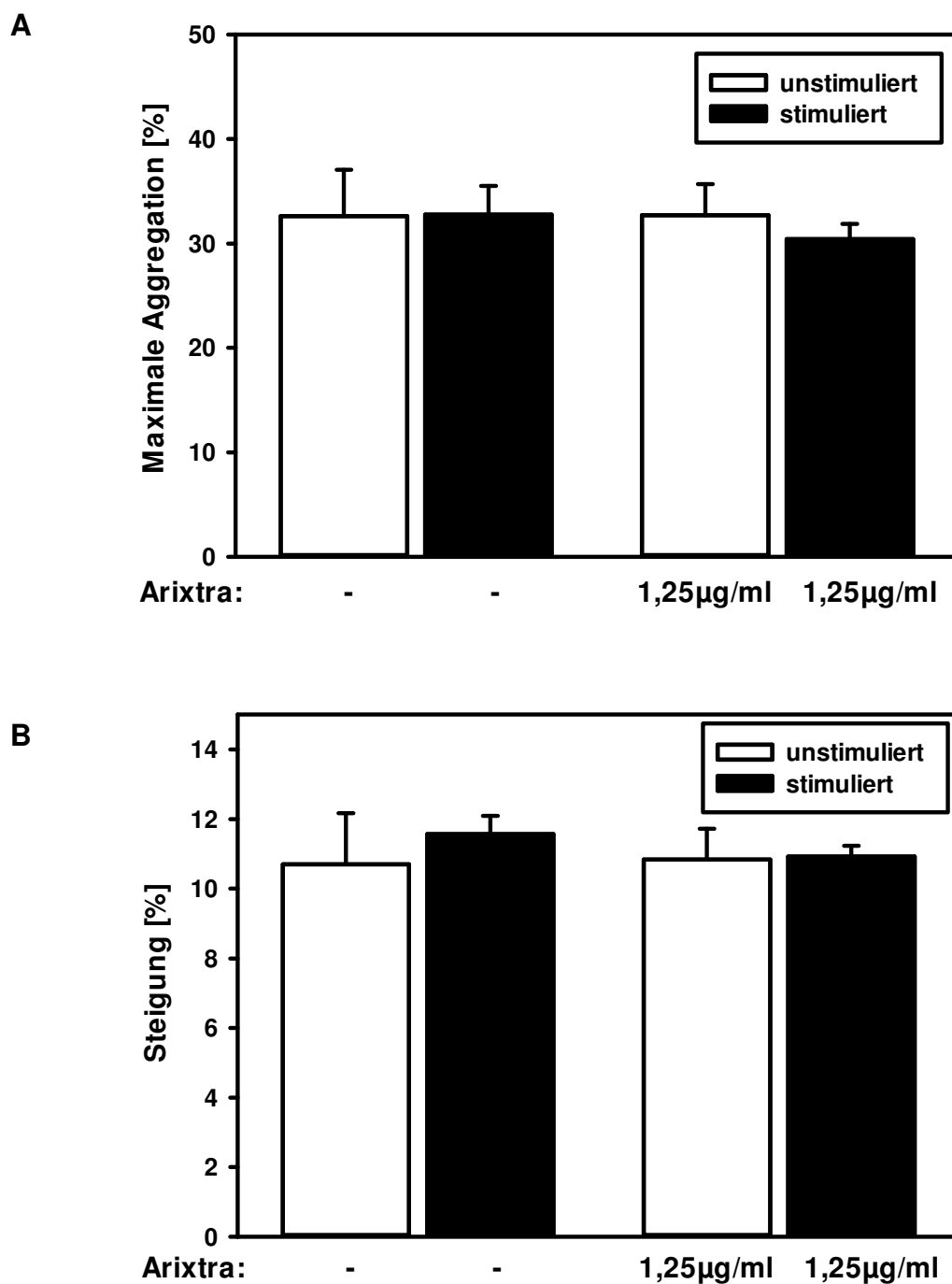


Abb. 30: Aggregationsverhalten von Thrombozyten und DCs, nachdem letztere mit Arixtra behandelt wurden

2×10^8 /ml PRP wurden zusammen mit 4×10^6 /ml humanen DCs im Aggregometer gemessen. Die DCs waren entweder unstimuliert und immatur (weiße Balken) oder wurden mit einem Zytokincocktail stimuliert (mature DCs, schwarze Balken). Vor der Koinkubation mit den Thrombozyten wurden die DCs mit dem Thrombin-Inhibitor Arixtra behandelt (5 min, 4°C). Dargestellt ist (A) die maximale Aggregation und (B) die Steigung der Aggregationskurve. N= 6 , Mittelwerte +/- SEM.

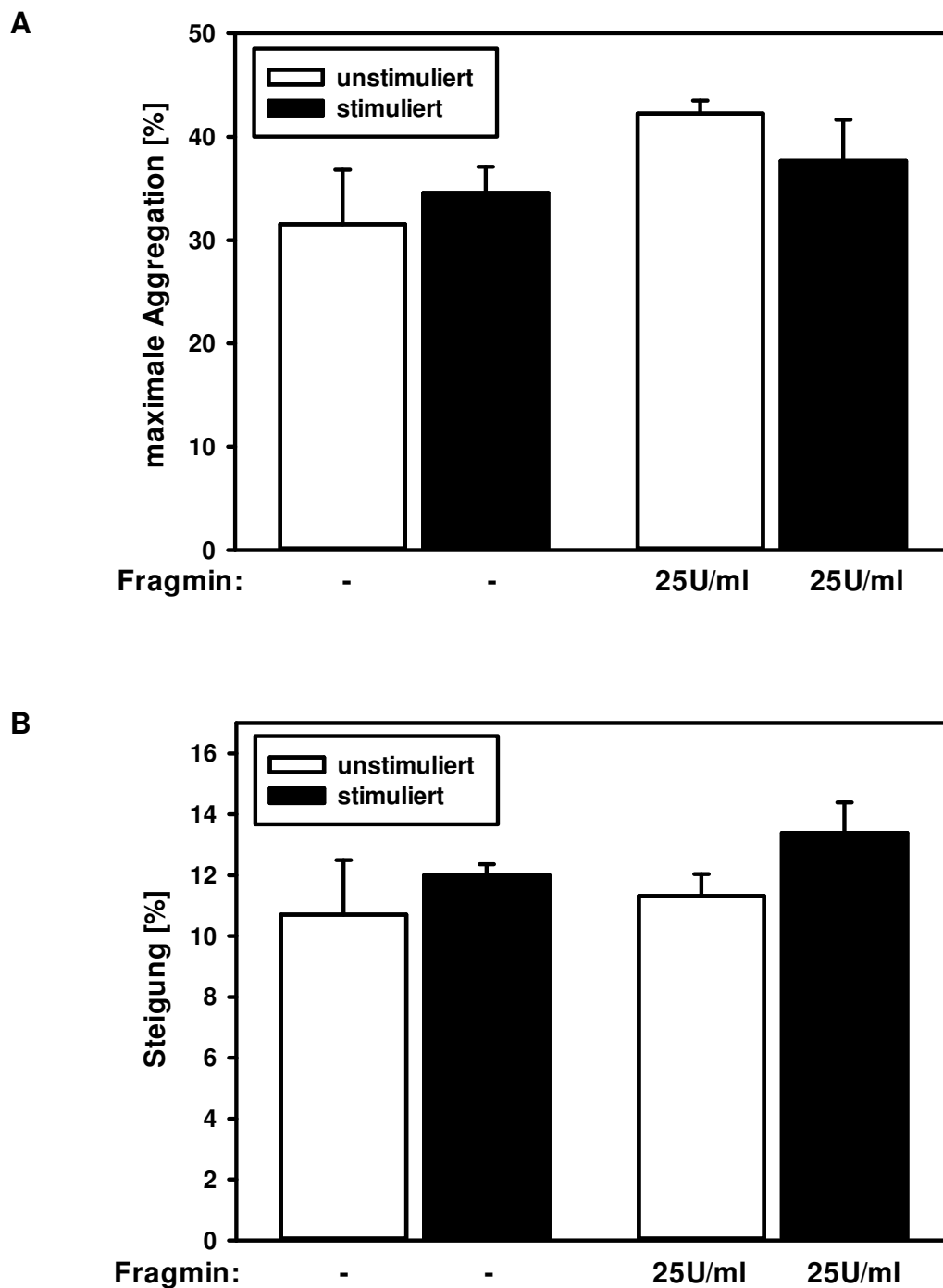


Abb. 31: Aggregationsverhalten von Thrombozyten und DCs, nachdem letztere mit Fragmin behandelt wurden

2×10^8 /ml PRP wurden zusammen mit 4×10^6 /ml humanen DCs im Aggregometer gemessen. Die DCs waren entweder unstimuliert und immatur (weiße Balken) oder wurden mit einem Zytokincocktail stimuliert (mature DCs, schwarze Balken). Vor der Koinkubation mit den Thrombozyten wurden die DCs mit dem Thrombin-Inhibitor Fragmin behandelt (5 min, 4°C). Dargestellt ist (A) die maximale Aggregation und (B) die Steigung der Aggregationskurve. N= 5 , Mittelwerte +/- SEM.

3.2.4. Einfluss von Apyrase auf die Aggregation

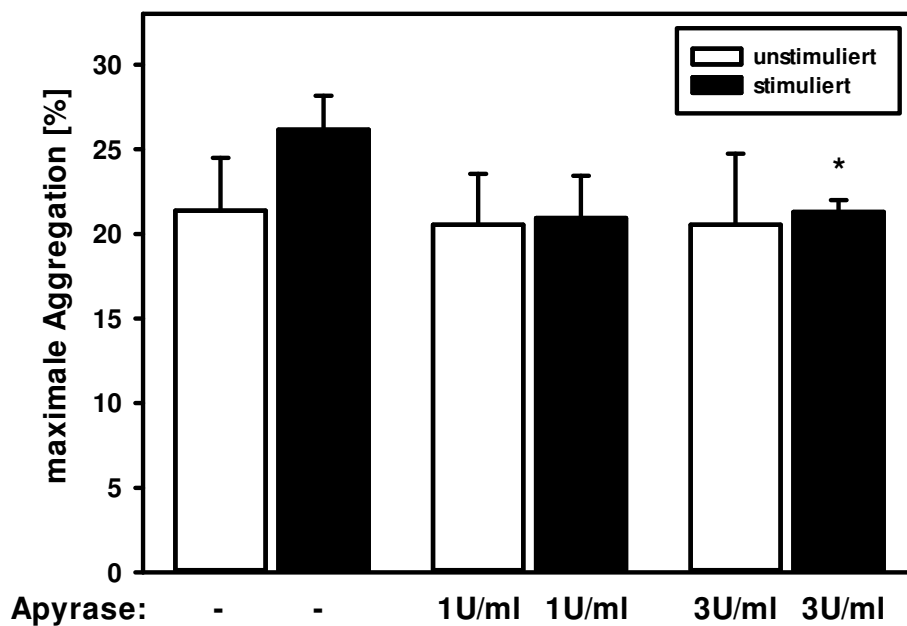
Das Enzym Apyrase ist eine ATP-Diphosphohydrolase. Es katalysiert die Abspaltung von gamma-Phosphat von ATP sowie die Abspaltung von beta-Phosphat von ADP. Es kann unter anderem die ADP-vermittelte Plättchenaktivierung und -aggregation inhibieren. Dieser Effekt wurde bereits 1992 von Yao et al. publiziert (Yao et al., 1992; Sun et al., 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von ADP auf die induzierte Aggregation untersucht werden. Dazu wurden die DCs mit dem Enzym für fünf Minuten präinkubiert und anschließend direkt die Thrombozyten hinzugefügt. Getestet wurden zwei Konzentrationen: 1 U/ml und 3 U/ml (Abb. 32).

Wie in Abbildung 32 A und B erkennbar, führt die Verwendung von Apyrase bei unstimulierten DCs zu keiner Veränderung des Aggregationsverhaltens. Bei stimulierten DCs kann eine verminderte Aggregationsstärke bei Verwendung einer Apyrase-Konzentration von 3 U/ml detektiert werden (Abb. 32 A). Auch ein leichter Einfluss auf die Kurvensteigung ist bei einer Apyrase-Dosis von 1 U/ml messbar (Abb. 32 B).

Somit scheint ATP bzw. ADP zumindest in einem geringen Maße an der Aggregation beteiligt zu sein.

A



B

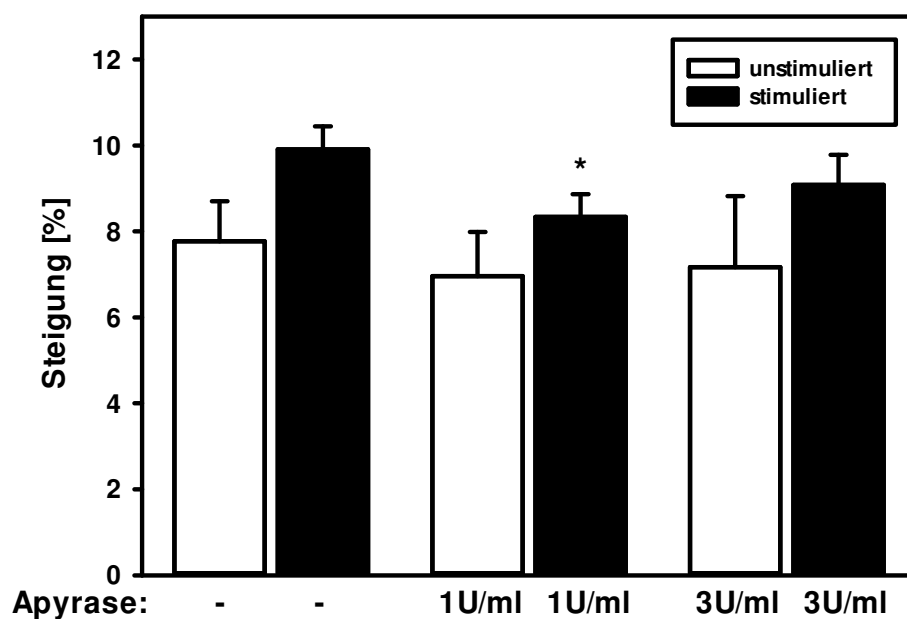


Abb. 32: Aggregationsverhalten von Thrombozyten und DCs, nachdem letztere zuvor mit Apyrase behandelt wurden

2×10^8 /ml PRP wurden zusammen mit 4×10^6 /ml humanen DCs und Apyrase im Aggregometer gemessen. Die DCs waren entweder unstimuliert und immatur (weiße Balken) oder wurden mit einem Zytokincocktail stimuliert (mature DCs, schwarze Balken). Die Apyrase wurde in zwei Konzentrationen eingesetzt: 1 U/ml und 3 U/ml (Inkubation für 5 Minuten bei 4°C). Dargestellt ist (A) die maximale Aggregation und (B) die Steigung der Aggregationskurve. N= 4 , Mittelwerte +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur jeweiligen Kontrolle.

3.2.5. Einfluss der Oberflächenmoleküle CD18 und PSGL-1 auf die Aggregation

Ebenfalls sollte in dieser Arbeit die mögliche Beteiligung von Oberflächenmolekülen an der induzierten Aggregation untersucht werden. Dazu wurden zwei Moleküle ausgewählt: das von dendritischen Zellen exprimierte Molekül CD18 und das ebenfalls von DCs exprimierte Molekül PSGL-1 (P-selektin Glycoprotein Ligand-1).

CD 18 ist ein beta-2-Integrin und bildet zusammen mit der jeweiligen alpha-Untereinheit der heterodimären Moleküle CD11a, CD11b, CD11c verschiedene Integrinkomplexe. CD18 ist als Transmembranprotein wichtig für die Adhäsion, z. B. bei der Migration der Zellen. Langer et al. berichteten 2007 von einer Bindung von DCs über CD11b/CD18 (MAC-1) an JAM-C auf der Oberfläche von Thrombozyten (Langer et al., 2007).

Aufgrund dieser möglichen Interaktion zwischen DCs und Thrombozyten wurde in dieser Arbeit die Rolle von beta-2-Integrinen, genauer CD18, bei der Aggregation untersucht, indem ein blockierender, gegen CD18 gerichteter Antikörper (anti-CD18) verwendet wurde. Dazu wurden die dendritischen Zellen zunächst mit einem Fc-Rezeptor-blockierenden Antikörpermisch inkubiert, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers an Fc-Rezeptoren zu verhindern. Anschließend wurden die DCs mit dem gegen CD18 gerichteten Antikörper bzw. mit dem entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörper inkubiert. Im Anschluss daran wurde, wie bereits zuvor beschrieben, die Aggregationsmessung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt. Bei unstimulierten DCs ist weder bei der maximalen Aggregation (Abb. 33 A) noch bei der Steigung (Abb. 33 B) ein signifikanter Unterschied nach der Behandlung mit dem Antikörper detektierbar. Die maximale Aggregation nimmt nach der Antikörperbehandlung zwar ab, allerdings ist kein Unterschied zwischen der mit dem Isotyp und der mit dem gegen CD18 gerichteten Antikörper behandelten Gruppe sichtbar (Abb. 33 A). Bei stimulierten DCs ist eine signifikant reduzierte maximale Aggregation nach Inkubation mit dem anti-CD18-Antikörper detektierbar. Allerdings gibt es auch hier keinen Unterschied zwischen der mit dem Isotyp und dem anti-CD18-Antikörper behandelten Probe (Abb. 33 A). Bei der Steigung ist nur nach Behandlung mit dem CD18 blockierenden Antikörper eine signifikante Abnahme zu beobachten (Abb. 33 B).

Jedoch ist wie zuvor kein signifikanter Unterschied zur Isotyp-Kontrolle messbar.

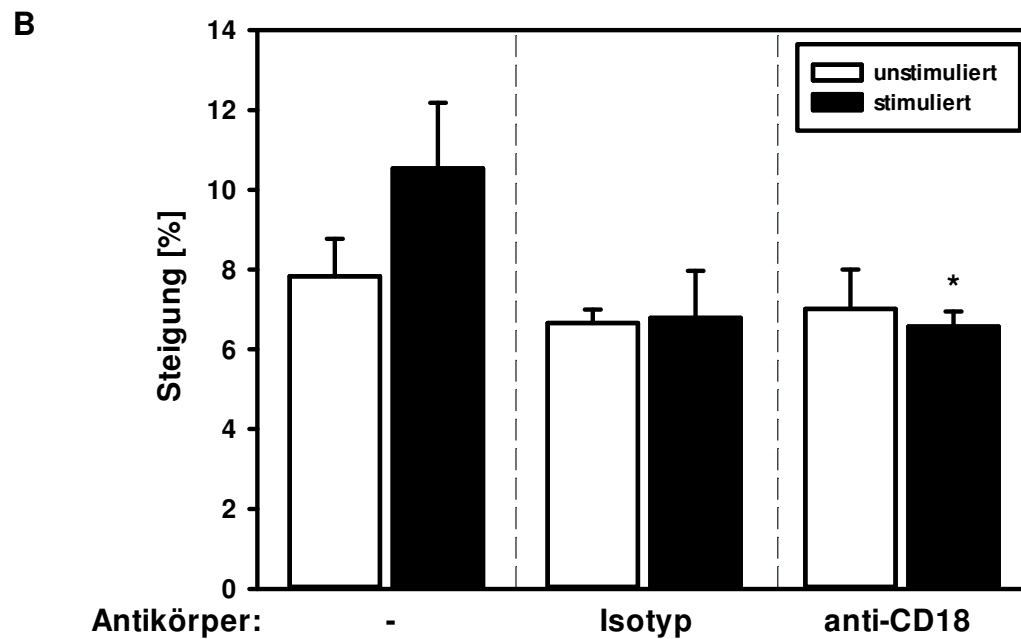
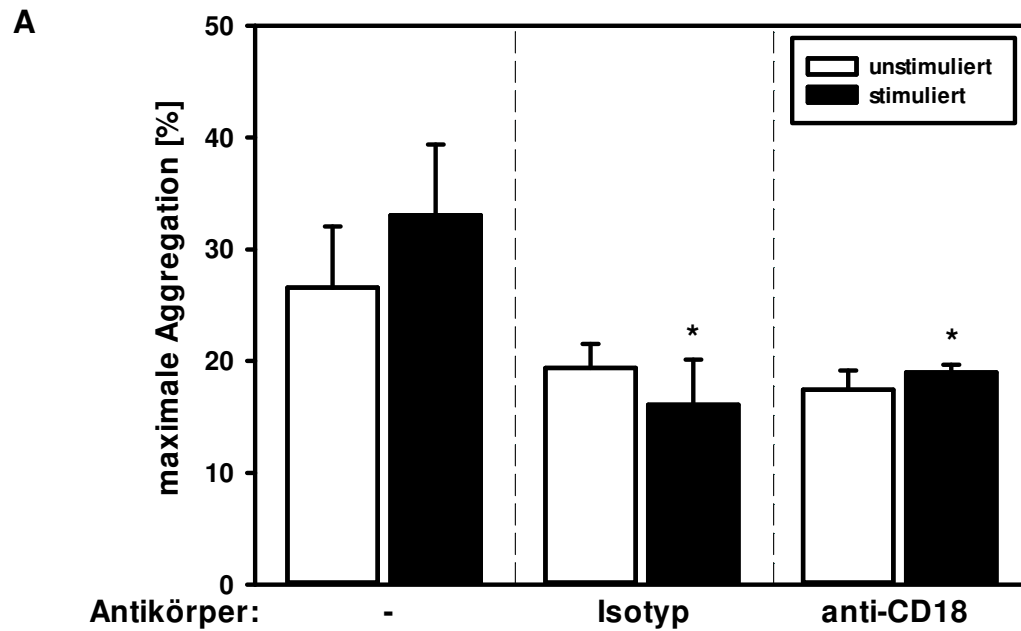


Abb. 33: Maximale Aggregation und Steigung der Aggregationskurve bei Verwendung eines CD18-blockierenden Antikörpers

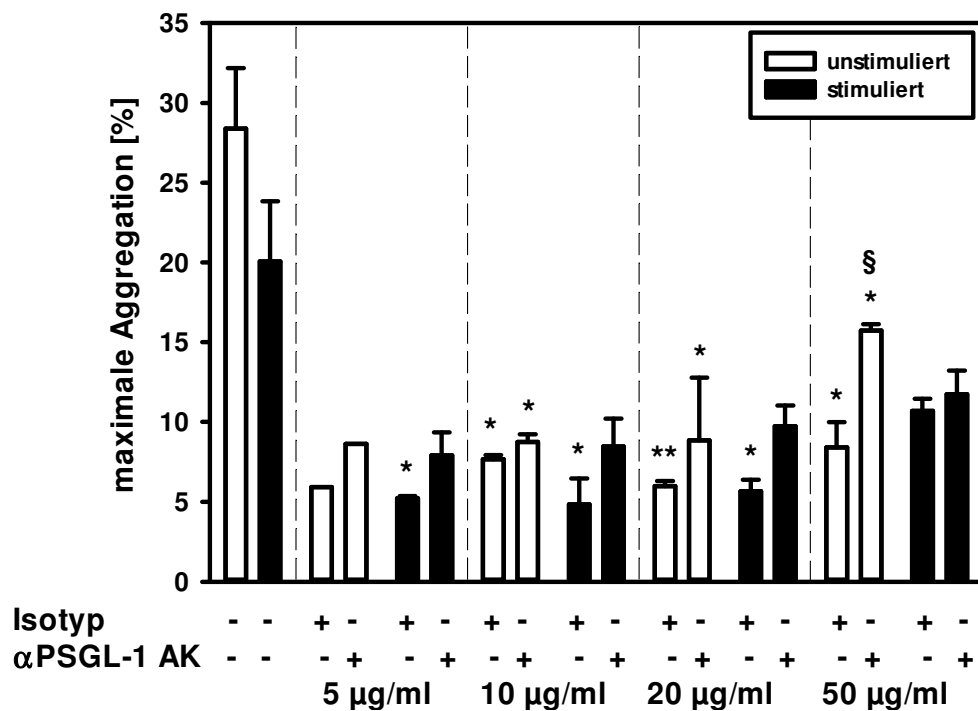
2×10^8 /ml PRP wurden zusammen mit 4×10^6 /ml humanen DCs im Aggregometer gemessen. Die DCs waren entweder unstimuliert und immatur (weiße Balken) oder wurden mit einem Zytokincocktail stimuliert (mature DCs, schwarze Balken). Vor der Koinkubation mit den Thrombozyten wurden die DCs mit einem Fc-Block (10 min, 4°C, anschließend ausgewaschen) und danach mit einem gegen CD18 gerichteten, blockierenden Antikörper (Konzentration: 62,5 µg/ml) bzw. dem entsprechenden Isotyp präinkubiert (10 min, 4°C, anschließend ausgewaschen). Dargestellt ist (A) die maximale Aggregation und (B) die Steigung der Aggregationskurve. N= 3 , Mittelwerte +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur jeweiligen Kontrolle.

