Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik

(Department) Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

(Schwerpunkte: Kardiologie und Kreislauferkrankungen)

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz

Bedeutung der Scavenger-Rezeptoren CD36 und MSR-A für die Schaumzellbildung in der Atherosklerose

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Susanne Barbara Schiemann

aus

Ostfildern-Ruit

2010

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. A. May
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Salih

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Atherosklerose	1
1.1.1	Definition und Bedeutung	1
1.1.2	Ätiologie	1
1.1.3	Morphologie und Pathogenese	2
1.1.3.1	Prozess der Schaumzellbildung in der Atherogenese	2
1.1.3.2	Scavenger-Rezeptoren	3
1.1.3.3	Thrombozyten in der Atherogenese	8
1.1.3.4	$CD34^+$-Progenitorzellen in der Atherogenese	11
1.2	Hypothese und Fragestellung	12
1.2.1	Hypothese	12
1.2.2	Fragestellung	12
2.	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Geräte	13
2.1.2	Für die Zellkultur verwendete Lösungen	14
2.1.3	Pufferlösungen und weitere Lösungen	15
2.1.4	Antikörper	16
2.1.5	Materialien für die Zellkultur	16
2.1.5.1	Für die Fluoreszenzmarkierung verwendete Chemikalien	17
2.1.6	Kit für die $CD34^+$-Isolation	18
2.1.7	Weitere Materialien	18
2.2	Methoden	19
2.2.1	Isolierung von Zellen	19
2.2.1.1	Isolierung humaner Thrombozyten	19
2.2.1.2	Isolierung humaner Monozyten	19
2.2.1.3	Isolierung humaner $CD34^+$-Progenitorzellen	20
2.2.2.	Ko-Kultivierung von Monozyten und $CD34^+$-Progenitorzellen mit Thrombozyten	21
2.2.3	Mikroskopie und Markierung von Zellen	21
2.2.3.1	Lichtmikroskopie	21
2.2.3.2	Immunfluoreszenzfärbung von Schaumzellen	22

2.2.3.3	Markierung und Beladung von Thrombozyten für die Immunfluoreszenzmikroskopie und die Durchflusszytometrie	23
2.2.3.4	Immunfluoreszenzmikroskopie	24
2.2.4	Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometrie	24
2.2.4.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	24
2.2.4.2	Vorbereitung und Messung von Zellen aus den $CD34^+$-Progenitorzellen/Monozyten-Thrombozyten-Ko-Kulturen am FACS-Gerät	25
2.2.4.3	Durchführung der Messungen	26
2.2.5	Statistische Auswertung	26
3.	Ergebnisse	27
3.1	Induktion der Schaumzellbildung aus $CD34^+$-Progenitorzellen durch Thrombozyten	27
3.2	Induktion der Schaumzellbildung aus Monozyten durch Thrombozyten	28
3.2.1	Etablierung der Methode der Thrombozyten-induzierten Schaumzellentwicklung aus Monozyten	29
3.3	Inhibition der Thrombozyten-induzierten Entwicklung von Schaumzellen aus $CD34^+$-Progenitorzellen	29
3.4	Inhibition der Thrombozyten-induzierten Entwicklung von Schaumzellen aus Monozyten	34
3.5	Phagozytose lipidbeladener Thrombozyten durch Schaumzellen	37
3.5.1	Phagozytose durch Schaumzellen aus $CD34^+$-Progenitorzellen	38
3.5.2	Phagozytose durch Schaumzellen aus Monozyten	41
3.5.3	Durchflusszytometrische Analyse der Phagozytose lipidbeladener Thrombozyten durch Schaumzellen mit blockierten Scavenger-Rezeptoren	43
4.	Diskussion	50
4.1	Thrombozyten-induzierte Entwicklung von Schaumzellen in der Atherogenese	50
4.1.1	Mechanismen	50
4.1.2	Phagozytose der Thrombozyten	51
4.2	Regeneration und Progression der Atherosklerose durch $CD34^+$-Progenitorzellen	53