Parallel zu den Untersuchungen mit dem gegen CD18 gerichteten Antikörper wurden Analysen zur Beteiligung von PSGL-1 an der Aggregation vorgenommen. PSGL-1 ist ein Glykoprotein, das unter anderem von dendritischen Zellen exprimiert wird. Es ist beteiligt an der Adhäsion und Migration. PSGL-1 bindet unter anderem an P-Selektin, welches von aktivierten Thrombozyten auf der Oberfläche exprimiert wird.

In dieser Arbeit wurde ein blockierender, gegen PSGL-1 gerichteter Antikörper (anti-PSGL-1) verwendet. Die dendritischen Zellen wurden, wie zuvor beschrieben, zunächst mit dem Fc-blockierenden Antikörpergemisch behandelt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des anti-PSGL-1-Antikörpers inkubiert bzw. mit dem entsprechenden Isotyp. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt.

Nach der Inkubation der dendritischen Zellen mit dem gegen PSGL-1 gerichteten Antikörper wurde sowohl bei den immaturen als auch bei den maturen DCs die Aggregation gehemmt. Dies ist sowohl bei der maximalen Aggregation ersichtlich (Abb. 34 A) als auch bei der Steigung der Aggregationskurve (Abb. 34 B). Der Effekt ist bei den Antikörperkonzentrationen von 5 µg/ml und 10 µg/ml am stärksten. Betrachtet man allerdings die Unterschiede zwischen dem gegen PSGL-1 gerichteten Antikörper und dem entsprechenden Isotyp, so ist ersichtlich, dass auch der Isotyp zu einer vergleichbaren Verminderung der Aggregation führt.

A



B

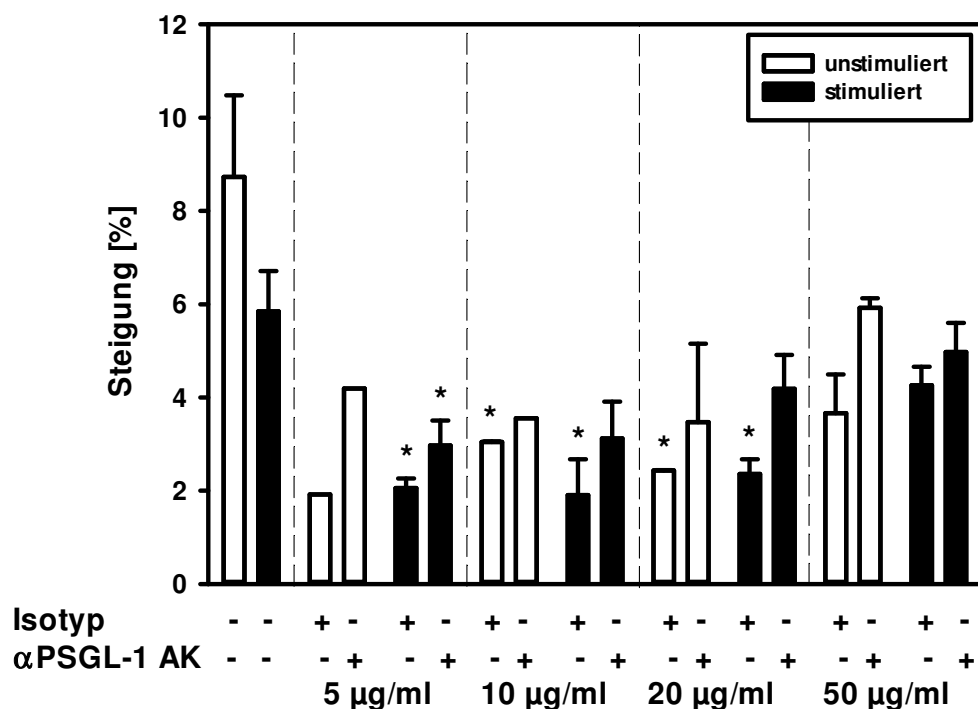


Abb. 34: Maximale Aggregation und Steigung der Aggregationskurve bei Verwendung eines blockierenden gegen PSGL-1 gerichteten Antikörpers

2×10^8 /ml PRP wurden zusammen mit 4×10^6 /ml humanen DCs im Aggregometer gemessen. Die DCs waren entweder unstimuliert und immatur (weiße Balken) oder wurden mit einem Zytokincocktail stimuliert (mature DCs, schwarze Balken). Vor der Koinkubation mit den Thrombozyten wurden die

DCs mit einem Fc-Block (10 min, 4°C, anschließend ausgewaschen) und danach mit einem gegen PSGL-1 gerichteten Antikörper bzw. dem entsprechenden Isotyp präinkubiert (10 min, 4°C, anschließend ausgewaschen). Die Kontrollen verblieben unbehandelt. Dargestellt ist (A) die maximale Aggregation und (B) die Steigung der Aggregationskurve. N= 1-4 , Mittelwerte +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur jeweiligen Kontrolle, § Unterschied zwischen anti PSGL-1 Antikörper und Isotyp.

3.2.6. Einfluss der Fc-Rezeptoren auf die Aggregation

In den vorangegangenen Experimenten konnte durch die Verwendung spezifischer Antikörper zwar eine Inhibition der Aggregation erzielt werden, allerdings unterschied sich diese kaum von den Ergebnissen nach Isotypbehandlung. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die DCs mit einem Fc-Rezeptor blockierenden Immunglobulingemisch vorinkubiert worden waren. Aus diesem Grund wurde im Folgenden untersucht, welche Rolle Fc-Rezeptoren bei der Aggregation spielen. Dazu wurden DCs wie auch in den vorangegangenen Experimenten mit dem Fc-Rezeptor blockierenden Immunglobulingemisch inkubiert. Anschließend wurde die Aggregation der DCs zusammen mit Thrombozyten analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 und 36 dargestellt.

Die Behandlung dendritischer Zellen mit dem Fc-Rezeptor blockierenden Immunglobulingemisch führt bei unstimulierten DCs zu einem signifikanten Rückgang der Aggregation (Abb. 35 A). Auch bei der Steigung der Aggregationskurve kann ein leichter Rückgang detektiert werden (Abb. 35 B). Bei stimulierten, mit Fc-Rezeptor blockierendem Immunglobulingemisch behandelten DCs kann nur ein leichter inhibierender Effekt auf die Aggregationsstärke festgestellt werden (Abb. 35 A & B).

Interessant ist allerdings der gesamte Verlauf der Aggregationskurve, beispielhaft dargestellt in Abbildung 36. Hier ist deutlich zu erkennen, dass der Anfangsverlauf der jeweiligen Messkurven größtenteils übereinstimmend ist. Nach einer kurzen zeitlichen Phase von ca. 90 Sekunden ist die Messkurve der mit dem Fc-Rezeptor blockierenden Immunglobulingemisch behandelten DCs allerdings stark abfallend, wohingegen die Kontrollkurven auf dem Plateau verbleiben.

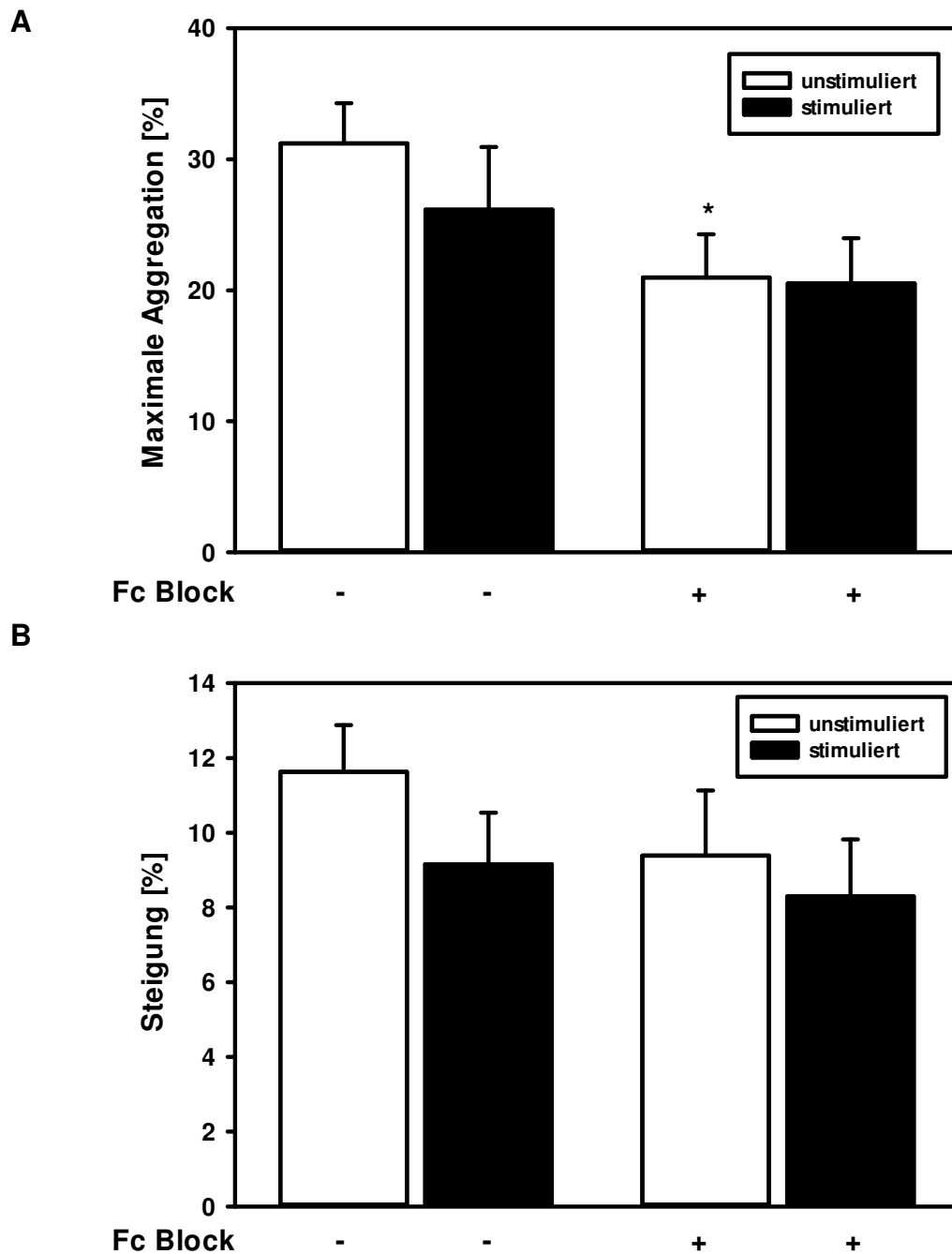


Abb. 35: Aggregationsverhalten von PRP zusammen mit DCs, die zuvor mit einem Fc-Rezeptor blockierenden Immunglobulingemisch inkubiert wurden

2×10^8 /ml PRP wurden zusammen mit 4×10^6 /ml humanen DCs im Aggregometer gemessen. Die DCs waren entweder unstimuliert und immatur (weiße Balken) oder wurden mit einem Zytokincocktail stimuliert (mature DCs, schwarze Balken). Vor der Koinkubation mit den Thrombozyten wurden Aliquote der DCs für 10 Minuten mit einem Fc-Rezeptor blockierenden Immunglobulingemisch präinkubiert (10 min, 4°C, anschließend ausgewaschen). Dargestellt ist (A) die maximale Aggregation und (B) die Steigung der Aggregationskurve. N= 5 , Mittelwerte $\pm$ SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur jeweiligen Kontrolle.

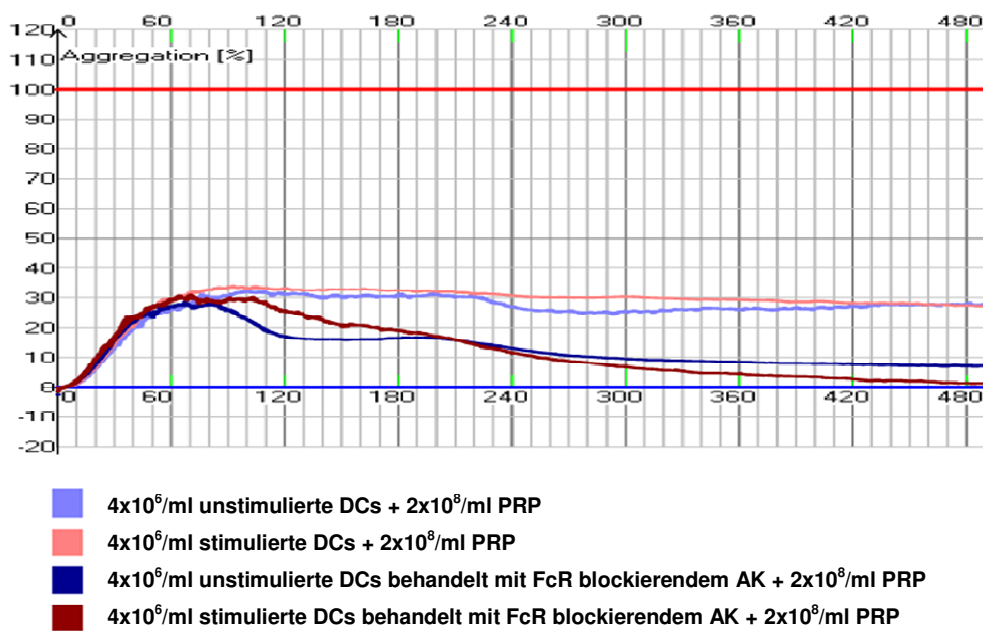


Abb. 36: Verlauf der Aggregationskurve nach Inkubation der DCs mit einem Fc-Rezeptor blockierenden Immunglobulingemisch

2x10⁸/ml PRP wurden zusammen mit 4x10⁶/ml humanen DCs im Aggregometer gemessen. Die DCs waren entweder unstimuliert und immatur (blaue Kurven) oder wurden mit einem Zytokincocktail stimuliert (rote Kurven). Vor der Koinkubation mit den Thrombozyten wurden zwei Gruppen von DCs für 10 Minuten bei 4°C mit einem Fc-Rezeptor blockierenden Immunglobulingemisch präinkubiert, welches anschließend ausgewaschen wurde (dunkelblau bzw. dunkelrot). Dargestellt ist der Verlauf der Aggregation über einen Zeitraum von 8 Minuten. Die Darstellung ist beispielhaft für 5 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Die Blockierung der Fc-Rezeptoren scheint demnach verstärkt auf den späteren Verlauf der Aggregation einzuwirken. Die verminderte Aggregation zwischen DCs und Thrombozyten im Zuge der Blockierung der Fc-Rezeptoren auf DCs könnte darauf hinweisen, dass an Thrombozyten gebundenes IgG an der Aggregatbildung beteiligt ist.

Bei den Fc-Rezeptoren werden drei Subklassen unterschieden: Fcα-, Fcε- und Fcγ-Rezeptoren. Innerhalb der Gruppe der Fcγ-Rezeptoren werden wiederum vier verschiedene Subformen unterschieden: FcγR I (CD16), FcγR II (CD32) mit den Isoformen FcγR IIa und FcγR IIb, sowie FcγR III (CD64). Während FcγR IIa ein

aktivierendes Signal in die Zelle leitet, führt eine Bindung an FcγR IIb zu einem inhibierenden Signal ins Zellinnere.

Monozyten-abgeleitete DCs exprimieren konstitutiv FcγR II auf ihrer Oberfläche (Liu et al. 2006), während FcγR I und FcγR III nicht oder nur gering exprimiert sind (Boruchov et al., 2005; Laborde et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass mit IL-10 behandelte tolerogene DCs vermehrt FcγR IIb mRNA (unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe) und auch vermehrt das entsprechende Protein exprimieren, wobei auch die Expression von FcγR IIa und FcγR III erhöht ist (Boruchov et al., 2005).

Um zu überprüfen, ob die unterschiedliche Expression der a- oder b-Isoform des FcγR II einen Einfluss auf die Aggregationsfähigkeit dendritischer Zellen hat, wurden DCs während der Differenzierung, also ab Tag 0, mit IL-10 behandelt. Anschließend wurde die Aggregationsfähigkeit dieser DCs untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt.

Durch die Behandlung der DCs während der Differenzierung mit IL-10 wird die maximale Aggregation stark signifikant gehemmt. Die DCs weisen nur noch eine halb so starke Aggregation auf wie die unbehandelte Kontrolle (Abb. 37 A). Auch die Steigung der Aggregationskurve ist bei tolerogenen DCs im Vergleich zu den Kontrollen deutlich verringert (Abb. 37 B).

Um auch den gegenteiligen Effekt zu untersuchen, wurden DCs generiert, die während der Differenzierung mit IFN-γ behandelt worden waren. Diese DCs weisen eine verringerte Expression des FcγR IIb auf, gleichzeitig ist die Expression von FcγR IIa und FcγR I erhöht (Boruchov et al., 2005).

In Abbildung 38 wird ersichtlich, dass die Behandlung mit IFN-γ während der Differenzierung zu einer signifikant erhöhten Aggregationsfähigkeit der DCs führt im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 38 A). Auch die Steigung der Messkurve ist erhöht bei den mit IFN-γ behandelten DCs (Abb. 38 B).

Aufgrund dieser Befunde besteht die Möglichkeit eines Zusammenhangs zwischen der Expression des FcγR II auf die Aggregationsfähigkeit zwischen dendritischen Zellen und Thrombozyten. Eine höhere Expression von FcγR IIb hat möglicherweise einen inhibierenden Effekt auf die Aggregationsfähigkeit aufgrund einer stärkeren inhibitorischen Signalgebung ins Zellinnere der DCs, welche mit aktivierenden Signalen von FcγR IIa und weiteren Rezeptoren konkurriert.

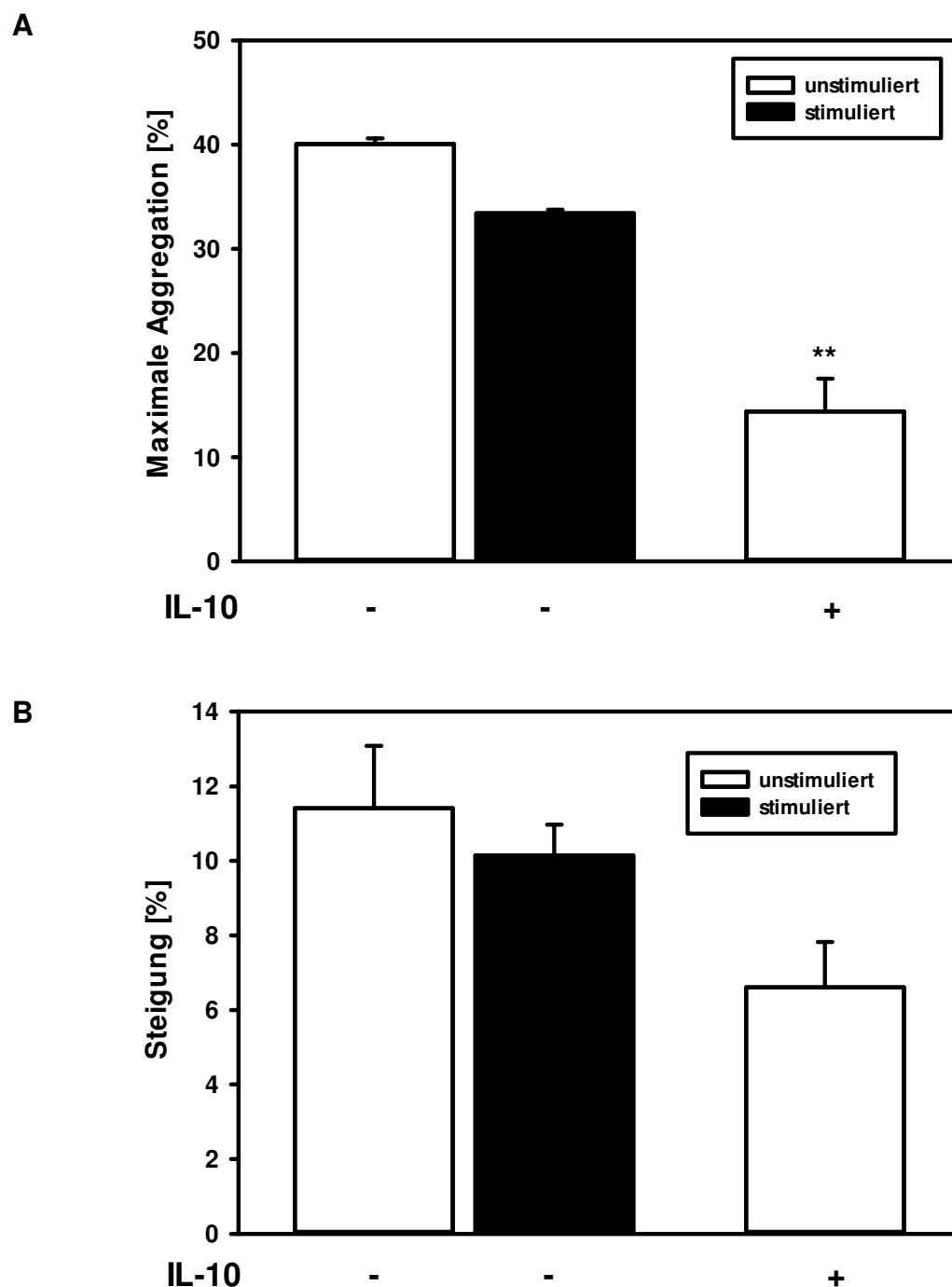


Abb. 37: Maximale Aggregation und Steigung der Aggregationskurve bei tolerogenen, mit IL-10 behandelten DCs

2×10^8 /ml PRP wurden zusammen mit 4×10^6 /ml humanen DCs im Aggregometer gemessen. Die DCs waren entweder unstimuliert und immatur (weiße Balken) oder wurden mit einem Zytokincocktail stimuliert (mature DCs, schwarze Balken). Eine Gruppe wurde während der Differenzierung zusätzlich mit 20 ng/ml IL-10 behandelt, um tolerogene DCs zu generieren. Dargestellt ist (A) die maximale Aggregation und (B) die Steigung der Aggregationskurve. N= 2 , Mittelwerte $\pm$ SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur unstimulierten Kontrolle.

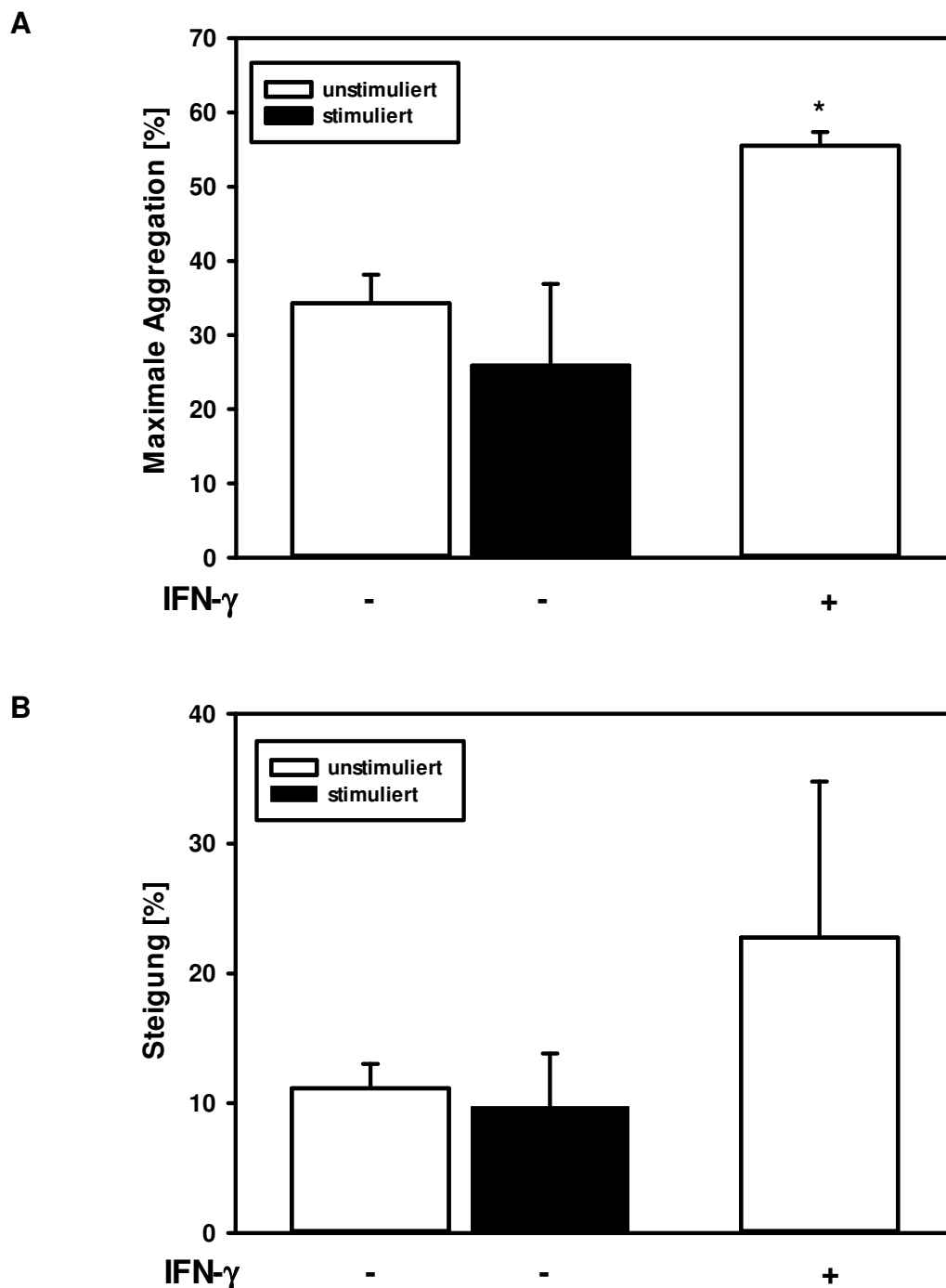


Abb. 38: Maximale Aggregation und Steigung der Aggregationskurve bei DCs, die mit IFN- γ behandelt wurden

2×10^8 /ml PRP wurden zusammen mit 4×10^6 /ml humanen DCs im Aggregometer gemessen. Die DCs waren entweder unstimuliert und immatur (weiße Balken) oder wurden mit einem Zytokincocktail stimuliert (mature DCs, schwarze Balken). Eine Gruppe wurde während der Differenzierung zusätzlich mit 1000 IU/ml IFN- γ behandelt. Dargestellt ist (A) die maximale Aggregation und (B) die Steigung der Aggregationskurve. N= 2 , Mittelwerte $\pm$ SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur unstimulierten Kontrolle.

3.2.7. Einfluss des Fcγ-Rezeptors IIb auf die Aggregationsfähigkeit dendritischer Zellen

Die im vorherigen Abschnitt erlangten Ergebnisse weisen auf eine negative Beteiligung des FcγR IIb an der Aggregation zwischen dendritischen Zellen und Thrombozyten hin. Aus diesem Grund wurden dendritische Zellen mit einem Antikörper behandelt, welcher spezifisch den FcγR IIb blockiert. Es handelte sich hierbei um ein Fab-Fragment, um eine unspezifische Bindung an Fc-Rezeptoren zu umgehen und um einen Transfer inhibitorischer Signale ins Zellinnere auszuschließen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt. Die Inkubation dendritischer Zellen mit 10 µg/ml FcγR IIb blockierendem Antikörper führt nicht zu einer Inhibition der Aggregationsfähigkeit der Zellen (Abb. 39 A). Die Werte der mit dem blockierenden Antikörper behandelten DCs liegen auf gleichem Niveau wie die unbehandelten Kontrollen. Lediglich in der Steigung der Aggregationskurven lässt sich ein leichter Einfluss detektieren (Abb. 39 B). Hier führt die Blockierung des FcγR IIb zu einer verminderten Steigung der Messkurven sowohl bei den unstimulierten und signifikant bei den stimulierten DCs. Da die Blockade des FcγR IIb nicht zu einer verstärkten Aggregation führte, scheint dieser Rezeptor während der Interaktionen zwischen DCs und Thrombozyten keine inhibitorischen Signalwege in den DCs zu induzieren.

In einem folgenden Experiment wurden die dendritischen Zellen zunächst wieder mit dem FcγR IIb spezifischen Antikörper inkubiert, danach wurden die DCs mit dem FcR-blockierenden Immunglobulingemisch inkubiert. Auf diese Weise sollte eine inhibierende Signalweiterleitung mittels FcγR IIb ausgeschlossen werden. Zeigt die nachfolgende Inkubation mit dem blockierenden Ig-Gemisch, das alle Fc-Rezeptoren blockiert, eine Inhibition, so kann der FcγR IIb als Ursache ausgeschlossen werden. In Abbildung 39 sind die Ergebnisse dieses Versuchsaufbaus dargestellt. Die aufeinanderfolgende Inkubation mit dem FcγR IIb-blockierenden AK und dem kompletten FcR-blockierenden Immunglobulingemisch führt zumindest bei den unstimulierten DCs zu einer signifikanten Inhibition der Aggregation im Vergleich zu den Kontrollansätzen (Abb. 40 A). Auch bei stimulierten DCs ist ein Rückgang der Aggregationsstärke messbar, allerdings ist dieser nicht signifikant (Abb. 40 A).

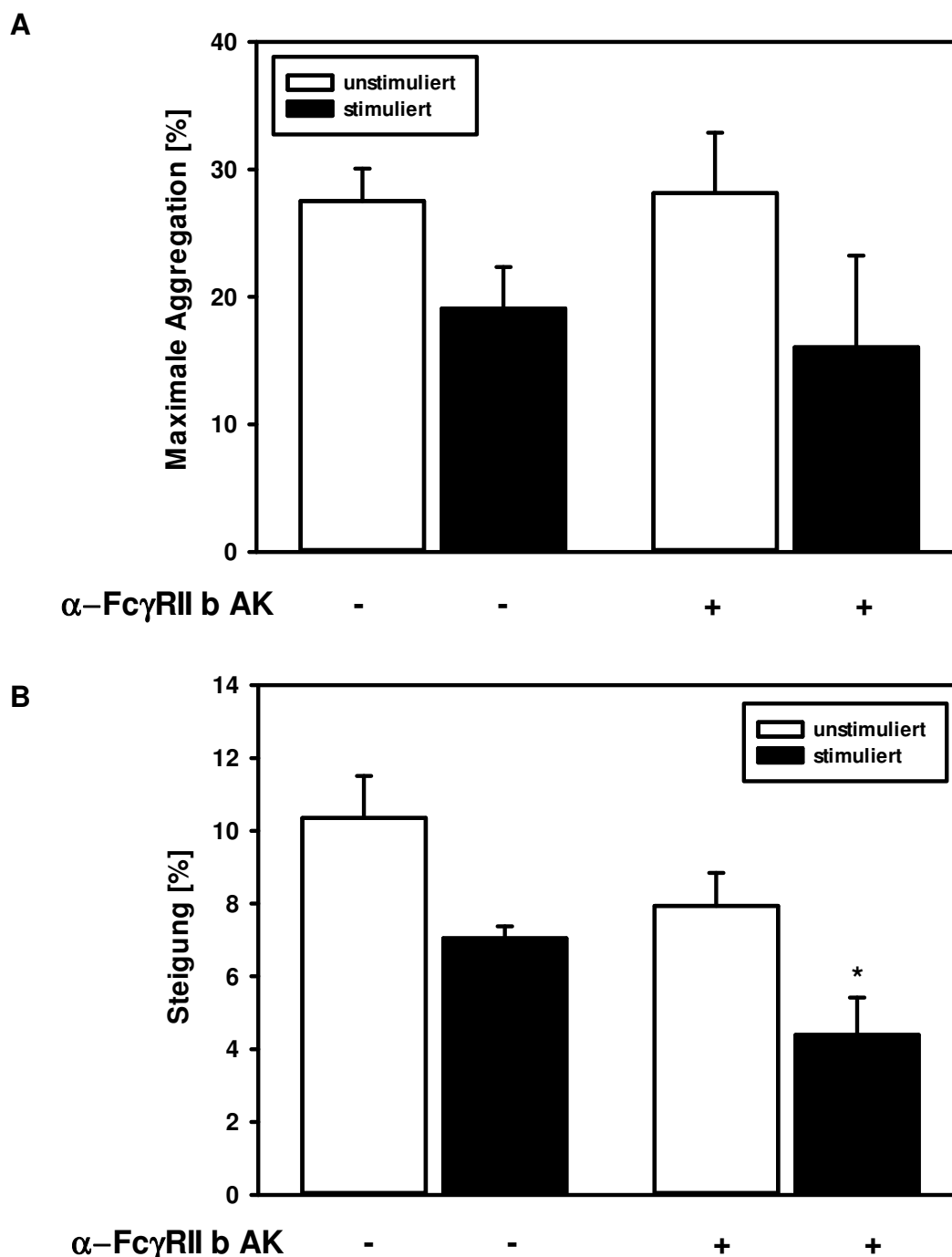
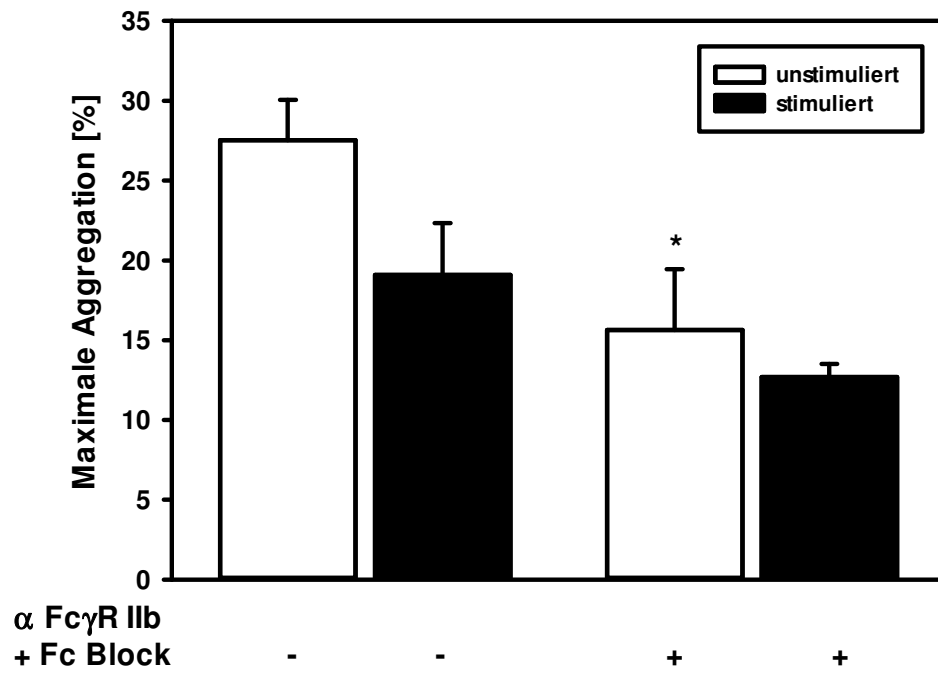


Abb. 39: Maximale Aggregation und Steigung der Aggregationskurve nach Behandlung dendritischer Zellen mit einem blockierenden, gegen FcγR IIb gerichteten Antikörper

2×10^8 /ml PRP wurden zusammen mit 4×10^6 /ml humanen DCs im Aggregometer gemessen. Die DCs waren entweder unstimuliert und immatur (weiße Balken) oder wurden mit einem Zytokincocktail stimuliert (mature DCs, schwarze Balken). Jeweils ein Aliquot wurde zusätzlich mit einem spezifischen anti-FcγR IIb AK (Fab) behandelt (10 min, 4°C, anschließend ausgewaschen). Dargestellt ist (A) die maximale Aggregation und (B) die Steigung der Aggregationskurve. N= 3 , Mittelwerte $\pm$ SEM.

Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * Unterschied zur jeweiligen Kontrolle

A



B

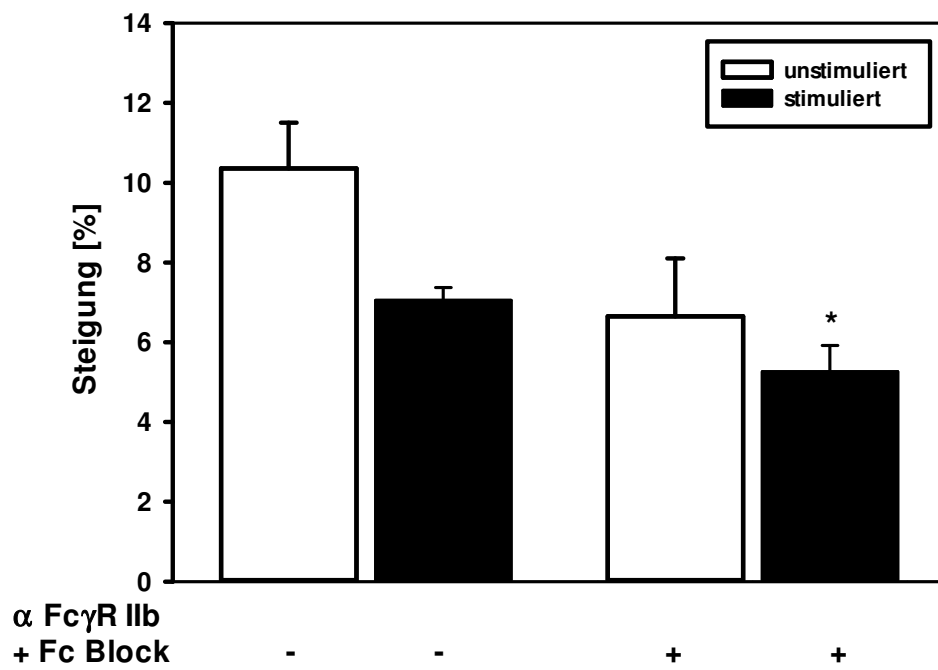


Abb. 40: Maximale Aggregation und Steigung der Aggregationskurve nach Behandlung dendritischer Zellen mit einem den FcγR IIb blockierenden Antikörper und darauf folgender Blockierung aller Fc-Rezeptoren

2×10^8 /ml PRP wurden zusammen mit 4×10^6 /ml humanen DCs im Aggregometer gemessen. Die DCs waren entweder unstimuliert und immatur (weiße Balken) oder wurden mit einem Zytokincocktail stimuliert (mature DCs, schwarze Balken). Jeweils ein Aliquot wurde zusätzlich mit einem spezifischen anti-FcγR IIb AK (Fab) inkubiert (10 min, 4°C, anschließend ausgewaschen) und darauf folgend mit einem Fc-Rezeptor blockierendem Ig-Gemisch (10 min, 4°C, anschließend ausgewaschen).

Dargestellt ist (A) die maximale Aggregation und (B) die Steigung der Aggregationskurve. N= 3 , Mittelwerte +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: *

Unterschied zur jeweiligen Kontrolle

Auch die Steigung der Messkurve nimmt sowohl bei den unstimulierten als auch signifikant bei den stimulierten DCs nach der kombinierten Antikörperbehandlung ab (Abb. 40 B).

Betrachtet man sich die Kurvenverläufe der Aggregationsmessungen bei Verwendung von unstimulierten und stimulierten DCs, beispielhaft dargestellt in Abbildung 41, so ist ersichtlich, dass die Blockierung des FcγR IIb wie bereits in Abb. 39 gezeigt zu einer leicht verminderten Steigung der Aggregationskurve führt. Allerdings ist der restliche Kurvenverlauf nicht wesentlich beeinträchtigt (türkise Kurve). Wie schon in Abb. 36 gezeigt, führt die Blockierung aller Fc-Rezeptoren mit einem Immunglobulingemisch zu einer leicht geringeren Steigung und maximalen Aggregation, besonders auffällig ist jedoch, dass es im späteren Verlauf der Kurve - ab ca. 60 Sekunden - zu einer Disaggregation kommt (pinke Kurve). Ähnlich ist es auch, wenn zunächst der FcγR IIb AK und anschließend das FcR blockierende Immunglobulingemisch kombiniert angewandt werden (schwarze Kurve). Hier zeigt sich ebenfalls eine leicht geringere Steigung und auch eine schwächere Aggregation im Vergleich zu den Kontrollen (blau bzw. rot). Auch ist bei diesem Ansatz erneut der Effekt sichtbar, dass es zu einer Disaggregation nach ca. 60 Sekunden kommt (Abb. 41).