4.3	Scavenger-Rezeptoren in der Atherogenese	56
4.3.1	Scavenger-Rezeptoren in der Thrombozyten-induzierten Schaumzellbildung	56
4.3.2	Rolle der Scavenger-Rezeptoren bei der Aufnahme von modifizierten LDL durch Thrombozyten	58
4.4	Schlussfolgerung	60
5.	Zusammenfassung	63
6.	Literaturverzeichnis	65
7.	Anhang	79
7.1	Abkürzungsverzeichnis	79
7.2	Abbildungsverzeichnis	82
7.3	Tabellenverzeichnis	85
7.4	Danksagung	86
7.5	Lebenslauf	87

1. Einleitung

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Definition und Bedeutung

Unter Atherosklerose versteht man die „variable Kombination von Intimaveränderungen (der Arterien), bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen (Kalkablagerungen), verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“[1]. Atherosklerotische Veränderungen von Gefäßen bilden die Grundlage für Erkrankungen des Herzkreislaufsystems und Durchblutungsstörungen des Gehirns, die zu den führenden Todesursachen in den westlichen Industrienationen zählen [2, 3].

1.1.2 Ätiologie

Atherosklerose ist ein durch viele Faktoren verursachtes Krankheitsbild, für dessen Entstehung insbesondere die Hypercholesterinämie eine bedeutende Rolle spielt. Cholesterin wird im Blut an Lipoproteine gebunden transportiert. Lipoproteine niedriger Dichte (LDL = Low Density Lipoprotein) transportieren Cholesterin vor allem in die Peripherie. Dort bilden sie nach Phagozytose durch Makrophagen die Gefäßwand schädigende Lipidplaques. Weitere die Atherogenese fördernde Faktoren sind Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Nikotinkonsum, Übergewicht und Bewegungsmangel [4]. Da die Atherogenese einen sich über Jahrzehnte kontinuierlich entwickelnden Prozess darstellt, spielt die Reduktion der Risikofaktoren die Schlüsselrolle für die Prävention atherosklerotisch bedingter Erkrankungen.

1.1.3 Morphologie und Pathogenese

1.1.3.1 Prozess der Schaumzellbildung in der Atherogenese

Der Response-to-Injury-Hypothese von Ross zufolge stellt die Atherogenese die Reaktion der Arterienwand auf eine Verletzung von Endothelzellen dar [5]. Diese Reaktion besteht aus der Kombination eines entzündlichen Prozesses mit einer starken Vermehrung bindegewebiger Zellen in der arteriellen Wand. Endothelverletzungen können durch arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Nikotin sowie Infektionen hervorgerufen werden [6-8]. Durch die Schädigung aktivierte Endothelzellen bewirken, dass Monozyten aus der Blutbahn in die Intima der Arterienwand gelangen [9]. Das geschädigte Endothel kann seine Barrierefunktion nicht mehr richtig wahrnehmen, so dass im Blut zirkulierendes LDL vor allem bei hohen LDL-Plasma-Spiegeln verstärkt in den subendothelialen Raum eingelagert und unter anderem durch Oxidation modifiziert wird [10, 11]. In der Folge lagern die Makrophagen große Mengen oxidierten LDLs (oxLDL = oxidized Low Density Lipoprotein) ein, das zu Fetttropfen akkumuliert und differenzieren sich dadurch zu sogenannten Schaumzellen [12, 13]. Im Frühstadium der Atherogenese entwickelt sich als erste makroskopisch sichtbare Veränderung der sogenannte „fatty streak“, eine Ablagerung von Schaumzellen in der arteriellen Wand [14-18]. Schaumzellen aktivieren glatte Muskelzellen in der Media und induzieren ihre Einwanderung in die Intima [18]. Dort bilden sie durch Proliferation zusammen mit fibrösem Bindegewebe und extrazellulärer Matrix eine die Plaque stabilisierende fibromuskuläre Deckschicht über der Schaumzellenansammlung [15, 19, 20]. Die Fibrosierung ist kennzeichnend für die fortgeschrittene Phase der Atherogenese [21]. Der Zusammenhalt der Deckschicht wird durch die Produktion von Matrixproteinen und Wachstumsfaktoren durch die Bindegewebszellen gewährleistet [19]. Durch die Freisetzung von Lipiden aus Schaumzellen, die unter dem zytotoxischen Effekt des oxLDL nekrotisch werden, vergrößert sich der Lipidanteil innerhalb der Plaque [22]. Wird der Lipidpool zu groß im Verhältnis zu der ihn stabilisierenden Platte, kann sie die Plaque nicht mehr ausreichend