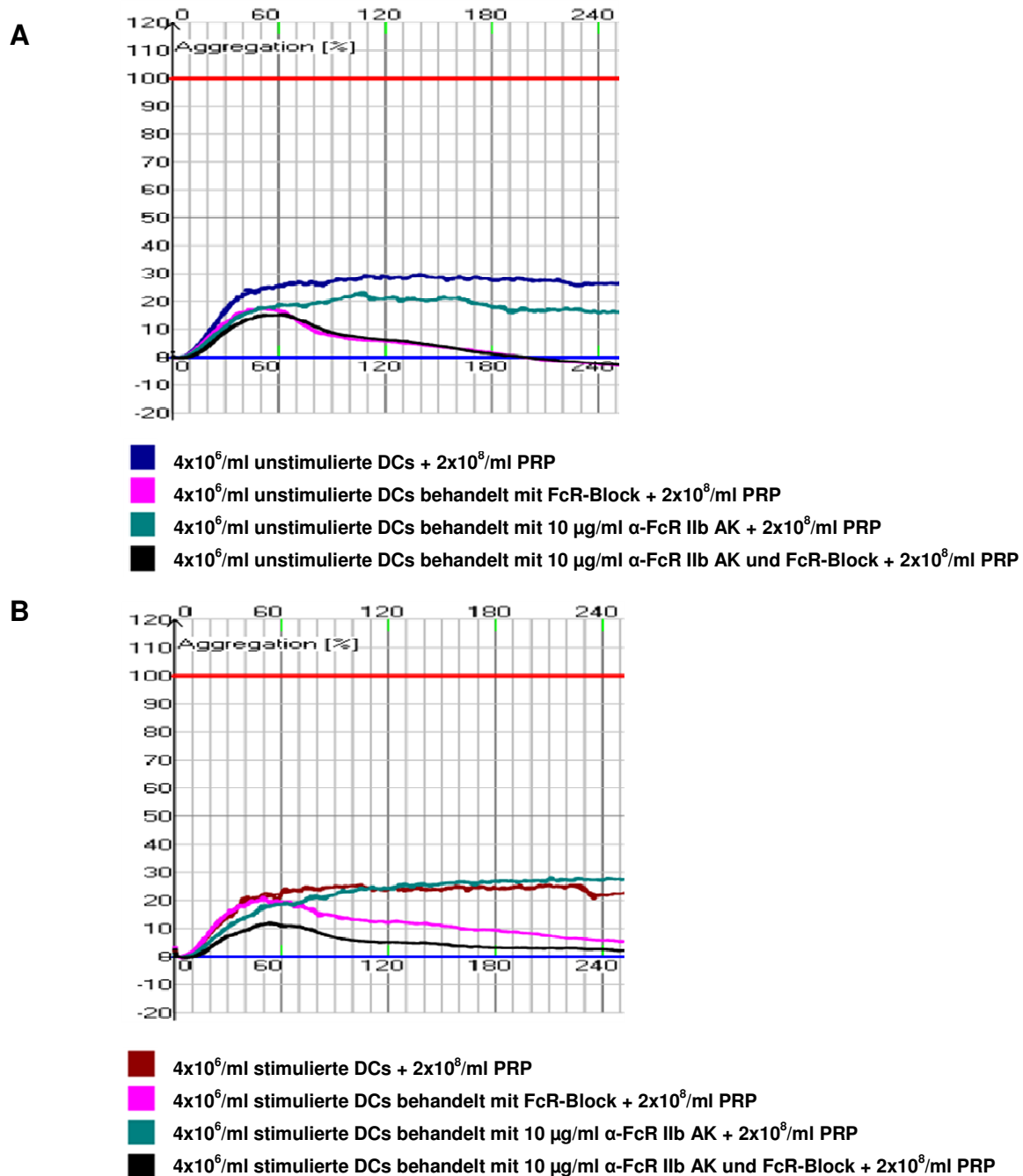


Abb. 41: Verlauf der Aggregationskurven nach Behandlung dendritischer Zellen mit einem Fc-Rezeptor blockierenden Immunglobulingemisch, einem FcγR IIb blockierenden Antikörper und einer Kombination beider Reagenzien

2x10⁸/ml PRP wurden zusammen mit 4x10⁶/ml humanen DCs im Aggregometer gemessen. Die DCs waren entweder unstimuliert und immatur (A) oder wurden mit einem Zytokincocktail stimuliert (B). Jeweils ein Aliquot wurde für 10 min bei 4°C mit einem Fc-Rezeptor blockierenden Immunglobulingemisch inkubiert (pinke Kurve) oder für 10 min bei 4°C mit einem spezifischen anti-FcγR IIb AK (Fab) inkubiert (türkise Kurve) oder mit einer aufeinander folgenden Kombination beider Reagenzien (für jeweils 10 min bei 4°C) (schwarze Kurve). Dargestellt ist der Verlauf der Aggregation über einen Zeitraum von 4 Minuten. Die Darstellung ist beispielhaft für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4. Diskussion

4.1. Analysen zur Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für den Phänotyp und die Funktion Knochenmarksabgeleiteter dendritischer Zellen

4.1.1. Die Stimulation mit PDBu führt zur Generierung hoher ROS-Mengen bereits nach kurzen Zeiträumen und gesteigerter MHCII-Expression

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bei inflammatorischen Prozessen ist ein entscheidender Faktor. Kommt es im Rahmen einer Infektion zu einem Eindringen von Pathogenen werden in unterschiedlichen Zellen des Immunsystems reaktive Sauerstoffspezies gebildet, um so den Erreger unschädlich zu machen. Neutrophile Granulozyten beispielsweise produzieren intrazellulär ROS während der Phagozytose (Chen et al., 2012) ebenso wie Makrophagen (Forman et al., 2001). Dadurch können Pathogene bzw. ihre DNA angegriffen und zerstört werden. Allerdings werden reaktive Sauerstoffspezies nicht nur während Infektionen gebildet. Auch unter „normalen“ Bedingungen werden ROS gebildet und können sezerniert werden. Diese Freisetzung radikaler Moleküle kann beispielsweise zu einer Schädigung des Gewebes oder auch der DNA des Individuums führen. Waris et al. beschrieben 2006 die karzinogene Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies unter anderem durch Mutationen im Erbgut oder auch durch eine Schädigung von Tumor-Suppressor-Genen (Waris et al., 2006). Allerdings hat die ROS-Bildung nicht nur schädigende Effekte. Auch ein Einfluss auf die Differenzierung und die Funktionalität von Zellen wurde bereits beschrieben. Zhang et al. zeigten 2013, dass intrazellulär gebildete reaktive Sauerstoffspezies notwendig sind für die Differenzierung von M2 Makrophagen (Zhang et al., 2013). Auch bei der Antigenpräsentation durch dendritische Zellen werden intrazellulär ROS gebildet (Matsue et al., 2003).

Sheng et al. untersuchten 2010 die Auswirkungen von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Differenzierung und die anschließenden Funktionalität von dendritischen

Zellen. Dazu wurden Knochenmarkszellen in Anwesenheit von GM-CSF für sechs Tage kultiviert. Hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie GM-CSF wirken unter anderen durch die Induktion der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. An Tag 3 und Tag 6 der Kultur wurden die DCs hinsichtlich ihrem Phänotyp und ihrer Funktionalität analysiert. Die Forscher fanden heraus, dass sich die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies während der Differenzierung ändert. Am dritten Tag bildeten die DCs nur wenig ROS, wohingegen Tag 6-DCs viel ROS produzierten. Dies hatte auch einen starken Einfluss auf den Phänotyp und die Funktion der DCs. Tag 3-DCs zeigten nach Stimulation mit LPS eine stärkere Aufregulation der Oberflächenmoleküle CD80, CD86 und MHCII als Tag 6-DCs. Im Gegensatz dazu zeigten Tag 6-DCs eine bessere Aufnahme und Prozessierung von Ovalbumin als Tag 3-DCs. Allerdings waren letztere effizienter in der T-Zellstimulation. Die Forscher konnten so zeigen, dass reaktive Sauerstoffspezies eine mögliche Rolle bei der Differenzierung und der Funktionalität dendritischer mit GM-CSF kultivierter Zellen spielen (Sheng et al., 2010).

Die in dieser Dissertation verwendeten BM-DCs wurden ebenfalls in Anwesenheit von GM-CSF generiert. Im Unterschied zur Arbeit von Sheng et al. wurden die BM-DCs allerdings für acht Tage kultiviert und zusätzlich an Tag 8 mit dem Phorbolster PDBu stimuliert. Untersucht werden sollten die Auswirkungen einer gesteigerten intrazellulären ROS-Produktion wie es beispielsweise nach Aktivierung von DCs mit dem Überstand von Thrombozytenkulturen der Fall ist. Ein Fokus lag bei der vorliegenden Arbeit auf den relativ kurzen Inkubationszeiträumen bis 120 Minuten. Solch kurze Zeiträume können eine große Rolle bei der ersten Phase einer Läsion oder Ruptur in einem arteriosklerotischen Gefäß spielen. Aber auch Auswirkungen nach längeren Inkubationszeiträumen von 24 Stunden wurden analysiert im Hinblick auf ein Fortschreiten der Erkrankung und eine Weiterentwicklung der Plaques.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits durch vergleichsweise niedrige PDBu-Konzentrationen eine starke ROS-Produktion hervorgerufen werden kann. Die Verwendung höherer Dosen von PDBu führte analog dazu zu einer stärkeren Generierung reaktiver Sauerstoffspezies. Besonders nach einem kurzen Zeitraum von 15 Minuten sind die höchsten ROS-Mengen messbar. Ähnlich wie bei Sheng et al. konnte einhergehend mit der gesteigerten ROS-Produktion ebenfalls ein Anstieg der MHCII-Expression nach kurzen Zeitintervallen detektiert werden. Auffällig ist

hierbei, dass DCs, die eine erhöhte MHCII-Expression aufweisen (MHCII^{high} Population) auch eine erhöhte Generierung von ROS aufweisen als die DCs, die nur geringe Mengen an MHCII auf ihrer Oberfläche tragen (MHCII^{low} Population). Daraus kann geschlossen werden, dass es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen der intrazellulären ROS-Produktion und der Expression von MHCII gibt und somit die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zur Reifung der DCs führen kann. Im Gegensatz zur Stimulation von BM-DCs mit PDBu führt die Behandlung von BM-DCs mit LPS hingegen nicht zu einer Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies. Weiterhin konnte auch keine gesteigerte Expression von MHCII nach kurzen Zeitintervallen gemessen werden.

4.1.2. Die Stimulation dendritischer Zellen mit PDBu führt zu einer gesteigerten CD86 und MHCII-Expression sowie zu einem gesteigerten T-Zellstimulationspotential

Zeitlich versetzte Analysen der Expression der Oberflächenmoleküle MHCII und CD86 nach 24 Stunden im Hinblick auf eine Aktivierung der DCs zeigten, dass diese durch die Stimulation mit PDBu in einem ähnlichen, allerdings leicht geringeren Maß induziert wurden wie durch LPS. Beide Moleküle wurden vermehrt exprimiert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wiesen LPS-stimulierte BM-DCs das signifikant stärkste T-Zellstimulatorische Potential auf. Die mit PDBu stimulierten BM-DCs zeigten zwar eine sehr hohe T-Zellstimulatorische Kapazität, allerdings lag die Proliferationsrate der T-Zellen deutlich unterhalb der LPS-Kontrolle. Dieser Befund korreliert mit den Ergebnissen der Expression der Oberflächenmarker, da die T-Zellen-Aktivierung unter anderem durch MHCII und CD86 vermittelt wird. Eine erhöhte Expression dieser beiden Marker führt somit zu einer erhöhten Proliferationsrate der T-Zellen. Die zur Validierung der Ergebnisse durchgeführte Stimulation mit dem Phorbol-ester PMA führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Die hervorgerufenen Resultate sind daher kein spezifischer PDBu-induzierter Effekt. Bereits 1999 veröffentlichten Rutault et al. eine Studie in der beschrieben wurde, dass humane dendritische Zellen durch reaktive Sauerstoffspezies aktiviert werden können. Die Forscher konnten zeigen,

dass die Behandlung dendritischer Zellen mit Wasserstoffperoxid zu einer verstärkten Expression von Oberflächenmolekülen führt, die mit der Aktivierung von T-Zellen assoziiert sind, wie beispielsweise MHCII, CD86 und CD40. Zudem zeigten die so behandelten humanen DCs eine verstärkte T-Zellstimulatorische Kapazität (Rutault et al., 1999). Im Unterschied zu den Versuchen von Rutault et al. wurden die BM-DCs in dieser Arbeit jedoch nicht mit einem extrazellulärem Sauerstoffradikal behandelt, sondern die Zellen wurden durch die Behandlung mit PDBu zur intrazellulären ROS-Produktion angeregt.

Entscheidend ist, dass die intrazelluläre ROS-Bildung bei BM-DCs von einer Aktivierung, Maturierung und einer Änderung der Funktionalität begleitet ist. Dies kann im arteriosklerotischen Krankheitsverlauf ein sehr entscheidender Faktor sein, da die DCs anschließend in der Lage sind T-Zellen zu aktivieren, die ihrerseits den Krankheitsverlauf verstärken können (Tse et al., 2013). Aus diesem Grunde ist es von großer Bedeutung zu untersuchen, ob und wie die ROS-Generierung inhibiert werden kann und welche Auswirkungen dies hat, gerade im Hinblick auf einen therapeutischen Nutzen

4.1.3. Die Behandlung von BM-DCs mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin vor der PDBu-Stimulation führt zu einer reduzierten MHCII-Expression und einer verminderten T-Zellstimulatorischen Kapazität

Es gibt verschiedene Möglichkeiten unterschiedlicher Zelltypen zur intrazellulären Generierung reaktiver Sauerstoffspezies. Die Xanthinoxidase in endothelialen Zellen produziert beispielsweise Stickstoffmonoxidradikale und spielt ebenfalls eine große Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen. So konnte in Patienten mit akutem Koronarsyndrom eine erhöhte Aktivität der Xanthinoxidase nachgewiesen werden (Vogiatzi et al., 2009). Sowohl die Myeloperoxidasen als auch die Lipoxigenasen werden in Zusammenhang gebracht mit der Oxidation von LDL zu oxLDL (Vogiatzi et al., 2009). Allerdings ist die Hauptquelle reaktiver Sauerstoffspezies zumeist die NADPH-Oxidase (Jung et al., 2004). Auch in dieser Arbeit lag der Fokus auf der ROS-Generierung durch dieses Enzym.

Durch die Verwendung des NADPH-Oxidase-Inhibitors Apocynin sollte untersucht werden, welchen Einfluss die verminderte Aktivität der NADPH-Oxidase auf die dendritischen Zellen hat. Allerdings zeigten die verwendeten Apocyninkonzentrationen keinen Effekt auf die gebildete ROS-Menge nach kurzen Zeitintervallen. Ähnliche Beobachtungen machten auch Sheng et al. 2010. Auch diese Forscher verwendeten Apocynin zur Inhibierung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, konnten aber keinen entsprechenden Effekt beobachten. Dabei verwendeten die Forscher sogar eine höhere Konzentration von 400 μM Apocynin (Sheng et al., 2010). Im Gegensatz dazu zeigten mit Apocynin behandelte und mit PDBu stimulierte BM-DCs eine signifikant geringere MHCII-Expression nach 120 Minuten. Dieser Effekt ist allerdings 24 Stunden nach Stimulation nicht mehr detektierbar. Hier zeigten die zusätzlich mit Apocynin behandelten Gruppen eine ähnliche Expression der Oberflächenmoleküle MHCII und CD86 wie die alleinige PDBu-Stimulierung. Im Hinblick auf die T-Zellstimulatorische Kapazität ist allerdings erneut eine Wirkung des Inhibitors zu verzeichnen. Mit Apocynin behandelte und PDBu stimulierte BM-DCs zeigen ein deutlich geringeres T-Zellstimulatorisches Potential als nur mit PDBu behandelte BM-DCs. Apocynin wurde bereits sehr früh als NADPH-Oxidase-Inhibitor beschrieben (Simons et al., 1990). In Leukozyten, Monozyten und Endothelzellen verhindert Apocynin die Translokation der zytosolischen Untereinheiten an die membranständigen Untereinheiten (Stolk et al., 1994). Allerdings wird Apocynin als NADPH-Oxidase-Inhibitor kontrovers diskutiert. Heumüller et al. (2008) beschrieben Apocynin als Antioxidans und nicht als Inhibitor in nichtphagozytierenden Zellen in Kultur. Ihre Studien bezogen sich auf vaskuläre NADPH-Oxidasen. Auffällig bei dem in der vorliegenden Arbeit gewählten Versuchsansatz ist, dass die ROS-Produktion durch die Apocynin-Behandlung nicht beeinflusst zu werden scheint, aber trotzdem gerade bei der Funktionalität der BM-DCs eine Auswirkung zu verzeichnen ist. Reaktive Sauerstoffspezies haben einen Einfluss auf Transkriptionsfaktoren, insbesondere auf AP-1 (Activator Protein-1) und NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) (Banerjee et al., 2012; Han et al., 2013). Es ist möglich, dass die Expression der ausgewählten Oberflächenmoleküle nicht durch Apocynin beeinflusst wird, der Inhibitor aber die BM-DCs insoweit beeinträchtigt, dass die T-Zellstimulatorische Kapazität reduziert wird. Dies wäre zum Beispiel möglich durch eine Änderung des Profils der sekretierten Zytokine. Dass Apocynin einen Einfluss auf die Zytokinproduktion haben kann, publizierten 2013 Nam et al.

Die Forscher konnten zeigen, dass Apocynin in CD8⁺ T-Zellen direkt die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IFN- γ oder IL-2 inhibiert (Nam et al., 2014).

4.1.4. Die Behandlung von BM-DCs mit Chelerythrin vor PDBu-Stimulation führt zu reduzierter ROS-Produktion und einer verminderten MHCII-Expression nach 2 Stunden und einem immaturren Phänotyp nach 24 Stunden

Analog zu den Versuchen mit Apocynin wurde ein weiterer Inhibitor verwendet. Chelerythrin ist im Gegensatz zu Apocynin ein Proteinkinase C-Inhibitor. Durch die Behandlung von BM-DCs mit Chelerythrin und der anschließenden Stimulation mit PDBu kommt es nach zwei Stunden zu einer deutlichen Inhibition der ROS-Produktion in CD11c⁺ MHCII hoch exprimierenden BM-DCs. Dabei ist schon nach 15 Minuten ein Einfluss der Chelerythrin-Behandlung auf die MHCII-Expression detektierbar. Diese ist deutlich geringer als nach alleiniger PDBu-Stimulation. Sehr deutlich wird dieser Effekt nach 24 Stunden. Nach dieser Inkubationszeit weisen BM-DCs, die mit Chelerythrin behandelt und mit PDBu stimuliert wurden einen stark immaturren Phänotyp auf. Es werden nur sehr geringe Mengen an CD86 und MHCII auf der Zelloberfläche exprimiert, ähnlich wie bei den immaturren Kontrollen. Der Grund hierfür kann die ROS-Inhibition sein, allerdings muss auch bedacht werden, dass Chelerythrin einen starken Einfluss auf die Zellteilung selbst hat. Chelerythrin wirkt als Inhibitor der Proteinkinase C. Diese wiederum ist involviert in die Zelldifferenzierung, die Proliferation und das Überleben der Zelle. Chmura et al. (2000) zeigten eine zytotoxische Wirkung von Chelerythrin auf neun verschiedene Tumorzelllinien und postulieren eine potentielle Rolle von Chelerythrin als antitumor-Reagenz. Auch Kumar et al. (2013) zeigten, dass die Behandlung von Lymphomzellen mit Chelerythrin zur Apoptose führt. Platzbecker et al. (2003) fanden heraus, dass die apoptotische Wirkung durch die Aktivierung von Caspase-8 vermittelt wird. Nichtsdestotrotz wird Chelerythrin auch in anderen Versuchsreihen als Inhibitor bzw. Antagonist von Phorbolestern angewandt. Nimitvilai et al. (2013) untersuchten die Auswirkungen einer PMA-Behandlung auf Neuronen und

verwendeten ebenfalls Chelerythrin in einer Konzentration von 10 μM als Antagonist. Allerdings gibt es auch kontroverse Hinweise im Hinblick auf eine ROS-Inhibition durch Chelerythrin. In einigen Publikationen wird beschrieben, dass Chelerythrin die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies induziert und so apoptotisch wirkt (Medvetz et al., 2015; Kumar et al. 2013). Diese Wirkung konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht bestätigt werden, da nach Chelerythrin-Behandlung eine deutlich reduzierte ROS-Generierung detektierbar war.

4.1.5. Die Verwendung von BM-DCs, welche einen gp91^{phox} -/- Genotyp aufweisen, führt zu einer Reduzierung der ROS-Produktion nach kurzen Zeitabständen, allerdings hat dies keinen Einfluss auf den Phänotyp und die Funktionalität der BM-DCs nach 24 Stunden

Um mögliche Nebeneffekte, die bei der Verwendung der oben genannten Inhibitoren entstehen können, auszuschließen, wurden BM-DCs von Mäusen verwendet, die einen Knockout der membranständigen Untereinheit gp91^{phox} der NADPH-Oxidase besitzen. Durch die Verwendung dieser BM-DCs kann untersucht werden, welchen Einfluss die fehlende Aktivität der NADPH-Oxidase hat.

Bei dem in dieser Arbeit gewählten Versuchsansatz führt der Knockout von gp91^{phox} zu einer signifikant verminderten ROS-Produktion, allerdings nur in der CD11c+ MHCII niedrig exprimierenden Population nach 15 Minuten und nur bei Verwendung der höchsten PDBu-Konzentration. Die ROS-Produktion nach 120 Minuten war ebenfalls verringert, jedoch nicht signifikant. Weiterhin zeigte sich bei den gp91^{phox} -/- BM-DCs kein Unterschied in der MHCII-Expression nach 15 und 120 Minuten. Auch nach 24 Stunden liegt ein mit dem Kontroll-Wildtyp vergleichbarer maturaer Phänotyp vor. Die T-Zellstimulatorische Kapazität ist vergleichbar mit den Wildtyp-Kontrollen. Auffällig bei den Ergebnissen ist der Befund, dass die ROS-Produktion nur in der MHCII niedrig exprimierenden Gruppe signifikant reduziert war, woraufhin sicherheitshalber der Genotyp der Mäuse nochmals überprüft wurde. Da es beim Genotyp der Mäuse keine Auffälligkeiten gab, muss die ROS-Produktion auf weitere ROS-Quellen zurückzuführen sein. Die NADPH-Oxidase scheint bei den im Rahmen

dieser Arbeit generierten BM-DCs nicht die Hauptquelle für reaktive Sauerstoffspezies zu sein, auch wenn dies für andere Zellarten gezeigt werden konnte (Robinson, 2008; Görlach et al., 2000). Wie bereits weiter oben beschrieben, gibt es diverse Enzyme, die ebenfalls reaktive Sauerstoffspezies generieren können. Neben den oben genannten kann es auch zu einer ROS-Produktion durch weitere Stoffwechsellenzyme kommen, z. B. durch die Aldehydoxidase, Prostaglandin-Synthase, Galactose-Oxidase oder auch die Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenasen. Aber auch durch komplexe Systeme wie die mikrosomale oder die mitochondriale Elektronentransportkette können ROS gebildet werden (Rechtsmedizin, Uni Bonn, 2015).