stabilisieren und es kann zur Ruptur kommen [15]. An der Rupturstelle findet man in der Regel einen Überschuss von Makrophagen und T-Lymphozyten [23]. T-Lymphozyten produzieren unter anderem Interferon-γ (IFN-γ), das Makrophagen zur Bildung kollagenauflösender Metalloproteinasen anregt und andere Zytokine, die zur Apoptose glatter Muskelzellen führen, so dass die Plaque dort instabil wird [24-26]. Dadurch entsteht eine Prädilektionsstelle für eine spätere Ruptur.

1.1.3.2 Scavenger-Rezeptoren

Makrophagen, die sich zu Schaumzellen differenzieren, müssen große Mengen an Lipiden aufnehmen. Der LDL-Rezeptor unterliegt einer negativen Feedback-Regulation und schützt die Makrophagen dadurch vor einer Lipidüberladung. Die massive Lipidaufnahme von Makrophagen muss deshalb über andere Rezeptoren vermittelt werden [12, 13]. 1979 wurde erstmals die Existenz einer Gruppe von Multiliganden-Rezeptoren nachgewiesen, die unter anderem für die Endozytose großer Mengen von modifiziertem LDL verantwortlich sind [12, 27].
Über diese Rezeptoren erfolgt die Aufnahme verschiedener Bestandteile aus der Blutbahn, wie z.B. von acetyliertem LDL (AcLDL = Acetylated Low Density Lipoprotein), so dass sie eine Art Säuberungsfunktion im Blutgefäßsystem erfüllen und deshalb als Scavenger (= Kehrer, Aufräumer) bezeichnet wurden [12, 21]. Brown und Goldstein konnten nachweisen, dass diese Rezeptoren AcLDL mit hoher Affinität spezifisch binden und dadurch in Makrophagen, auf deren Oberfläche sie hauptsächlich aktiv sind, zu einer Lipidüberladung mit Differenzierung zu Schaumzellen führten [12, 13]. AcLDL selbst hat keine bekannte physiologische Funktion, sondern entsteht vermutlich durch Modifikation von nativem LDL, das kaum über Scavenger-Rezeptoren aufgenommen wird [12, 28]. Endothelzellen modifizieren LDL zu oxLDL, welches in wesentlich größerem Ausmaß über Scavenger-Rezeptoren in die Zellen transportiert wird [29-31]. OxLDL induziert die Expression von Scavenger-Rezeptoren [32].
Der klassische Weg der Entwicklung von Schaumzellen kann somit als Prozess

beschrieben werden, in dem zunächst die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen, welche Scavenger-Rezeptoren exprimieren, erfolgt und anschließend eine Scavenger-Rezeptor-vermittelte massive Lipidaufnahme in die Makrophagen, wodurch sich diese in Schaumzellen umwandeln [33]. Laut Murphy et al. unterscheidet man mindestens acht verschiedene Subtypen von Scavenger-Rezeptoren [34, 35]. Alle Scavenger-Rezeptoren können modifizierte Lipoproteine als Liganden binden [36].

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Scavenger-Rezeptoren CD36, MSR-A und LOX-1 gegeben werden.