Allerdings sieht man eine entsprechende Reaktion auf die Stimulierung mit PDBu. Somit muss PDBu weiterreichende Effekte haben als nur die Aktivierung von PKC oder aber die PKC aktiviert weitere ROS-produzierende Enzyme. Doerner et al. beschrieben bereits 1990, dass Phorbolster auch PKC-unabhängige Effekte auslösen können. In ihrem Beispiel ging es um mögliche Effekte auf Kalziumkanäle im Hippocampus. Für die Versuche verwendeten sie zum einen normales PDBu und zum anderen eine PDBu-Variante (4 α -PDBu), welche ein inaktives Analogon ist. Die Forscher konnten zeigen, dass auch die eigentlich inaktive Variante einen Einfluss auf die Kalziumkanäle hat. Allerdings wird für eine Wirkung eine sehr viel höhere Dosis benötigt als mit funktionalem PDBu. Doerner et al. (1990) postulierten, dass eine Konzentration höher als 5 μ M einen unspezifischen Nebeneffekt haben könnte. Clemens et al. beschrieben die Proteinkinase C als den einzig bekannten Rezeptor für Phorbolster. Allerdings beschrieben die Wissenschaftler auch kontroverse Effekte bei der Verwendung von Phorbolestern. Beispielsweise kann die Folge zum einen die Aktivierung von Zellwachstum und Mitose sein, aber gleichzeitig auch in anderen Fällen die Inhibition der Zellproliferation. Auch diese Forscher beschrieben, dass es zu unspezifischen Wirkungen der Phorbolster kommen kann, die PKC unabhängig sind (Clemens et al., 1992). Allerdings kann auch die Proteinkinase C weiterreichende Effekte haben. So führt die Aktivierung mittels Phorbolestern zu einer Veränderung bezüglich der Signalkaskade innerhalb der Zelle. Die PKC kann die MAP (mitogen-activated protein) -Kinaseaktivität steigern oder auch Komponenten, die bei der Transkription und Translation beteiligt sind phosphorylieren und so zu Änderungen der Genexpression führen (Clemens et al., 1992).

4.1.6. Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die intrazelluläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in dendritischen Zellen - induziert durch die Stimulation mit PDBu - begleitet wird von der Maturierung der Zellen und dies in der Folge zu einer starken T-Zellstimulatorischen Kapazität der DCs führt. Aufgrund der Tatsache, dass nach kurzen Zeitintervallen die DCs mit erhöhter MHCII-Expression auch eine erhöhte ROS-Produktion aufweisen kann eine mögliche Korrelation der intrazellulären ROS-Generierung und der Maturierung hergestellt werden. Eine solche intrazelluläre ROS-Generierung kann während der Entwicklung einer Arteriosklerose entstehen (Phaniendra et al., 2015; Matsuda et al., 2013; Kim et al., 2014). Die DCs können als Folge ihrer Aktivierung ihrerseits T-Zellen aktivieren und zur Proliferation anregen. Diese T-Zellen können als Effektoren zu einem Fortschreiten der Läsionen führen (Lintermans et al., 2014; Ammirati et al., 2015). Aus diesem Grund kann es von therapeutischem Nutzen sein die ROS-Produktion in DCs zu inhibieren. Es gab bereits allgemeine Versuche zur Inhibition reaktiver Sauerstoffspezies bei Arteriosklerose, z. B. durch die Verwendung von Agentien mit antioxidativen Eigenschaften wie Carvedilol oder Nebivolol oder aber auch durch die Verwendung von Inhibitoren des Renin-Angiotensin Systems. Durch diese Inhibitoren wird die NADPH-Oxidase-Aktivität reduziert. Auch Versuche zum Einfluss der antioxidativ wirkenden Vitamine C und E wurden durchgeführt. Jedoch sind die angewandten Substanzen und Wirkstoffe limitiert in ihrer Wirkung wie einige Studien zeigen (Vogiatzi et al., 2009). Allerdings ist eine frühe ROS-Produktion offensichtlich keine unabdingbare Voraussetzung für die Reifung der DCs. Werden DCs mit LPS stimuliert, so führt dies nicht zu einer gesteigerten intrazellulären ROS-Produktion, aber dennoch zu einer Maturierung der DCs. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Maturierung von BM-DCs unabhängig von intrazellulär gebildeten ROS ist. Die durch die Stimulation mit PDBu gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies werden nicht nur durch die NADPH-Oxidase generiert, wobei die Inaktivierung der NADPH-Oxidase keinen Einfluss auf den Phänotyp oder die Funktionalität der BM-DCs hat.

Letztendlich muss bedacht werden, dass die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in DCs nicht grundsätzlich schädlich ist. Wie bereits zuvor beschrieben sind ROS durchaus wichtig in der Differenzierungsphase der Zellen und bei der

Pathogenabwehr. Fällt diese Funktion weg, wie es beispielsweise bei der chronischen Granulomatose der Fall ist, hat dies sehr schwere Konsequenzen. Personen, die an dieser Erkrankung leiden, haben einen Gendefekt, welcher zu einer Funktionsstörung der NADPH-Oxidase führt. In der Folge leiden solche Patienten sehr häufig unter bakteriellen Infektionen oder unter Pilzbefall. Aber auch eine Prädisposition für rheumatische Erkrankungen wie z. B. chronische Darmentzündungen, oder lupusähnliche Syndrome, Lungenfibrosen oder die Bildung von Granulomen am Magenausgang sind mit dieser Erkrankung assoziiert (Wintergerst, 2002).

Daher kann es äußerst hilfreich sein, spezielle Zelltypen gezielt zu behandeln um eventuelle Nebenwirkungen möglichst gering zu halten. Ein Beispiel dafür ist die gezielte Behandlung dendritischer Zellen mit spezifischen Molekülen oder Wirkstoffen. Dies kann potentiell realisiert werden durch die Verwendung DC-adressierender Nanopartikel. Solche Nanopartikel sind bereits in der Entwicklung und werden unter anderem zur Behandlung von Tumorerkrankungen getestet (Shen et al., 2013; Hrkach et al., 2012; Praetorius et al., 2007; Ling et al., 2014).

4.2. Versuche zur Aggregation zwischen humanen Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen und Thrombozyten

Die Tatsache, dass dendritische Zellen und Thrombozyten miteinander interagieren können, ist bereits seit längerem bekannt. Dies ist gerade im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen von Bedeutung, insbesondere bei der Entstehung von Thrombosen oder arteriosklerotischen Läsionen (Koltsova et al., 2011; Manthey et al., 2011). Die Rolle von dendritischen Zellen in diesem Kontext konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Eine mögliche Aufgabe von DCs, die auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, ist die direkte Interaktion mit Thrombozyten. Bisherige Veröffentlichungen zeigen ein kontroverses Bild auf, inwiefern DCs mit Thrombozyten interagieren und welche Auswirkungen dies hat. Dem größten Teil der Forschungsergebnisse ist gemein, dass Thrombozyten in der Lage sind DCs zu aktivieren. In den meisten Studien wurden die Plättchen für die Versuche voraktiviert.

Hagihara et al. (2004) aktivierten Thrombozyten mittels Scherstress, bevor sie deren Einfluss auf DCs überprüften. Die Forscher konnten eine Aktivierung der DCs feststellen, die unter anderem eine erhöhte Expression der Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 zeigten. Allerdings war für die Aktivierung kein direkter DC-Thrombozyten-Kontakt notwendig. Der Zellkulturüberstand der Plättchen reichte für diesen Effekt aus. Auch Martinson et al. (2004) konnten durch Thrombin-voraktivierte Plättchen eine Aktivierung von DCs erreichen, welche charakterisiert war durch eine erhöhte Expression von CD80, CD83 und CD86 sowie eine erhöhte T-Zellstimulatorische Kapazität der DCs. Elzey et al. (2003) verwendeten für ihre Versuche ebenfalls mit Thrombin voraktivierte Thrombozyten. Auch diese Forscher konnten eine Maturation der DCs feststellen - gekennzeichnet durch eine erhöhte CD80 und CD86 Expression - und eine gesteigerte Produktion der Zytokine IL-6 und IL-12 detektieren. Es gibt allerdings auch Versuchsreihen, bei denen keine Voraktivierung der Plättchen stattfand. So konnten Hamzeh-Cognasse et al. (2008) auch ohne eine vorherige Aktivierung der Thrombozyten und ohne direkten Kontakt von DCs und Plättchen eine Aktivierung seitens der DCs feststellen. Auch hier zeigten die DCs eine erhöhte Expression der Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 und eine gesteigerte IL-12 Sekretion. Langer et al. (2007) nutzten ebenfalls unbehandelte Thrombozyten für ihre Versuchsreihen und konnten nach Koinkubation von DCs und Plättchen eine Aktivierung der dendritischen Zellen feststellen. Auch in diesem Fall war die Expression von CD83 erhöht und die DCs wiesen eine erhöhte T-Zellstimulatorische Kapazität auf. Im Gegensatz zu den zuvor genannten Studien, konnten Hilf et al. (2002) keine Aktivierung der DCs durch mit Thrombin voraktivierte Plättchen feststellen. Allerdings verwendeten die Forscher in dieser Arbeit ein sehr geringes Plättchen-DC-Verhältnis.

In dieser Dissertation wurde die Aggregation zwischen humanen Monozyten-abgeleiteten DCs und Thrombozyten mittels Aggregometrie untersucht. Um möglichst optimale Zellverhältnisse für die Aggregometriemessungen zu erhalten, wurden unterschiedliche DC- und Thrombozytenkonzentrationen getestet. Im Durchschnitt liegt die normale Anzahl von Plättchen im Blut zwischen $1,5$ und $4,5 \times 10^8$ pro Milliliter. Aus diesem Grund wurden für die Experimente zwei verschiedene Konzentrationen gewählt, zum einen $1 \times 10^8/\text{ml}$ und zum anderen $2 \times 10^8/\text{ml}$. Die Anzahl der DCs variierte zwischen $1 \times 10^6/\text{ml}$ und $5 \times 10^6/\text{ml}$. Die Thrombozyten wurden vor den Versuchen nicht voraktiviert oder behandelt, so dass die Interaktionen

zwischen unstimulierten bzw. stimulierten DCs mit nicht vorbehandelten Thrombozyten untersucht werden konnte. Denn obwohl bekannt ist, dass sowohl DCs als auch Plättchen an der Thrombusbildung sowie bei arteriosklerotischen Läsionen eine Rolle spielen, gibt es nur relativ wenige Erkenntnisse, welche Funktion die DCs übernehmen. Weiterhin bleibt die Frage bestehen, wie die DCs zu dem Thrombus bzw. zu den arteriosklerotischen Plaques gelangen und ob die DCs in den Thrombus einwandern oder sogar eventuell bei der Entstehung mit beteiligt sind und eine Aggregation möglicherweise vermitteln bzw. initiieren. Die im gewählten Versuchsansatz stärkste Aggregation bei der Testung der Zellzahl-Verhältnisse konnte durch die Verwendung von 2×10^8 /ml Thrombozyten und 4×10^6 /ml DCs erreicht werden, sowohl bei immaturren als auch maturaen DCs. Dieses Verhältnis wurde für alle weiteren Aggregationsmessungen genutzt. Wurden DCs oder Thrombozyten allein im Aggregometer gemessen, so war keine Aggregation detektierbar. Nur wenn beide Zellarten zusammen gemessen wurden, konnte eine Aggregation festgestellt werden.

4.2.1. Von dendritischen Zellen produzierter Tissue Factor hat keinen Einfluss auf die Aggregation

Bereits 2000 wurde von Broussas et al. (2000) publiziert, dass DCs in der Lage sind Tissue Factor zu exprimieren. In den Versuchen ging es ursächlich um die Separierung dendritischer Zellen von Monozyten und mögliche methodische Nebenwirkungen, die bei der Verwendung der Zellen in klinischen Studien auftreten könnten. Dabei fanden die Forscher heraus, dass die mittels Gegenstromzentrifugation gewonnenen und kultivierten DCs im immaturren Zustand Tissue Factor mRNA exprimierten und auch Tissue Factor Protein auf ihrer Oberfläche trugen. Weiterhin wiesen die DCs auch prokoagulierende Eigenschaften auf (Broussas et al., 2000). Baroni et al. (2007) beschrieben, dass die Stimulierung humaner Monozytenabgeleiteter DCs mit einem P2X7-Rezeptor Agonist zur Freisetzung von Plasmamembranvesikeln führte, sogenannten Mikropartikeln. Diese Partikel enthielten die membrangebundene Form des Tissue Factors. Shrivastava et al. (2013) konnten zeigen, dass murine BM-DCs Tissue Factor exprimieren.

Auch in dieser Arbeit konnte mittels einer Oberflächenfärbung der dendritischen Zellen gezeigt werden, dass diese in der Lage sind Tissue Factor zu exprimieren. Tissue Factor (TF) ist eines der Schlüsselemente der Gerinnungskaskade. Es dient als Rezeptor für Prokonvertin (Faktor VIIa) und kann nach der Bindung zur Aktivierung von Thrombin führen und zur Bildung von Fibrin, so dass sich ein Thrombus ausbilden kann (Steffel et al., 2006). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob es aufgrund der Expression des Tissue Factors zur Aggregation zwischen DCs und Thrombozyten kommt. Zur Überprüfung der These wurden zwei Wege gewählt. Zum einen wurden die DCs vor der Koinkubation mit den Thrombozyten mit dem Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor (TFPI) inkubiert. Dieses Polypeptid kommt auch physiologisch vor und ist der Gegenspieler und Regulator des Tissue Factors. Es ist ein Serin-Proteasen-Inhibitor und verhindert durch Interaktion mit dem TF/Faktor VIIa-Komplex die Auslösung der extrinsischen Gerinnung (Gader, 2009; Lwaleed et al., 2006).

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente zeigten allerdings keinen Einfluss des TFPIs auf die Aggregation zwischen dendritischen Zellen und Thrombozyten. Auch durch die Verwendung eines zweiten Inhibitors, eines anti-Tissue Factor-Antikörpers konnte in diesem Fall die Aggregation nicht vollständig aufgehoben werden. Der blockierende Antikörper verhindert ansonsten die Koagulation durch die kompetitive Inhibierung der Bindung von Faktor X an den TF-Faktor VIIa-Komplex (Ngo et al., 2007). In den in dieser Dissertation durchgeführten Experimenten führt die Behandlung der dendritischen Zellen mit dem blockierenden Antikörper lediglich zu einer leicht reduzierten Aggregationsstärke, allerdings auch nur bei stimulierten DCs. Die durch diesen Experimentalaufbau hervorgerufene Aggregation ist somit nicht grundlegend auf die Beteiligung des Tissue Factors zurückzuführen.

4.2.2. Dendritische Zellen sind in der Lage Thrombin zu generieren, allerdings verläuft die Aggregation unabhängig von Thrombin

Thrombin ist nicht nur das Schlüsselmolekül bei der Gerinnungskaskade, es hat auch Auswirkungen auf Zellen des Immunsystems, z.B. dendritische Zellen. 2007 beschrieben Yanagita et al., dass aus dem Blut gewonnene DCs PAR (Protease-

activated receptor) -1 exprimieren, welches ein Rezeptor für Thrombin ist. Die Forscher fanden heraus, dass sowohl myeloide als auch plasmazytoide DCs durch Thrombin stimuliert werden können und in der Folge HLA-DR und CD86 verstärkt exprimieren und die so aktivierten DCs eine Proliferation allogener T-Zellen induzieren können (Yanagita et al., 2007). Allerdings beschrieben die Forscher, dass Monozyten-abgeleitete DCs (MoDCs) kein PAR auf ihrer Oberfläche exprimieren. Zu einem ähnlichen Befund kamen auch Li et al. (2008). Auch sie untersuchten die Expression von PAR-1 auf der Oberfläche dendritischer Zellen und konnten zeigen, dass in unstimulierten MoDCs keine PAR-1-Expression zu detektieren war. Wurden die DCs jedoch mit LPS stimuliert, exprimierten sie PAR-1 und PAR-3 (Li et al., 2008). Jedoch sind dendritische Zellen nicht nur in der Lage Rezeptoren für Thrombin zu generieren und exprimieren. DCs sind auch in der Lage Prothrombin zu aktivem Thrombin zu spalten. Das im Plasma enthaltene Prothrombin kann durch die dendritischen Zellen zu Thrombin umgewandelt werden. Dies ist möglich, da - wie zuvor beschrieben - DCs in der Lage sind Tissue Factor zu exprimieren. Der TF kann mit Faktor VII einen Komplex bilden, wobei Faktor VII aktiviert wird. Dieser aktive Komplex kann Faktor X aktivieren, welcher - wie in der Einleitung beschrieben - Prothrombin in das enzymatisch aktive Thrombin spaltet. Dieser Effekt wird durch die Anwesenheit von Thrombozyten noch verstärkt, wie die eigenen Messungen des Thrombingenerierungspotentials zeigen. Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, dass die Aggregation zwischen DCs und Thrombozyten auf diese Thrombinaktivierung zurückzuführen ist. Um diese These zu überprüfen, wurde den Aggregationsansätzen je einer von drei FXa-Inhibitoren zugegeben. Alle drei Inhibitoren sind in der Literatur beschriebene Inhibitoren bzw. werden bereits als Therapeutikum eingesetzt.

PPack als direkter, irreversibler Inhibitor des Faktor Xa, wurde bereits 1995 als Antikoagulant beschrieben (Lyon et al., 1995; Lyon et al., 1999). In der Messung des Thrombingenerierungspotentials (CAT) der DCs konnte die Thrombinbildung durch PPack komplett inhibiert werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch war bei der Messung der Aggregation kein inhibierender Einfluss messbar. Die DCs und Thrombozyten zeigten eine vergleichbar starke Aggregation wie die Kontrollansätze ohne Zusatz von PPack. Gleiche Ergebnisse wurden bei Verwendung der Inhibitoren Fondaparinux (Arixtra) und Fragmin erzielt. Arixtra wird als Therapeutikum unter anderem zur Prophylaxe venöser thrombo-embolischer Ereignisse verabreicht

(Wirkstoff Aktuell, 2010; Hackett et al., 2015). Doch obwohl auch dieser Inhibitor eine gänzliche Inhibition der Thrombingenerierung während der CAT-Messung zeigte, wurde die Aggregation in den Experimenten nicht beeinflusst. 2014 veröffentlichten Laurent et al. eine ähnliche Studie. Die Wissenschaftler untersuchten den Einfluss von Fondaparinux auf die koagulierende Aktivität von Monozyten und deren Zytokinsekretion. Monozyten exprimieren ähnlich wie DCs Tissue Factor auf ihrer Oberfläche und sind daher wie DCs in der Lage Thrombin zu generieren. Die Forscher fanden heraus, dass durch die Behandlung der Monozyten mit Fondaparinux die Tissue Factor-Expression nicht beeinflusst wurde. Allerdings konnten sie durch die Behandlung keine signifikante Inhibition der prokoagulierenden Aktivität der Monozyten nachweisen (Laurent et al., 2014).

Fragmin als niedermolekulares Heparin inhibiert indirekt Thrombin. Es wird ebenfalls wie Arixtra als therapeutisches Medikament eingesetzt, z.B. als Prophylaxe gegen das Auftreten von Thrombosen oder Lungenembolien nach Operationen (www.diagnosia.de; www.pfizermed.de). Die antikoagulierende Wirkung wurde ebenfalls in mehreren Studien belegt (Hartl et al., 1990; Jørgensen et al., 1992). Allerdings zeigte auch dieser Inhibitor in den durchgeführten Versuchen keinen Einfluss auf die Aggregation, obwohl - wie bei den zuvor vorgestellten Inhibitoren - die Thrombingenerierung im CAT vollständig aufgehoben werden konnte.

Thrombin und das Thrombingenerierungspotential der dendritischen Zellen hat nach den hier erlangten Befunden keinen grundlegenden Einfluss auf die Aggregation zwischen DCs und Thrombozyten.

4.2.3. Die Aggregation zwischen dendritischen Zellen und Thrombozyten ist nicht wesentlich von ATP oder ADP abhängig

Thrombozyten können mittels ATP oder auch ADP aktiviert werden. Sie exprimieren auf ihrer Zelloberfläche Rezeptoren der P2-Familie. ADP kann an die Rezeptoren P2Y1 oder auch an P2Y12 binden. P2X1 ist der Rezeptor für ATP. Nach einer vaskulären Verletzung können sowohl Endothelzellen als auch Erythrozyten ADP und ATP freisetzen. Diese können an die entsprechenden Rezeptoren an der

Oberfläche der Thrombozyten binden und diese so aktivieren. Plättchen enthalten ihrerseits in intrazellulären Granula ATP und ADP. Durch die Aktivierung der Zelle kommt es zu einer Ausschüttung dieser Granula wodurch zusätzlich ADP und ATP freigesetzt wird. Dies führt zu einer autokrinen Reaktion und einer verstärkten weiteren Aktivierung zusätzlicher Thrombozyten (Born, 1977; Oury et al., 2006).

Aus diesem Grund wurde untersucht, welchen Einfluss in den Proben vorhandenes ADP und ATP auf die Aggregation hat und ob die Aggregation möglicherweise von ADP oder ATP abhängig ist. Um dies zu überprüfen wurde das Enzym Apyrase den Versuchsansätzen zugefügt. Apyrase, als ATP-Diphosphohydrolase, katalysiert die Abspaltung von γ -Phosphat von ATP sowie die Abspaltung von β -Phosphat von ADP und kann sich so inhibitorisch auf die Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten auswirken. Moeckel et al. (2014) nutzten für ihre Versuche zu diesem Thema eine optimierte Form der humanen Apyrase. Sie konnten zeigen, dass die Thrombusbildung und ein thrombotischer Verschluss komplett verhindert werden konnte. In dieser Arbeit konnte nach Apyrase-Behandlung der Versuchsansätze bei den stimulierten DCs lediglich eine leichte Inhibition der Aggregation festgestellt werden. Bei unstimulierten DCs ist keine Inhibition detektierbar. Die im Rahmen dieser Versuche vorliegende Aggregation ist also nicht auf die Anwesenheit von ADP oder ATP in den Versuchsansätzen zurückzuführen, sondern es müssen andere Faktoren eine grundlegende Funktion ausüben.

4.2.4. Die Verwendung von Antikörpern gegen CD18 bzw. PSGL-1 führt zu einer vergleichbar reduzierten Aggregation zwischen dendritischen Zellen und Thrombozyten wie bei Einsatz der korrespondierenden Isotypkontrollantikörper

Integrine sind Adhäsionsrezeptoren, die in der Plasmamembran verankert sind. Sie sind essentiell für die Adhäsion an andere Zellen oder aber auch an Proteine der extrazellulären Matrix. Integrine bestehen aus zwei Untereinheiten: einer α - und einer β -Untereinheit. Die Variationen innerhalb der Familie der Integrine entstehen durch die variable Kombination von unterschiedlichen α - mit verschiedenen β -Untereinheiten. Die Familie der β -2-Integrine besteht somit immer aus einer β -2-

Untereinheit (CD18) und einer variabel dazu kombinierten α -Kette (www.spektrum.de; Harris et al., 2000; Barczyk et al., 2010). CD18 wird unter anderem von dendritischen Zellen exprimiert, wobei vier Moleküle eine besonders wichtige Rolle spielen: LFA-1 (CD11a/CD18), MAC-1 (CD11b/CD18), CD11c/CD18 und CD11d/CD18. Integrine sind jedoch nicht nur bei der Adhäsion beteiligt. Auch bei der Signalweiterleitung in die Zellen bzw. aus der Zelle (sogenanntes „outside-in“ bzw. „inside-out“ signaling) spielen sie eine wichtige Rolle. Störungen der Funktionalität der Integrine führen zu schweren Erkrankungen, wie es bei der Leukozytenadhäsionsdefizienz III, einer seltenen Erbkrankheit der Fall ist. Typische Symptome der Erkrankung sind schwere systemische und lokale Infektionen, aber auch die Neigung zu Blutungen (Harris et al., 2012).

Langer et al. (2007) beschrieben, dass DCs mittels MAC-1 an Thrombozyten adhären können. Als Beleg inkubierten sie DCs mit einem blockierenden gegen CD18 gerichteten Antikörper und konnten so eine signifikant reduzierte Adhäsion messen. Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit angewandten Versuchsaufbau verwendeten Langer et al. allerdings mit Kollagen immobilisierte Plättchen in einer Flusskammer über die die DCs gespült wurden.

Ähnlich wie im beschriebenen Forschungsprojekt wurden auch in dieser Arbeit die DCs vor der Inkubation mit Thrombozyten mit einem blockierenden gegen CD18 gerichteten Antikörper behandelt. Zuvor wurden die dendritischen Zellen mit einem Fc-Rezeptor-blockierenden Antikörpergemisch inkubiert, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers an Fc-Rezeptoren zu verhindern. Die anschließende Messung der Aggregation zeigte, dass die maximale Aggregation reduziert war, allerdings war nur bei stimulierten DCs dieser Rückgang signifikant. Auch was die Geschwindigkeit der Aggregatbildung angeht, war nur bei stimulierten DCs eine Inhibition messbar. Allerdings war auffällig, dass nicht nur die spezifischen Antikörper einen inhibierenden Effekt zeigten, auch die als Kontrolle verwendeten Isotyp-Antikörper hatten einen vergleichbaren Einfluss auf die Aggregation. Die Bindung von β -2-Integrinen könnte also eine Rolle spielen bei der Aggregation zwischen dendritischen Zellen und Thrombozyten. Diese Bindung könnte über MAC-1 auf DCs und JAM-C auf Plättchen erfolgen, wie es auch von Langer et al. (2007) beschrieben wurde. Allerdings kann keine zweifelsfreie Aussage getroffen werden, da in dieser Arbeit kein F(ab)-Fragmentantikörper für die Blockierung verwendet wurde.

Es besteht jedoch nicht nur die Möglichkeit einer Bindung mittels β -2-Integrinen für dendritische Zellen und Thrombozyten. Langer et al. (2007) zeigten in ihren Versuchen auch, dass die initiale Bindung zwischen DCs und Thrombozyten über PSGL-1 vermittelt wurde. PSGL-1, das unter anderem von dendritischen Zellen exprimiert wird, ist ein Glykoprotein und ein Ligand zur Bindung von P- und E-Selektin (Laszik et al., 1996). Thrombozyten exprimieren P-Selektin auf ihrer Zelloberfläche. Es ist ein Adhäsionsrezeptor für Leukozyten (Berger et al., 1998). Merten et al. (2000) beschrieben, dass die Expression von P-Selektin auf Thrombozyten einen Einfluss auf die Größe und Stabilität von Plättchenaggregaten hat. Die Forscher konnten zeigen, dass ein monoklonaler gegen P-Selektin gerichteter Antikörper eine bestehende Aggregation auflösen kann, sogar wenn dieser Antikörper bis zu fünf Minuten nach der Aktivierung verabreicht wurde. Auf diese Weise wurde signifikant die Größe der Aggregate vermindert und auch die Anzahl vorhandener Plättchenaggregate wurde verringert. Aufgrund dieser Hinweise besteht die Möglichkeit, dass auch die in dieser Arbeit induzierte Aggregation ebenfalls über die Bindung von P-Selektin an PSGL-1 initiiert bzw. stabilisiert wird. In der Tat konnte durch die Blockierung des PSGL-1 auf der Oberfläche der dendritischen Zellen die Aggregation signifikant inhibiert werden, sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten DCs. Auch die Geschwindigkeit mit der die Aggregate entstanden war deutlich beeinflusst durch die PSGL-1 Blockierung seitens der DCs. Maître et al. (2010) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie untersuchten wie bereits aggregierte Plättchen dendritische Zellen anlocken können unter leichten Fließkonditionen in einer Flusskammer. Die Forscher konnten zeigen, dass für den initialen Kontakt die Bindung von P-Selektin an PSGL-1 benötigt wurde, für die länger bestehende Bindung jedoch eine Interaktion vermittelt durch β -2-Integrine nötig war. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit nutzen die Forscher für ihre Versuche allerdings bereits mit Kollagen voraktivierte und bereits aggregierte Thrombozyten für ihre Versuche. Es ging nicht um die Initiierung einer Aggregation, sondern um die Interaktionen in einem bestehenden Thrombus. Weiterhin funktionierte die Interaktion nur bei voraktivierten, nicht bei ruhenden, nicht-aktivierten Plättchen.

Auffällig bei den Versuchen in der vorliegenden Arbeit zur Blockierung von sowohl CD18 als auch PSGL-1 war, dass nicht nur die spezifischen Antikörper einen inhibierenden Effekt zeigten, auch die als Kontrolle verwendeten Isotyp-Antikörper

hatten einen vergleichbaren Einfluss auf die Aggregation. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ebenfalls eine mögliche Beteiligung von Fc-Rezeptoren auf die Aggregation in Betracht gezogen.

4.2.5. Die Blockierung der Fc-Rezeptoren auf dendritischen Zellen führt zu einer verminderten Aggregation zwischen DCs und Thrombozyten

Fc-Rezeptoren sind Rezeptoren für Immunglobuline. Ihr Ligand ist der Fc-Teil von Antikörpern. Sie sind auf sehr vielen Zellen des Immunsystems exprimiert und stellen damit eine Schnittstelle zwischen der Spezifität einer adaptiven Immunantwort und der Effektorfunktion innater Immunantworten dar. Es gibt aktivierende und inhibierende Fc-Rezeptoren und häufig werden diese koexprimiert (Nimmerjahn et al., 2007). Um nun zu überprüfen, ob und inwiefern Fc-Rezeptoren an der Aggregation zwischen dendritischen Zellen und Thrombozyten beteiligt sind, wurden die DCs mit dem Fc-Rezeptor-blockierenden Immunglobulingemisch inkubiert, anschließend gewaschen und zusammen mit Thrombozyten im Aggregometer getestet. Diese Vorbehandlung der DCs führt in der Tat zu einer signifikant reduzierten Aggregation bei unstimulierten und auch bei stimulierten DCs. Die Geschwindigkeit der Aggregation ist nur leicht beeinflusst, aber bei Betrachtung der gesamten Aggregationskurve ist ein Abfall des Kurvenverlaufs ab einem Zeitpunkt von ca. 80 Sekunden sichtbar. Dies zeigt, dass Fc-Rezeptoren anscheinend bei der Aufrechterhaltung der Aggregation eine Rolle spielen.

Allerdings besteht die Frage, um welchen Typ Fc-Rezeptor es sich handelt. Dendritische Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Rezeptoren des Typs Fc γ , welcher Immunglobulin G bindet. Es existieren drei Subklassen der Fc γ -Rezeptoren: Fc γ R I (CD16), Fc γ R II (CD32) und Fc γ R III (CD64). Monozyten-abgeleitete DCs exprimieren konstitutiv Fc γ R II auf ihrer Oberfläche, wohingegen Fc γ R I und Fc γ R III nur gering exprimiert werden (Boruchov et al., 2005; Laborde et al., 2007). Von Fc γ R II gibt es zwei unterschiedlich wirkende Isoformen. Fc γ R IIa wirkt aktivierend auf DCs während Fc γ R IIb inhibierende Signale in die Zelle weiterleitet (Janeway, 5. Auflage,

Amirogena, 2002). Im Normalfall wird der aktivierende als auch der inhibierende Rezeptor koexprimiert. Die unterschiedliche Wirkung der beiden Rezeptoren liegt in der intrazellulären Signalweiterleitung begründet. Während der FcγR IIa intrazellulär eine ITAM (immunreceptor tyrosine-based activation motif)-Sequenz besitzt, besitzt der FcγR IIb intrazellulär eine ITIM (immunreceptor tyrosine-based inhibition motif)-Sequenz, deren Expression häufig mit Toleranz assoziiert wird (Liu et al., 2006). Liu et al. konnten zeigen, dass durch die Behandlung dendritischer Zellen mit unterschiedlichen Zytokinen die Expression der Subformen FcγR IIa und FcγR IIb moduliert werden kann. Wurden mature DCs mit IL-10 behandelt, so konnte eine gesteigerte mRNA-Expression von FcγR IIb festgestellt werden. Allerdings konnten sie diesen Effekt auf Proteinebene nicht nachweisen. Jedoch gab es ebenfalls Arbeiten innerhalb unserer Arbeitsgruppe, die eine gesteigerte FcγR IIb mRNA-Expression bei DCs, die während der Differenzierung mit IL-10 behandelt wurden, nachweisen konnten. Auch andere Veröffentlichungen weisen auf einen Zusammenhang tolerogener DCs und der Expression von FcγR IIb hin (Manicassamy et al., 2011). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit ebenfalls DCs verwendet, die durch IL-10-Behandlung während der Differenzierung tolerogen waren. Diese DCs induzierten eine im Vergleich zu den Kontrollen signifikant geringere Aggregation. Um auch den gegenteiligen Effekt zu untersuchen, wurden DCs während der Differenzierung mit IFN-γ behandelt. Die so entstandenen DCs weisen eine verminderte Expression des FcγR IIb auf, sowie eine erhöhte Expression des FcγR IIa und eine erhöhte Expression des FcγR I (Boruchov et al., 2005). Tatsächlich induzieren die so behandelten DCs eine signifikant erhöhte Aggregation. Anhand dieser Ergebnisse kann gesagt werden, dass die Expression des FcγR II einen Einfluss auf die Aggregation haben könnte, insbesondere die variable Expression der Subformen IIa und IIb scheint für die Aggregationsfähigkeit von Bedeutung zu sein.

Um nun genauer zu untersuchen, ob und inwiefern die Fcγ IIb-Rezeptoren an der Aggregation beteiligt sind, wurden die DCs mit einem Antikörper F(ab)-Fragment behandelt, das spezifisch den FcγR IIb bindet und so die Signalweiterleitung inhibiert. Diese Inkubation führte zu keiner Beeinflussung des Aggregationsverhaltens. Da keine verstärkte Aggregation induziert wurde, kann eine Signalweiterleitung durch den FcγR IIb als zu Grunde liegender Mechanismus ausgeschlossen werden. Um

auszuschließen, dass die Inhibition der Aggregation nach Inkubation mit dem FcR-blockierenden Immunglobulingemisch ausschließlich durch Fc γ R IIb vermittelt war, wurden die DCs zuerst mit dem Fc γ R IIb spezifischen Antikörper präinkubiert und anschließend mit dem FcR-blockierenden Immunglobulingemisch behandelt. Somit kann kein inhibierendes Signal, welches durch die allgemeine FcR-Blockierung entstanden sein könnte, in die Zelle weitergeleitet werden. Durch die kombinierte Blockierung mit beiden Reagenzien war eine Inhibition der Aggregation messbar. Der Verlauf der Messkurven war wieder, wie bereits nach der Blockierung aller Fc-Rezeptoren, beeinflusst und zeigte einen Rückgang der Aggregation nach 60 bis 80 Sekunden. Daher liegt es nahe, dass die Aufrechterhaltung der Aggregation über den Fc γ R IIa vermittelt wird.

Fc γ -Rezeptoren binden Immunglobuline vom Typ IgG. Bereits 1985 beschrieben Rosenfeld et al., dass Thrombozyten IgG-bindende Fc-Rezeptoren exprimieren (Rosenfeld et al., 1985). Im Blut befindliche Antikörper oder auch Antigen-Antikörperkomplexe, sogenannte Immunkomplexe, können an diese Fc γ -Rezeptoren binden, was zu einer Aktivierung der Plättchen führen kann und auch zu einer Aggregation (Plitnick et al., 2013). So wurde beispielsweise bei der Bevacizumab-Studie genau solch ein Effekt beschrieben. Der Antikörper, therapeutisch eingesetzt als Angiogenesehemmer zur Behandlung von Krebserkrankungen, ist ein monoklonaler IgG-Antikörper. In präklinischen Mausstudien zeigte dieser Antikörper keine Nebenwirkungen wie z.B. Thrombosen. Allerdings exprimieren murine Thrombozyten im Gegensatz zu humanen keinen Fc γ R IIa. Wurden die Experimente wiederholt mit Mäusen, die auf ihren Thrombozyten Fc γ -Rezeptoren trugen, so konnten die Forscher auch hier thrombotische Nebenwirkungen feststellen. Durch die Bildung von Immunkomplexen durch diesen Antikörper und die Bindung an Fc γ R IIa kam es zu einer Aktivierung der Thrombozyten (Meyer et al., 2009; Plitnick et al., 2013).

Es kann daher möglich sein, dass sich im Plasma Immunkomplexe bilden und dass sowohl dendritische Zellen als auch Thrombozyten diese binden können mittels ihrer Fc γ -Rezeptoren. Dem widerspricht allerdings die Tatsache, dass sowohl DCs als auch Thrombozyten allein, jedoch zusammen mit Plasma im Aggregometer gemessen, nicht aggregieren. Wären Immunkomplexe im Plasma vorhanden würden diese eine Aggregation hervorrufen. Auch Thrombozyten allein könnten durch diese

Immunkomplexe aktiviert werden, vermittelt durch die auf den Thrombozyten exprimierten FcγR IIa. Außerdem gäbe es in diesem Fall auch dramatische Folgen im physiologischen Geschehen. Bei einem gesunden Spender sollten keine solchen Immunkomplexe in größerer Zahl vorliegen.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die dendritischen Zellen an Immunglobuline binden, die sich auf der Zelloberfläche der Thrombozyten befinden. Solche Immunglobuline wurden bereits 1983 von Kelton et al. beschrieben. Die Forscher konnten zeigen, dass sich auch auf den Plättchen von gesunden Spendern IgG-Antikörper nachweisen lassen. Die Untersuchungen standen im Zusammenhang mit Studien der Idiopathischen thrombozytopenischen Purpura (ITP). Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung in deren Folge die Patienten an einem schweren Thrombozytenmangel leiden. Verursacht wird dies durch Autoantikörper, die beispielsweise an Glykoproteinrezeptoren auf den Thrombozyten binden können. Die Autoantikörper können zu einer Störung der Adhäsion und Aggregation führen, aber auch zur direkten Destruktion der Plättchen (Siegmund-Schultze, 2009; www.itp-information.de, 2015). In der zuvor genannten Studie von Kelton et al. wurde die Menge an gebundenen Antikörpern auf der Oberfläche von Thrombozyten sowohl von erkrankten als auch gesunden Spendern analysiert. Dabei konnten die Forscher zeigen, dass sich auch auf gewaschenen Plättchen gesunder Spender IgG-Antikörper befinden, wenn auch in geringer Anzahl, wobei eine Subpopulation der Blutplättchen sogar bis zu zehn Mal mehr IgG-Antikörper auf ihrer Oberfläche trugen als die übrigen Populationen (Kelton et al., 1982; Kelton et al., 1983). Es ist daher möglich, dass die im Rahmen dieser Dissertation gemessene Aggregation bis zu einem gewissen Grad auf dem Vorhandensein solcher Autoantikörper beruht. An Thrombozyten gebundene IgG – Antikörper könnten an den FcγR IIa auf DCs binden und so aktivierende Signale in die Zelle weiterleiten. Eine Bindung an FcγR IIb und eine dadurch vermittelte Weiterleitung inhibierender Signale in die Zelle konnte die Verwendung des spezifischen Antikörpers ausgeschlossen werden. Auch wenn sich nur geringe Mengen Autoantikörper auf der Oberfläche der verwendeten Plättchen befinden, könnte es sein, dass das Vorhandensein relativ hoher Mengen an DCs in den Versuchsansätzen zu einer Aggregation führt. Im physiologischen Geschehen - also im Blut gesunder Personen - gibt es nur eine relativ geringe Anzahl an dendritischen Zellen, so dass es daher vielleicht nicht zu einer spontanen Aggregation kommt. Dies

würde auch zu den anfänglich durchgeführten Aggregationsversuchen passen. In diesen Experimenten führte die Verwendung niedriger DC-Konzentrationen auch zu einer geringeren maximalen Aggregation. Allerdings muss bedacht werden, dass auch weitere Faktoren eine Rolle bei der induzierten Aggregation spielen müssen, da die Aggregation durch die Blockierung der Fc-Rezeptoren nicht vollständig inhibiert werden konnte.

Eine weitere Möglichkeit wie DCs und Thrombozyten miteinander aggregieren könnten, ist die indirekte Aktivierung der Fc-Rezeptoren. Dies wurde bereits für Thrombozyten und deren Fc γ R IIa gezeigt. Boylan et al (2008) konnten nachweisen, dass es einen Zusammenhang gibt zwischen der Ligandenbindung und Aktivierung von Integrinen und einer dadurch vermittelten Phosphorylierung und Aktivierung des Fc γ R IIa. In ihren Versuchen ließen die Forscher humane Thrombozyten an immobilisiertes Fibrinogen binden und konnten in der Folge feststellen, dass diese Bindung zu einer Phosphorylierung der ITAM-Sequenz des Fc γ R IIa führte. Wurde der Fc-Rezeptor mit einem spezifischen F(ab)-Fragment blockiert, so wurde die Bindung der Thrombozyten an das Fibrinogen inhibiert. Dies zeigt die indirekte Beteiligung des Fc-Rezeptors an der Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten. Ähnliche Effekte wurden bereits in Neutrophilen und Makrophagen gefunden und beschrieben. Mócsai et al. (2006) zeigten, dass für Integrin-vermittelte Signalgebungen in die Zelle (outside-in-signalling) Proteine benötigt werden, die ITAM-Sequenzen besitzen, wie dies beispielsweise bei Fc γ -Rezeptoren der Fall ist. Verwendeten die Forscher Neutrophile oder Makrophagen, die keinen Fc γ -Rezeptor trugen, so war die Integrin-vermittelte Signalweiterleitung gestört. Auch dies deutet auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Ligandenbindung durch Integrine und der Aktivierung des Fc γ -Rezeptors hin. Abram et al. (2007) beschrieben ebenfalls, dass Zell-adhäsionsmoleküle wie Integrine oder PSGL-1 zur Signalweiterleitung ITAM-Sequenz-tragende Moleküle wie Fc-Rezeptoren benötigen. Auch bei dendritischen Zellen wurde dieser Zusammenhang beschrieben (Gmyrek et al., 2013) und könnte bei der in dieser Arbeit gemessenen Aggregation zwischen DCs und Thrombozyten eine entscheidende Rolle spielen. So ist es möglich, dass DCs an Thrombozyten mittels Integrinen binden und für diese Adhäsion die Aktivierung der ITAM-tragenden Fc γ -Rezeptoren benötigt wird. Dies würde auch erklären, warum der Fc γ R IIb keine Rolle spielt bei der Aggregation, da dieser

Rezeptor - wie zuvor beschrieben - eine ITIM-Sequenz besitzt und keine ITAM-Sequenz. Weiterhin kann dieser Erklärungsansatz auch den zweiphasigen Verlauf der Aggregationskurven erklären. Werden die Fc-Rezeptoren blockiert, wie in Abbildung 36 und 41 dargestellt, so ist erst eine Aggregation messbar, allerdings fällt die Messkurve nach 60 bis 80 Sekunden stark ab und die Zellen disaggregieren. In diesem Fall würden die DCs zuerst mit Hilfe von Integrinen an die Thrombozyten binden, so dass eine Aggregation messbar wird. Kann dann aber durch die Blockierung der Fc-Rezeptoren diese Bindung nicht aufrecht erhalten werden, kommt es zu einer Disaggregation. Um dies zu belegen, müssten die oben genannten Integrine und weitere mit einem F(ab)-Fragmentantikörper blockiert werden, um zu bestimmen welches Oberflächenmolekül für die initiale Bindung verantwortlich ist. Weiterhin müsste untersucht werden, ob es durch die Aggregation zwischen DCs und Thrombozyten zu einer Phosphorylierung der ITAM-tragenden Fc γ -Rezeptoren der DCs kommt.

4.2.6. Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass dendritische Zellen mit Thrombozyten interagieren können und dass die Zellen- zusammen inkubiert - miteinander aggregieren können. Die DCs können also nicht nur zu bereits bestehenden thrombotischen Ereignissen oder arteriosklerotischen Läsionen hinzu gerufen werden, sondern sie können an der Entstehung eines Thrombus mitwirken. Die in dieser Arbeit induzierte Aggregation ist unabhängig von Tissue Factor, welcher von DCs exprimiert wird, und ebenfalls unabhängig von generiertem Thrombin. Auch die Beteiligung von ATP und ADP spielt nur eine geringe Rolle. Wie bereits in anderen Publikationen beschrieben, spielt auch in diesem Versuchsaufbau die Bindung über die Oberflächenmoleküle CD18 und PSGL-1 möglicherweise eine Rolle. Für eine bestätigende Untersuchung müssten die Versuche wiederholt werden, wobei ein F(ab)-Fragmentantikörper verwendet werden müsste. Durch die inhibierenden Effekte, die bei der Verwendung der Isotypkontroll-Antikörper und der vorherigen Inkubation mit dem Fc-Rezeptor blockierenden Immunglobulingemisch gemessen werden konnten, wurde eine mögliche Beteiligung von IgG und Fc-Rezeptoren deutlich. Durch darauf folgende Blockierungsversuche konnte eine Beteiligung der

Fc-Rezeptoren auf DCs an der Aggregation gezeigt werden. Diese Befunde, dass DCs an der Entstehung eines Aggregats beteiligt sein können, sind äußerst wichtig im Hinblick auf die Entstehung arteriosklerotischer Plaques und Thrombosen. Bisher wurde nur sehr wenig über die Rolle von dendritischen Zellen in diesem Kontext veröffentlicht, diese sollte aber unbedingt berücksichtigt werden. Gerade auch im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapeutika ist es wichtig die Funktionen und Interaktionsmöglichkeiten dendritischer Zellen mit Thrombozyten zu kennen.