Zu den Scavenger-Rezeptoren der Gruppe A gehören unter anderem die Scavenger-Rezeptoren SR-AI und SR-AII, die vor allem auf Makrophagen, Schaumzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen von Gefäßen innerhalb atherosklerotischer Läsionen exprimiert werden [37, 38] . SR-AI und SR-AII vermitteln zusammen die Aufnahme von ca. 80% des AcLDL und ca. 50% des oxLDL in Schaumzellen und spielen deshalb eine wichtige Rolle in der frühen Atherogenese [39]. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression der SR-A-Rezeptoren zu einer verminderten Bildung atherosklerotischer Plaques und damit zu einer weniger stark ausgeprägten Arterienwandverhärtung führt [40, 41]. Bei den komplexeren Plaques weiter entwickelter atherosklerotischer Läsionen wirkt die Überexpression von SR-A nicht mehr protektiv gegen die Atherosklerose, unter anderem weil SR-A für den Zelltod lipidüberladener Makrophagen mit verantwortlich ist und dadurch indirekt den lipidhaltigen Kern im Zentrum der fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion vergrößert [42, 43]. Da SR-A den Prozess der Atherogenese infolgedessen sowohl aufhalten als auch begünstigen kann, scheint seine Rolle vom Stadium der Plaque-Entwicklung abhängig zu sein [43]. SR-A kann apoptotische Zellen beseitigen, wenn keine Entzündung vorliegt, sodass seine Atherosklerose fördernde Wirkung relativiert wird [43]. Einer unkritischen Blockade des SR-A sollte man deshalb skeptisch gegenüberstehen.

CD36 gehört zu den Scavenger-Rezeptoren der Klasse B [44- 46]. Mehrere Domänen des Rezeptors sind in der Lage, oxLDL zu binden, was die Voraussetzung für die Rolle des CD36-Rezeptors bei der Lipidaufnahme in der Atherogenese bildet [47, 48]. Das Liganden-Spektrum umfasst die Lipoproteine natives LDL, oxLDL, AcLDL, Lipoprotein sehr niedriger Dichte (VLDL = Very Low Density Lipoprotein), Lipoprotein hoher Dichte (HDL = High Density Lipoprotein), Fettsäuren, anionische Phospholipide, Kollagen, Thrombospondin und apoptotische Zellen [49-52]. CD36 befindet sich auf Thrombozyten, Monozyten und Makrophagen, Endothelzellen, Adipozyten, glatten Muskelzellen und bestimmten Epithelzellen wie z.B. Brustepithelzellen [53-55]. Die Expression von CD36 auf Makrophagen wird während ihrer Differenzierung zu Schaumzellen hochreguliert, so dass CD36 als ein die Atherogenese fördernder Faktor betrachtet werden muss [56]. CD36 besitzt die Fähigkeit, oxLDL spezifisch und mit hoher Affinität zu binden, was die Voraussetzung ist für die Aufnahme von oxLDL in Makrophagen, einem zentralen Schritt in der frühen Atherogenese [57]. Bei Makrophagen, die kein CD36 exprimieren, ist die Aufnahme von oxLDL um 40-50% vermindert im Vergleich zu CD36 exprimierenden Makrophagen. Wird CD36 durch monoklonale Antikörper blockiert, nimmt die oxLDL-Aufnahme ebenso um den gleichen Faktor ab [58].

In Experimenten wurde nachgewiesen, dass CD36 und SR-A für die Aufnahme des größten Teils von oxLDL in Makrophagen verantwortlich sind [59]. Sind beide Rezeptoren blockiert, so nimmt die Bindung und nachfolgende Aufnahme von oxLDL um 75 % ab [59]. Beim Vergleich der oxLDL-Bindung und -Aufnahme über SR-A und CD36 stellte sich heraus, dass stark oxidiertes LDL wesentlich stärker und schneller über SR-A und schwach oxidiertes LDL wesentlich stärker und schneller über CD36 aufgenommen wird [60-62]. Makrophagen exprimieren unter entzündlichen Bedingungen verstärkt CD36. CD36 wiederum fördert den chronischen Entzündungsprozess in der Atherogenese durch Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren [63-65]. In Fettgewebe, Herzmuskel- und Skelettmuskelzellen aber auch Dünndarmzellen ermöglicht CD36 durch seinen Transport von langkettigen Fettsäuren in die Zellen einen Großteil der Energiegewinnung [53, 66]. CD36 ist ein entscheidender Kofaktor in der

Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen über das Integrin-System und über Phosphatidylserin-Rezeptoren [67].