Zusammenfassung

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist ein wichtiger Faktor bei inflammatorischen Prozessen. Gerade auch bei kardiovaskulären Erkrankungen spielt die Generierung von ROS eine sehr große Rolle. Im Hinblick darauf sollte im ersten Teil dieser Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss die Stimulierung mit dem Phorbol-12-myristat-13-acetat (PDBu) und die daraus folgende Aktivierung der NADPH-Oxidase auf murine Knochenmarksabgeleitete dendritische Zellen (BM-DCs) hat.

Die Stimulation von BM-DCs mit PDBu führte zu einer sehr starken Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Diese ROS-Produktion ist bereits nach 15 Minuten messbar und hält mindestens bis zu zwei Stunden an. Zeitgleich kann eine im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte Expression des Oberflächenmoleküls MHCII festgestellt werden. Dagegen führte die Stimulation von BM-DCs mit LPS, welche als Kontrolle diente, zu keiner verstärkten ROS-Produktion, und auch die Expression von MHCII war nach 2 Stunden nicht erhöht. Nach 24-stündiger Inkubation der BM-DCs mit PDBu wiesen die Zellen einen muren Phänotyp auf, charakterisiert durch die erhöhte Expression der Moleküle CD86 und MHCII. Diese Maturierung war allerdings nicht ganz so stark ausgeprägt wie nach LPS-Stimulation. Ähnlich verhielt es sich mit dem T-Zellstimulatorischen Potential der BM-DCs. Die Stimulierung von BM-DCs mit PDBu induzierte ein starkes T-Zellstimulatorisches Potential, allerdings zeigten die mit LPS stimulierten BM-DCs eine noch stärkere T-Zellstimulatorische Kapazität. Durch die Stimulierung von BM-DCs mit dem Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) konnten die zuvor mit PDBu erhaltenen Ergebnisse validiert werden. Die Vorbehandlung der BM-DCs mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin hatte keinen Einfluss auf die PDBu-stimulierte ROS-Produktion der DCs, allerdings war die MHCII-Expression nach zwei Stunden geringer als nach alleiniger PDBu-Stimulation. Auf die Maturierung 24 Stunden nach Stimulation hatte die Apocynin-Behandlung keinen Einfluss. Im Gegensatz dazu war die T-Zellstimulatorische Kapazität der mit Apocynin vorbehandelten und mit PDBu stimulierten BM-DCs geringer als die der nur mit PDBu behandelten DCs. Wurden die BM-DCs vor der Stimulierung mit PDBu mit dem PKC-Inhibitor Chelerythrin behandelt, so zeigten die Zellen nach zwei Stunden eine verringerte ROS-Produktion und eine sehr niedrige MHCII-Expression. Nach 24-stündiger Inkubation wiesen die mit Chelerythrin vorbehandelten BM-DCs einen immaturen Phänotyp auf, der

charakterisiert war durch eine sehr niedrige Expressionsdichte von CD86 und MHCII. Durch die Verwendung von BM-DCs, die eine nicht funktionale Untereinheit der NADPH-Oxidase besitzen (gp91^{phox}^{-/-}), konnte eine leicht verminderte ROS-Produktion detektiert werden. Allerdings hatte der Knockout der gp91^{phox}-Untereinheit keinen weiteren Einfluss auf die BM-DCs. Weder die Expression von MHCII nach bis zu zwei Stunden, noch die Maturierung oder die T-Zellstimulatorische Kapazität 24 Stunden nach Stimulation der BM-DCs war beeinflusst worden. Diese Ergebnisse zusammengefasst legen den Schluss nahe, dass die Maturierung von BM-DCs unabhängig von intrazellulär gebildeten ROS ist. Die durch die Stimulation mit PDBu gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies werden nicht nur durch die NADPH-Oxidase generiert. Die Inaktivierung der NADPH-Oxidase hat keinen Einfluss auf den Phänotyp oder die Funktionalität der BM-DCs.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Interaktionen zwischen humanen Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen und Thrombozyten untersucht. Die Analysen erfolgten mittels Aggregometrie. Die durchgeführten Versuche zeigten, dass DCs mit Thrombozyten aggregieren können. Es konnte gezeigt werden, dass DCs in der Lage sind Tissue Factor zu exprimieren und Thrombin zu generieren. Allerdings war die Aggregation sowohl unabhängig von Tissue Factor als auch von Thrombin. Die Anwesenheit von ADP und ATP hatte einen geringen Einfluss auf die Aggregation. Eine Beteiligung von CD18 und PSGL-1 an der Aggregation konnte durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern nicht zweifelsfrei gezeigt werden, da auch die Isotypkontrollantikörper in vergleichbarem Maße inhibitorisch wirkten. Durch Blockierungsversuche konnte eine Beteiligung der Fc-Rezeptoren auf DCs an der Aggregation nachgewiesen werden. Dabei war es möglich eine Signalwirkung des FcγR IIb auszuschließen. Die erhobenen Befunde einer direkten Beteiligung von DCs an der Entstehung eines Thrombozytenaggregats sind wichtig für das Verständnis der Entstehung arteriosklerotischer Plaques und Thrombosen.

Abstract

The generation of reactive oxygen species (ROS) is an important factor during inflammatory processes. Especially in cardiovascular diseases formation of reactive oxygen species plays a fundamental role. The first part of the present work aimed to investigate which kind of influences the stimulation with the phorbol ester PDBu and the following activation of the NADPH oxidase had on murine bone marrow-derived dendritic cells (BM-DCs).

The stimulation of BM-DCs with PDBu led to a very strong production of ROS. This ROS formation was detectable as early as 15 minutes and lasted up to at least two hours. At the same time an increased expression of the surface molecule MHCII could be detected compared with the control group. Stimulation of BM-DCs with LPS as a control did not induce increased ROS formation and did not influence the expression of MHCII after short time periods. Twenty-four hours after stimulation with PDBu, BM-DCs exhibited a mature phenotype, characterized by an increased expression of CD86 and MHCII molecules. However the maturation induced by LPS treatment was stronger. Correspondent results could be detected regarding the T cell stimulatory capacity of the BM-DCs. Stimulation of BM-DCs with PDBu induced a high T cell proliferation inducing potential; however, LPS stimulated BM-DCs exhibited an even higher T cell stimulatory capacity. By stimulation of BM-DCs with another phorbol ester - PMA - the previous results obtained with PDBu could be validated. Pre-treatment of BM-DCs with the NADPH oxidase inhibitor Apocynin had no effect on PDBu-induced ROS production; however, MHCII expression after two hours was decreased compared with PDBu stimulation alone. The maturation 24 hours after stimulation was not affected by Apocynin. In contrast, the T cell stimulatory capacity of BM-DCs pre-treated with Apocynin was reduced compared with PDBu treatment alone. Treatment of BM-DCs with Chelerythrin before PDBu stimulation resulted in reduced ROS formation and strongly decreased MHCII expression after short time periods. Twenty-four hours after stimulation the Chelerythrin pre-treated BM-DCs exhibited an immature phenotype, characterized by very low amounts of CD86 and MHCII on the cell surface. Using BM-DCs from mice lacking a functional subunit of the NADPH oxidase (gp91^{phox}^{-/-}), a slight decrease of ROS formation after short time intervals could be detected. Nevertheless, the knockout of the gp91^{phox} subunit had no further influence on the BM-DCs. Neither the

expression of MHCII up to two hours nor the maturation or T cell stimulatory capacity 24 hours after BM-DC stimulation was affected. These results suggest the conclusion that the maturation of BM-DCs was independent from intracellularly produced ROS. Reactive oxygen species generated after PDBu stimulation are not exclusively produced by NADPH oxidase. Inactivation of NADPH oxidase does not have an influence on phenotype or function of BM-DCs.

In the second part of the present work the interactions between human monocyte-derived dendritic cells and human thrombocytes were investigated. The analyses were conducted by aggregometry. The experiments showed that DCs can aggregate with thrombocytes. It could be shown, that DCs express tissue factor on the cell surface and generate thrombin. However, aggregation was independent of tissue factor as well as thrombin. Presence of ADP or ATP only slightly influenced aggregation. By using specific antibodies a participation of CD18 and PSGL-1 could not be shown without a doubt, because isotype control antibodies affected the aggregation in a comparably inhibitory manner. Blocking experiments proved the participation of Fc receptors on DCs in the aggregation process. Thereby signalling via FcγR IIb could be excluded. The obtained results of a direct involvement of DCs in the formation of a thrombocytes aggregate are important for the understanding of the development of atherosclerotic plaques and thromboses.

Literaturverzeichnis

- Abram, C.L.** and Lowell, C.A. 2007. The expanding role for ITAM-based signalling pathways in immune cells. *Sci STKE*. **2007(377)**:re2.
- Amigorena, S.** 2002. Fcγ Receptors and Cross-Presentation in Dendritic Cells. *J Exp Med*. **195(1)**:F1-3.
- Ammirati, E.**, Moroni, F., Magnoni, M. and Camici, P.G. 2015. The role of T and B cells in human atherosclerosis and atherothrombosis. *Clin Exp Immunol*. **179(2)**:173-87.
- Ardavín, C.** 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. **3(7)**:582-90.
- Balce, D.R.** and Yates, R.M. 2013. Redox-sensitive probes for the measurement of redox chemistries within phagosomes of macrophages and dendritic cells. *Redox Biology*. **1**:467-473.
- Banchereau, J.** and Steinman, R.M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. **392**:245-252.
- Banerjee, E.R.** and Henderson, W.R. Jr. 2012. Defining the molecular role of gp91phox in the immune manifestation of acute allergic asthma using a preclinical murine model. *Clin Mol Allergy*. **10(1)**:2.
- Barczyk, M.**, Carracedo, S. and Gullberg, D. 2010. Integrins. *Cell Tissue Res*. **339(1)**:269-80.
- Baroni, M.**, Pizzirani, C., Pinotti, M., Ferrari, D., Adinolfi, E., Calzavarini, S., Caruso, P., Bernardi, F. and Di Virgilio, F. 2007. Stimulation of P2 (P2X₇) receptors in human dendritic cells induces the release of tissue factor-bearing microparticles. *FASEB J*. **21**:1926-1933.
- Bassenge, E.**, Schneider, H.T. and Daiber, A. 2005. Oxidative stress and cardiovascular diseases. *Dtsch Med Wochenschr*. **130(50)**:2904-9.
- Begonja, A.J.**, Gambaryan, S., Geiger, J., Aktas, B., Pozgajova, M., Nieswandt, B. and Walter, U. 2005. Platelet NAD(P)H-oxidase-generated ROS production regulates αIIbβ3-integrin activation independent of the NO/cGMP pathway. *Blood*. **106(8)**:2757-60.
- Behrends, J.C.**, Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., Pedain, C., Rettig, J., Wagner, C. and Wischmeyer, E. 2010. Physiologie. *Georg Thieme Verlag KG*.
- Berger, G.**, Hartwell, D.W. and Wagner, D.D. 1998. P-Selectin and Platelet Clearance. *Blood*. **92(11)**.

- Böcker, W.**, Denk, H., Heitz, P.U. and Moch, H. 2008. Repetitorium Pathologie. Elsevier, Urban & Fischer Verlag.
- Born, G.V.R.** 1962. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. **194**:927-9.
- Born, G.V.** and Foulks, J.G. 1977. Inhibition by a stable analogue of adenosine triphosphate of platelet aggregation by adenosine diphosphate. *Br J Pharmacol*. **61(1)**:87-9.
- Boruchov, A.M.**, Heller, G., Veri, M.C., Bonvini, E., Ravetch, J.V. and Young, J.W. 2005. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J Clin Invest*. **115(10)**:2914-23.
- Boylan, B.**, Gao, C., Rathore, V., Gill, J.C., Newman, D.K. and Newman, P.J. 2008. Identification of FcγRIIa as the ITAM-bearing receptor mediating αIIbβ3 outside-in integrin signalling in human platelets. *Blood*. **112**:2780-2786.
- Broussas, M.**, Cornillet-Lefebvre, P., Bernard, J., Adjizian, J-C., Potron, G. and Nguyễn, P. 2000. Separation of dendritic cells from highly purified human monocytes by counterflow centrifugation induces tissue factor expression. *Transfusion*. **40**:1088-1094.
- Buckner, J.H.** and Ziegler, S.F. 2004. Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery. *Arthritis Res Ther*. **6(5)**:215-22.
- Bundesministerium für Bildung und Forschung**, 2014.
<http://www.bmbf.de/de/1135.php>
- Buono, C.** And Lichtman, A.H. 2004. Co-stimulation and plaque-antigen-specific T-cell responses in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. **14(4)**:166-72.
- Celletti, F.L.**, Waugh, J.M., Amabile, P.G., Brendolan, A., Hilfiker, P.R. and Dake, M.D. 2001. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med*. **7(4)**:425-9.
- Chandraratne, S.** 2012. Rolle der Neutrophil Extracellular Traps (NETs) bei der Entstehung der venösen Thrombose. *Dissertation*.
- Chen, Y.** and Junger, W.G. 2012. Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods Mol Biol*. **844**:115-24.
- Chmura, S.J.**, Dolan, M.E., Cha, A., Mauceri, H.J., Kufe, D.W. and Weichselbaum, R.R. 2000. In vitro and in vivo activity of protein kinase C inhibitor chelerythrine chloride induces tumor cell toxicity and growth delay in vivo. *Clin Cancer Res*. **6(2)**:737-42.
- Christ, A.** 2013. Dendritic cells in hyperlipidemia-associated atherosclerosis. *Dissertation*

Clemens, M.J., Trayner, I. and Menaya, J. 1992. The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation. *J Cell Sci.* **103(Pt 4)**:881-7.

Diagnosia, 2015: <http://www.diagnosia.com/de/medikament/fragmin#patient>

DocCheck Flexikon, 2015. Hämostase.
<http://flexikon.doccheck.com/de/H%C3%A4mostase>

Doerner, D., Abdel-Latif, M., Rogers, T.B. and Alger, B.E. 1990. Protein Kinase C-dependent and -Independent Effects of Phorbol Esters on Hippocampal Calcium Channel Current. *J Neurosci.* **10(5)**:1699-706.

Domínguez, P.M. and Ardavín, C. 2010. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol Rev.* **234(1)**:90-104.

Elzey, B.D., Tian, J., Jensen, R.J., Swanson, A.K., Lees, J.R., Lentz, S.R., Stein, C.S., Nieswandt, B., Wang, Y., Davidson, B.L. and Ratliff, T.L. 2003. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity.* **19(1)**:9-19.

Esmon, C.T. 2009. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Rev.* **23(5)**:225-9.

Forman, H.J. and Torres M. 2001. Redox signalling in macrophages. *Mol Aspects Med.* **22(4-5)**:189-216.

Fries, P.N. and Griebel, P.J. 2011. Mucosal dendritic cell diversity in the gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.* **343**:33-41.

Gader, A.G.M.A. 2009. Tissue Factor Pathway Inhibitor[Tfpi]: A Natural Coagulation Inhibitor and Potent Therapeutic Agent - A Review. *Journal of Taibah University Medical Sciences.* **4(1)**:1-15.

Ganguly, D., Haak, S., Sisirak, V. and Reizis, B. 2013. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* **13(8)**:566-77.

Gautier, E.L., Huby, T., Saint-Charles, F., Ouzilleau, B., Pirault, J., Deswaerte, V., Ginhoux, F., Miller, E.R., Witztum, J.L., Chapman, M.J. and Lesnik, P. 2009. Conventional dendritic cells at the crossroads between immunity and cholesterol homeostasis in atherosclerosis. *Circulation.* **119(17)**:2367-75.

Gemmingen-Guttenberg, D.S. 2013. Theorien zur Pathogenese der Arteriosklerose. *Dissertation*

Gisch, K., Gehrke, N., Bros, M., Priesmeyer, C., Knop, J., Reske-Kunz, A.B. and Sudowe, S. 2007. Formalin-Fixed *Staphylococcus aureus* Particles Prevent Allergic

Sensitization in a Murine Model of Type I Allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* **144**:183-196.

Gmyrek, G.B., Akilesh, H.M., Graham, D.B., Fuchs, A., Yang, L., Miller, M.J., Sandoval, G.J., Sheehan, K.C., Schreiber, R.D., Diamond, M.S. and Swat, W. 2013. Loss of DAP12 and FcR γ drives exaggerated IL-12 production and CD8(+) T cell response by CCR2(+) Mo-DCs. *PLoS One.* **8(10)**:e76145.

Goldstein, J.L. and Brown, M.S. 1977. Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism.* **26(11)**:1257-75.

Görlach, A., Brandes, R.P., Nguyen, K., Amidi, M., Dehghani, F. and Busse, R. 2000. A gp91phox Containing NADPH Oxidase Selectively Expressed in Endothelial Cells Is a Major Source of Oxygen Radical Generation in the Arterial Wall. *Circ Res.* **87**:26-32.

De Gruyter, W. 2003. Pschyrembel® Wörterbuch Pflege. *Walter de Gruyter GmbH.*

Guilliams, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H. and Lambrecht, B.N. 2014. The function of Fc γ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol.* **14(2)**:94-108.

Hackett, C.T., Ramanathan, R.S., Malhotra, K., Quigley, M.R., Kelly, K.M., Tian, M., Protetch, J., Wong, C., Wright, D.G. and Tayal, A.H. 2015. Safety of venous thromboembolism prophylaxis with fondaparinux in ischemic stroke. *Thromb Res.* **135(2)**:249-54.

Hagihara, M., Higuchi, A., Tamura, N., Ueda, Y., Hirabayashi, K., Ikeda, Y., Kato, S., Sakamoto, S., Hotta, T., Handa, S. and Goto, S. 2004. Platelets, after exposure to a high shear stress, induce IL-10-producing, mature dendritic cells in vitro. *J Immunol.* **172**:5297-5303.

Hamzeh-Cognasse, H., Cognasse, F., Palle, S., Chavarin, P., Olivier, T., Delézay, O., Pozzetto, B. and Garraud, O. 2008. Direct contact of platelets and their released products exert different effects on human dendritic cell maturation. *BMC Immunol.* **9**:54.

Han, W., Li, H., Cai, J., Gleaves, L.A., Polosukhin, V.V., Segal, B.H., Yull, F.E. and Blackwell, T.S. 2013. NADPH oxidase limits lipopolysaccharide-induced lung inflammation and injury in mice through reduction-oxidation regulation of NF- κ B activity. *J Immunol.* **190(9)**:4786-94.

Harris, E.S., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. and Zimmerman, G.A. 2000. The leukocyte integrins. *J Biol Chem.* **275(31)**:23409-12.

Harris, E.S., Smith, T.L., Springett, G.M., Weyrich, A.S. and Zimmerman, G.A. 2012. Leukocyte Adhesion Deficiency-I variant Syndrome (LAD-Iv, LAD-III): Molecular Characterization of the Defect in an Index Family. *Am J Hematol.* **87(3)**:311-313.

- Hartl, P.**, Brücke, P., Diestl, E. and Vinazzer, H. 1990. Prophylaxis of thromboembolism in general surgery: comparison between standard heparin and Fragmin. *Thromb Res.* **57(4)**:577-84.
- Heine, H.** 2007. Lehrbuch der biologischen Medizin. *Hippokrates Verlag*.
- Hemker, H.C.**, Giesen, P., Al Dieri, R., Regnault, V., de Smedt, E., Wagenvoort, R., Lecompte, T. and Béguin, S. 2003. Calibrated automated thrombin Generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* **33(1)**:4-15.
- Henning, K.** 2012. Entwicklung einer erweiterten Diagnostik von Thrombozytopenien und Thrombozytopathien mittels Multi-Farben-Durchflusszytometrie. *Dissertation*.
- Heumüller, S.**, Wind, S., Barbosa-Sicard, E., Schmidt, H.H., Busse, R., Schröder, K. and Brandes R.P. 2008. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension.* **51(2)**:211-7.
- Hilf, N.**, Singh-Jasuja, H., Schwarzmaier, P., Gouttefangeas, C., Rammensee, H.G. and Schild, H. 2002. Human platelets express heat shock protein receptors and regulate dendritic cell maturation. *Blood.* **99(10)**:3676-82.
- Hopp, A.K.**, Rupp, A. and Lukacs-Kornek, V. 2014. Self-antigen presentation by dendritic cells in autoimmunity. *Front Immunol.* **5**:55.
- Hrkach, J.**, Von Hoff, D., Ali, M.M., Andrianova, E., Auer, J., Campbell, T., De Witt, D., Figa, M., Figueiredo, M., Horhota, A., Low, S., McDonnell, K., Peeke, K., Retnarajan, B., Sabnis, A., Schnipper, E., Song, J.J., Song, Y.H., Summa, J., Tompsett, D., Troiano, G., Van Geen Hoven, T., Wright, J., LoRusso, P., Kantoff, P.W., Bander, N.H., Sweeney, N.H., Farokhzad, O.C., Langer, R and Zale, S. 2012. Preclinical Development and Clinical Translation of a PSMA-Targeted Docetaxel Nanoparticle with a Differentiated Pharmacological Profile. *Sci Transl Med.* **4(128)**:128-39.
- Hubo, M.** and Jonuleit, H. 2012. Plasmacytoid dendritic cells are inefficient in activation of human regulatory T cells. *PLoS One.* **7(8)**:e44056.
- Hubo, M.**, Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tuettenberg, A., Steinbrink, K. and Jonuleit, H. 2013. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol.* **4**:82.
- ITP-Information**, 2015. <http://www.itp-information.de/einleitung/pathogenese.html>
- Jacobs, B.**, Wuttke, M., Papewalis, C., Seissler, J. and Schott, M. 2008. Dendritic Cell Subtypes and *In Vitro* Generation of Dendritic Cells. *Horm Metab Res.* **40**:99-107.
- Janeway, C.A.**, Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. 2002. Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH.* **5. Auflage.**

- Jonuleit, H.**, Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. and Enk, A.H. 2000. Induction of Interleukin 10-producing, nonproliferating CD4+ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med.* **192**:1213-1222.
- Jørgensen, P.S.**, Knudsen, J.B., Broeng, L., Josephsen, L., Bjerregaard, P., Hagen, K., Jørgensen, P.K. and Tørholm, C. 1992. The thromboprophylactic effect of a low-molecular-weight heparin (Fragmin) in hip fracture surgery. A placebo-controlled study. *Clin Orthop Relat Res.* **(278)**:95-100.
- Jung, O.**, Schreiber, J.G., Geiger, H., Pedrazzini, T., Busse, R. and Brandes, R.P. 2004. Gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation.* **109(14)**:1795-801.
- Jurk, K.** and Kehrel, B.E. 2005. Die zentrale Rolle der Thrombozyten im neuen Verständnis der Hämostase. *Hämostaseologie.* **25**:39-49.
- Kelton, J.G.** and Denomme, G. 1982. The Quantitation of Platelet-Associated IgG on Cohorts of Platelets Separated From Healthy Individuals by Buoyant Density Centrifugation. *Blood.* **60(1)**:136-139
- Kelton, J.G.** and Steeves, K. 1983. The Amount of Platelet-Bound Albumin Parallels the Amount of IgG on Washed Platelets From Patients With Immune Thrombocytopenia. *Blood.* **62(4)**:924-927.
- Kemkes-Matthes, B.** and Oehler, G. 2001. Blutgerinnung und Thrombose. *Georg Thieme Verlag KG.*
- Kim, Y-W.** and Byzova, T.V. 2014. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood.* **123(5)**:625-631.
- Koltsova, E.K.** and Ley, K. 2011. How dendritic cells shape atherosclerosis. *Trends in Immunology.* **32(11)**:540-547.
- Kumar, S.**, Deepak, P., Kumar, S., Gautam, P.K. and Acharya, A. 2013. A benzophenanthridine alkaloid, chelerythrine induces apoptosis in vitro in a Dalton's lymphoma. *J Cancer Res Ther.* **9(4)**:693-700.
- Kumar, S.** and Acharya, A. 2014. Chelerythrine induces reactive oxygen species-dependent mitochondrial apoptotic pathway in a murine T cell lymphoma. *Tumour Biol.* **35(1)**:129-40.
- Kushwah, R.** and Hu, J. 2011. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology.* **133(4)**:409-19.
- Laborde, E.A.**, Vanzulli, S., Beigier-Bompadre, M., Isturiz, M.A., Ruggiero, R.A., Fourcade, M.G., Catalan Pellet, A.C., Sozzani, S. and Vulcano, M. 2007. Immune complexes inhibit differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* **179(1)**:673-81.

- Langer, H.F.**, Daub, K., Braun, G., Schönberger, T., May, A.E., Schaller, M., Stein, G.M., Stellos, K., Bueltmann, A., Siegel-Axel, D., Wendel, H.P., Aebert, H., Roecken, M., Seizer, P., Santoso, S., Wesselborg, S., Brossart, P. and Gawaz M. 2007. Platelets Recruit Human Dendritic Cells Via Mac-1/JAM-C Interaction and Modulate Dendritic Cell Function In Vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **27**:1463-1470.
- Laszik, Z.**, Jansen, P.J., Cummings, R.D., Tedder, T.F., McEver, R.P. and Moore, K.L. 1996. P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Is Broadly Expressed in Cells of Myeloid, Lymphoid, and Dendritic Lineage and in some Nonhematopoietic Cells. *Blood.* **88(8)**:3010-3021
- Laurent, M.**, Joimel, U., Varin, R., Cazin, L., Gest, C., Le-Cam-Duchez, V., Jin, J., Liu, J., Vannier, J.P., Lu, H., Soria, J., Li, H. and Soria, C. 2014. Comparative study of the effect of rivaroxaban and fondaparinux on monocyte's coagulant activity and cytokine release. *Exp Hematol Oncol.* **3(1)**:30.
- Lazarus, A.H.** 2010. IVIg conducts DC-platelet nuptials. *Blood.* **116(23)**.
- Lemmer, B.** and Brune, K. 2010. Pharmakotherapie - Klinische Pharmakologie. *Springer-Verlag*.
- Li, X.**, Syrovets, T., Paskas, S., Laumonnier, Y. and Simmet, T. 2008. Mature dendritic cells express functional thrombin receptors triggering chemotaxis and CCL18/pulmonary and activation-regulated chemokine induction. *J Immunol.* **181(2)**:1215-23.
- Liadski, S.** 2003. Tiefe Beinvenenthrombose - Unterschiedliche Therapiekonzepte. *Dissertation*.
- Ling, D.**, Park, W., Park, S.J., Lu, Y., Kim, K.S., Hackett, M.J., Kim, B.H., Yim, H., Jeon, Y.S., Na, K. and Hyeon, T. 2014. Multifunctional tumor pH-sensitive self-assembled nanoparticles for bimodal imaging and treatment of resistant heterogeneous tumors. *J Am Chem Soc.* **136(15)**:5647-55.
- Lintermans, L.L.**, Stegeman, C.A., Heeringa, P. and Abdulahad, W.H. 2014. T cells in vascular inflammatory diseases. *Front Immunol.* **5**:504.
- Liu, K.** and Nussenzweig, M.C. 2010. Origin and Development of dendritic cells. *Immun Rev.* **234**:45-54.
- Liu, Y.**, Gao, X., Masuda, E., Redecha, P.B., Blank, M.C. and Pricop, L. 2006. Regulated Expression of FcγR in Human Dendritic Cells Controls Cross-Presentation of Antigen-Antibody Complexes. *J Immunol.* **177**:8440-8447.
- Lutz, M.B.** and Schuler, G. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?. *Trends Immunol.* **23(9)**:445-9.
- Lwaleed, B.A.** and Bass, P.S. 2006. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol.* **208(3)**:327-339.

- Lyon, M.E.**, Fine, J.S., Henderson, P.J. and Lyon, A.W. 1995. D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone (PPACK): alternative anticoagulant to heparin salts for blood gas and electrolyte specimens. *Clin Chem.* **41(7)**:1038-41.
- Lyon, M.E.**, Drobot, D.W., Harding, S.R. and Lyon, A.W. 1999. Evaluation of the thrombin inhibitor D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethylketone (PPACK) with the factor Xa inhibitor 1,5-dansyl-L-glutamyl-L-glycyl-L-arginine chloromethylketone (GGACK) as anticoagulants for critical care clinical chemistry specimens. *Clin Chim Acta.* **280(1-2)**:91-9.
- Maître, B.**, Mangin, P.H., Eckly, A., Heim, V., Cazenave, J.P., Lanza, F., Hanau, D. and Gachet, C. 2010. Immature myeloid dendritic cells capture and remove activated platelets from preformed aggregates. *J Thromb Haemost.* **8(10)**:2262-72.
- Manicassamy, S.** and Pulendran, B. 2011. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol Rev.* **241(1)**:206-227.
- Manthey, H.D.** and Zerneck, A. 2011. Dendritic cells in atherosclerosis: Functions in immune regulation and beyond. *Thromb Haemost.* **106**:772-778.
- Martinson, J.**, Bae, J., Klingemann, H.G. and Tam, Y. 2004. Activated platelets rapidly up-regulate CD40L expression and can effectively mature and activate autologous ex vivo differentiated DC. *Cytotherapy.* **6(5)**:487-97.
- Matsue, H.**, Edelbaum, D., Shalhevet, D., Mizumoto, N., Yang, C., Mummert, M.E., Oeda, J., Masayasu, H. and Takashima, A. 2003. Generation and Function of Reactive Oxygen Species in Dendritic Cells during Antigen Presentation. *J Immunol.* **171**:3010-3018.
- Matsuda, M.** and Shimomura, I. 2013. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes Res Clin Pract.* **7(5)**:e330-41.
- Medvetz, D.**, Sun, Y., Li, C., Khabibullin, D., Balan, M., Priolo, C., Asara, J.M., Pal, S., Yu, J. and Henske, E.P. 2015. High-throughput drug screen identifies Chelerythrin as a selective inducer of death in a TSC2-null setting. *Mol Cancer Res.* **13(1)**:50-62.
- Mehrke, G.** 2012. Hämostase - Blutgerinnung.
<http://www.mehrke.de/Vorlesungen/Physiologie/Blutgerinnung.pdf>
- Merten, M.** and Thiagarajan, P. 2000. P-Selectin Expression on Platelets Determines Size and Stability of Platelet Aggregates. *Circulation.* **102**:1931-1936.
- Metzner, J.** 2006. Untersuchung der Wirkung von Cyclooxygenase-Inhibitoren auf die Entstehung der Arteriosklerose. *Dissertation.*
- Meyer, T.**, Robles-Carrillo, L., Robson, T., Langer, F., Desai, M., Davila, M., Francis, J.L. and Amirkhosravi, A. 2009. Bevacizumab immune complexes activate platelets and induce thrombosis in FCGR2A transgenic mice. *J Thromb Haemost.* **7(1)**:171-81.

- Mócsai, A.**, Abram, C.L., Jakus, Z., Hu, Y., Lanier, L.L. and Lowell, C.A. 2006. Integrin signalling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol.* **7(12)**:1326-33.
- Moeckel, D.**, Jeong, S.S., Sun, X., Broekman, M.J., Nguyen, A., Drosopoulos, J.H.F., Marcus, A.J., Robson, S.C., Chen, R. and Abendschein, D. 2014. Optimizing human apyrase to treat arterial thrombosis and limit reperfusion injury without increased bleeding risk. *Sci Transl Med.* **6(248)**:248ra105.
- Nam, S.J.**, Oh, I.S., Yoon, Y.H., Kwon, B.I., Kang, W., Kim, H.J., Nahm, S.H., Choi, Y.H., Lee, S.H., Racanelli, V. and Shin, E.C. 2014. Apocynin regulates cytokine production of CD8+ T cells. *Clin Exp Med.* **14(3)**:261-8.
- Nee, J.** 2009. Arterioskleroserisiko und Thrombozytenfunktion bei Patienten mit Phenylketonurie (PKU). *Dissertation*.
- Neumann, H.A.** 2008. Das Gerinnungssystem. *ABW Wissenschaftsverlag GmbH*.
- Nimitvilai, S.**, Arora, S., You, C., McElvain, M. and Brodie, M.S. 2013. Phorbol ester reduces ethanol excitation of dopaminergic neurons of the ventral tegmental area: involvement of protein kinase C theta. *Front Integr Neurosci.* **7**:96
- Ngo, C.V.**, Picha, K., McCabe, F., Millar, H., Tawadros, R., Tam, S.H., Nakada, M.T. and Anderson, G.M. 2007. CNTO 859, a humanized anti-tissue factor monoclonal antibody, is a potent inhibitor of breast cancer metastasis and tumor growth in xenograft models. *Int J Cancer.* **120**:1261-1267.
- Nimmerjahn, F.** and Ravetch, J.V. 2007. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol.* **96**:179-204.
- Novak, N.** and Bieber, T. 2008. Dendritic cells as regulators of immunity and tolerance. *J Allergy Clin Immunol.* **121**:S370-S374.
- Oury, C.**, Toth-Zsamboki, E., Vermynen, J. and Hoylaerts, M.F. 2006. The platelet ATP and ADP receptors. *Curr Pharm Des.* **12(7)**:859-75.
- Paulson, K.E.**, Zhu, S.N., Nurmohamed, S., Jongstra-Bilen, J. and Cybulsky, M.I. 2010. Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis. *Circ Res.* **106(2)**:383-90.
- Pfizermed**, 2015. <https://www.pfizermed.de/medikamente/medikamente-a-bis-z/fragminr-p-p-forde.htm>
- Phaniendra, A.**, Jestadi, D.B. and Periyasamy, L. 2015. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* **30(1)**:11-26.
- Pirillo, A.**, Norata, G.D. and Catapano, A.L. 2013. LOX-1, OxLDL, and Atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* **2013**:152786.

- Platzbecker, U.**, Ward, J.L. and Deeg, H.J. 2003. Chelerythrin activates caspase-8, downregulates FLIP long and short, and overcomes resistance to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in KG1a cells. *Br J Haematol.* **122(3)**:489-97.
- Plitnick, L.M.** and Herzyk, D.J. 2013. Nonclinical Development of Novel Biologics. *Elsevier Inc.* **Pp84**.
- Praetorius, N.P.** and Mandal, T.K. 2007. Engineered nanoparticles in cancer therapy. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* **1(1)**:37-51.
- Rechtsmedizin, Uni Bonn**, 2015. Der Einfluss von Sauerstoffradikalen bei der Arteriosklerose. http://www.rechtsmedizin.uni-bonn.de/studium/lebensmittelchemie_chemie_pharmazie/dateien_ws/ros.pdf.
- Rehman, A.**, Dugic, E., Benham, C., Lione, L. and Mackenzie, L. 2013. Selective inhibition of NADPH oxidase reverses the over contraction of diabetic rat aortas. *Redox Biology.* **2C**:61-64.
- Reizis, B.** 2012. Classical dendritic cells as a unique immune cell lineage. *J Exp Med.* **209(6)**:1053-1056.
- Robert Koch Institut**, 2015. Herz-Kreislauf-Erkrankungen. http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische_Erkrankungen/HKK/HKK_node.html
- Robinson, J.M.** 2008. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem Cell Biol.* **130(2)**:281-297.
- Rosenfeld, S.I.**, Looney, R.J., Leddy, J.P., Phipps, D.C., Abraham, G.N. and Anderson, C.L. 1985. Human platelet Fc Receptor for Immunglobulin G. *J Clin Invest.* **76**:2317-2322.
- Ross, R.** and Glomset, J.A. 1973. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* **180(4093)**:1332-9.
- Ruf, W.** And Edgington, T.S. 1991. An anti-tissue factor monoclonal antibody which inhibits TF.VIIa complex is a potent anticoagulant in plasma. *Thromb Haemost.* **66(5)**:529-33.
- Rutault, K.**, Aldermann, C., Chain, B.M. and Katz, D.R. 1999. Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radic Biol Med.* **26(1-2)**:232-8.
- Salazar, F.** and Ghaemmaghahi, A.M. 2013. Allergen recognition by innate immune cells: critical role of dendritic and epithelial cells. *Front Immunol.* **4**:356.
- Sato, K.** and Fujita, S. 2007. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int.* **56**:183-191.

- Scheicher, C.**, Mehlig, M., Zecher, R. and Reske, K. 1992. Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol Methods*. **154**:253-264.
- Schmauß, D.** 2010. Modulation von dendritischen Zellen durch oxidiertes Low Density Lipoprotein. *Dissertation*.
- Schmidt, R.F.**, Thews, G. and Lang, F. 2013. Physiologie des Menschen. *Springer-Verlag*.
- Schwegler, J.** and Lucius, R. 2011. Der Mensch - Anatomie und Physiologie. *Georg Thieme Verlag KG*.
- Shen, L.**, Higuchi, T., Tubbe, I., Voltz, N., Krummen, M., Pektor, S., Montermann, E., Rausch, K., Schmidt, M., Schild, H., Grabbe, S. and Bros, M. 2013. A Trifunctional Dextran-Based Nanovaccine Targets and Activates Murine Dendritic Cells, and Induces Potent Cellular and Humoral Immune Responses *In Vivo*. *PLoS One*. **8(12)**:e80904
- Sheng, K.C.**, Pietersz, G.A., Tang, C.K., Ramsland, P.A. and Apostolopoulos, V. 2010. Reactive Oxygen species level defines two functionally distinctive stages of inflammatory dendritic cell development from mouse bone marrow. *J Immunol*. **184(6)**:2863-72.
- Shimada, K.** 2009. Immune System and Atherosclerotic Disease - Heterogeneity of Leukocyte Subsets Participating in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ J*. **73**:994-1001.
- Shrivastava, S.**, Ma, L., Tham, E-L., McVey, J.H., Chen, D. and Dorling, A. 2013. Protease-activated receptor-2 signalling by tissue factor on dendritic cells suppresses antigen-specific CD4⁺ T-cell priming. *Immunology*. **139**:219-226.
- Siegmund-Schultze, N.** 2009. Idiopathische Thrombozytopenische Purpura: Romiplostim als Langzeittherapie. *Dtsch Arztebl*. **106(1-2)**:A-40.
- Silbernagl, S.** and Despopoulos, A. 2012. Taschenatlas Physiologie. *Georg Thieme Verlag KG*.
- Simons, J.M.**, Hart, B.A., Ip Vai Ching, T.R., Van Dijk, H. and Labadie, R.P. 1990. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic Biol Med*. **8(3)**:251-8.
- Steffel, J.**, Lüscher, T.F. and Tanner, F.C. 2006. Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation*. **113(5)**:722-31.
- Steinbrink, K.**, Wolfl, M., Jonuleit, H., Knop, J. and Enk, A.H. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol*. **159**:4772-4780.

- Steinman, R.M.** and Cohn, Z.A. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* **137(5)**:1142-62.
- Stolk, J.**, Hiltermann, T.J., Dijkman, J.H. and Verhoeven, A.J. 1994. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **11(1)**:95-102.
- Sun, D.**, McNicol, A., James, A.A. and Peng, Z. 2006. Expression of functional recombinant mosquito salivary apyrase: a potential therapeutic platelet aggregation inhibitor. *Platelets.* **17(3)**:178-84.
- Tse, K.**, Tse, H., Sidney, J., Sette, A. and Ley, K. 2013. T cells in atherosclerosis. *Int Immunol.* **25(11)**:615-622.
- Ulfig, N.** 2010. Kurzlehrbuch Histologie. *Georg Thieme Verlag KG.*
- Unkeless, J.C.** 1979. Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophages and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med.* **150**:580-596.
- Urzainqui, A.**, Martínez del Hoyo, G., Lamana, A., de la Fuente, H., Barreiro, O., Olazabal, I.M., Martín, P., Wild, M.K., Vestweber, D., González-Amaro, R. and Sánchez-Madrid, F. 2007. Functional Role of P-Selektin Glycoprotein Ligand 1/P-Selectin Interaction in the Generation of Tolerogenic Dendritic Cells. *J Immunol.* **179**:7457-7465.
- Van Vré, E.A.**, Van Brussel, I., Bosmans, J.M., Vrints, C.J. and Bult, H. 2011. Dendritic Cells in Human Atherosclerosis: From Circulation to Atherosclerotic Plaques. *Mediators of Inflammation.* **Article ID 941396.**
- Villadangos, J.A.** and Schnorrer, P. 2007. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol.* **7(7)**:543-55.
- Vogiatzi, G.**, Tousoulis, D. and Stefanadis, C. 2009. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol.* **50**:402-409.
- Waithman, J.**, Zanker, D., Xiao, K., Oveissi, S., Wylie, B., Ng, R., Tögel, L. and Chen, W. 2013. Resident CD8(+) and migratory CD103(+) dendritic cells control CD8 T cell immunity during acute influenza infection. *PLoS One.* **8(6)**:e66136.
- Waris, G.** and Ahsan, H. 2006. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog.* **5**:14.
- Wei, A.H.**, Schoenwaelder, S.M., Andrews, R.K. and Jackson, S.P. 2009. New insights into the haemostatic function of platelets. *Br J Haematol.* **147(4)**:415-30.
- Wintergerst, U.** 2002. Chronische Granulomatose. *Monatsschrift Kinderheilkunde.* **150(10)**:1180-1187.

Wirkstoff Aktuell, Ausgabe 06/2010.

https://www.kvwl.de/arzt/verordnung/arzneimittel/info/wa/fondaparinux_wa.pdf

Woolard, K.J. 2013. Immunological aspects of atherosclerosis. *Clinical Science*. **125**:221-235.

Yanagita, M., Kobayashi, R., Kashiwagi, Y., Shimabukuro, Y. and Murakami, S. 2007. Thrombin regulates the function of human blood dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **364**(2):318-24.

Yao, S-K., Ober, J.C., McNatt, J., Benedict, C.R., Rosolowsky, M., Anderson, H.V., Cui, K., Maffrand, J-P., Campbell, W.B., Buja, L.M. and Willerson, J.T. 1992. ADP Plays an Important Role in Mediating Platelet Aggregation and Cyclic Flow Variations In Vivo in Stenosed And Endothelium-Injured Canine Coronary Arteries. *Circ Research*. **70**:39-48.

Zhang, Y., Choksi, S., Chen, K., Pobezinskaya, Y., Linnoila, I. and Liu, Z-G. 2013. ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages. *Cell Research*. **23**:898-914.

Zhu, W.G., Li, S., Lin, L.Q., Yan, H., Fu, T. and Zhu, J.H. 2009. Vascular oxidative stress increases dendritic cell adhesion and transmigration induced by homocystein. *Cell Immunol*. **254**(2):110-6.

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
μCi	Mikro-Curie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP-1	„activator protein-1“
APC	Antigenpräsentierende Zelle („antigen presenting cell“)
ATP	Adenosintriphosphat
BM-DC	Knochenmarksabgeleitete dendritische Zelle („bone marrow derived dendritic cell“)
BSA	Rinderserumalbumin
CAT	„calibrated automated thrombogram“
CD	„Cluster of Differentiation“
cDC	Konventionelle dendritische Zelle
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO	Kohlenstoffmonoxid
cpm	„counts per minute“
DC	Dendritische Zelle
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco`s Phosphat Buffered Saline
FACS	„Fluorescence activated cellsorter“

Abkürzungsverzeichnis

FCS	Fötale Kälberserum („fetal calf serum“)
FcR	Fc-Rezeptor
FcγR	Fcγ Rezeptor
FSC	„forward scatter“
g	Gramm
GM-CSF	Granulozyten-/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GP	Glykoprotein
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
3HTdR	Tritium-markiertes Thymidin
IFN-γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	„immunreceptor tyrosine-based activation motif“
ITIM	„immunreceptor tyrosine-based inhibition motif“
JAM-C	„junctional adhesion molecule c“
l	Liter
LDL	„low density lipoprotein“
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
MAC-1	„macrophage-1 antigen“
MAP	„mitogen-activated protein“
mDC	Myeloide dendritische Zelle
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex („major histocompatibility complex“)
ml	Milliliter
MLR	gemischte Lymphozyten-Reaktion („mixed lymphocyte reaction“)
mM	Millimol
mm	Millimeter
Mo-DC	Monozyten-abgeleitete dendritische Zelle

mRNA	„messenger RNA“
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFκB	„nuclear factor κB“
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
oxLDL	Oxidiertes LDL
PAR	„protease-activated receptor“
PBMC	„peripheral blood mononuclear cell“
PBS	„phosphat buffered saline“
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDBu	Phorbol-12, 13-dibutyrt
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PGE ₂	Prostaglandin E2
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
Q-PCR	Quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“)
rpm	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
SSC	„side scatter“
TF	„Tissue Factor“
TFPI	„Tissue Factor Pathway Inhibitor“
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor („toll-like receptor“)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	Units
vWF	Von Willebrand-Faktor
x g	Zentrifugalbeschleunigung
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung

Lebenslauf