Der klassische Weg der Schaumzellbildung über die Scavenger-Rezeptor-vermittelte Aufnahme modifizierten LDLs in Makrophagen läuft zu einem hohen Prozentsatz über die beiden Scavenger-Rezeptoren CD36 und MSR-A ab. Dies konnte durch Experimente mit MSR-$A^{-/-}$/$CD36^{-/-}$- und Wildtyp-Makrophagen gezeigt werden, in denen diese jeweils mit nativem LDL, AcLDL und oxLDL inkubiert worden waren. Bei Wildtyp-Makrophagen nahmen sowohl der Gesamtcholesterinanteil als auch der Cholesterinesteranteil nach Inkubation mit oxLDL und acLDL deutlich zu, wohingegen die MSR-$A^{-/-}$/$CD36^{-/-}$ -Makrophagen nach Inkubation mit oxLDL keinerlei Zunahme des Gesamtcholesterinanteils und des Cholesterinesteranteils zeigten und nach Inkubation mit acLDL lediglich eine Zunahme des Gesamtcholesterinanteils, während der Cholesterinesteranteil gleich geblieben war. Damit konnten Kunjathoor et al. beweisen, dass MSR-A und CD36 maßgeblich an der Schaumzellbildung über modifizierte Lipoproteine beteiligt sind und die Zugabe modifizierter Lipoproteine ohne CD36 und MSR-A nicht zu einer Induktion der Schaumzellentwicklung führt [59].

Der sogenannte Lectin-like Oxidized LDL-receptor-1, abgekürzt LOX-1 wurde 1997 von Sawamura et al. entdeckt und gehört in die Klasse E der Scavenger-Rezeptoren [35, 68]. Er wurde zunächst als Rezeptor für oxLDL betrachtet, der spezifisch von Endothel exprimiert wird [68]. Mittlerweile wurde LOX-1 allerdings auch auf glatten Muskelzellen, Makrophagen und Thrombozyten nachgewiesen [69]. Sein Liganden-Spektrum umfasst unter anderem oxLDL, Hypochlorid-modifiziertes HDL, apoptotische Zellen, aktivierte Thrombozyten und Bakterien, LOX-1 bindet aber vor allem oxLDL mit hoher Affinität [70-74]. LOX-1 wird unter Bedingungen, welche die Atherogenese fördern, hochreguliert. Dazu gehören Diabetes mellitus, Hypertonie und Hyperlipidämie, die Freisetzung der inflammatorischen Zytokine Tumor Growth Factor-β (TGF-β) und Tumor Nekrose Faktor-α (TNF-α), Scherkräfte des Blutstromes und oxidativer Stress. In der Atherogenese vermittelt LOX-1 die Bindung, Aufnahme und Modifikation von oxLDL durch Endothelzellen und Makrophagen und wird durch oxLDL

aktiviert [68, 75-87]. Zellen atherosklerotischer Läsionen wie Makrophagen und glatte Muskelzellen exprimieren verstärkt LOX-1 [75, 80]. Sie nehmen LOX-1-vermittelt oxLDL während ihrer Entwicklung zu Schaumzellen auf. Im Blut zirkulierende Monozyten dagegen exprimieren kaum LOX-1 [88, 89]. Über die Aufnahme von oxLDL in Makrophagen trägt LOX-1 neben CD36 und MSR-A zur Entwicklung von Schaumzellen über den klassischen Weg bei. OxLDL induziert über LOX-1 die Apoptose und Nekrose von Endothelzellen mit nachfolgender endothelialer Dysfunktion, bei Blockade des LOX-1-Rezeptors durch Antikörper kann oxLDL nicht apoptotisch wirken [85, 89, 90]. Zellen, die LOX-1 exprimieren, können alte und apoptotische Zellen wie z.B. Makrophagen und glatte Muskelzellen sowie aktivierte Thrombozyten phagozytieren [71, 72]. LOX-1 wirkt dadurch regulierend in der Atherogenese.

1.1.3.3 Thrombozyten in der Atherogenese

Thrombozyten und Endothelzellen aktivieren sich gegenseitig und wirken dadurch proatherogen [34, 91, 92]. Aktivierte Thrombozyten locken durch die Freisetzung inflammatorischer Botenstoffe Monozyten und Leukozyten an und in die Arterienwand [34, 93] (Abbildung 1).

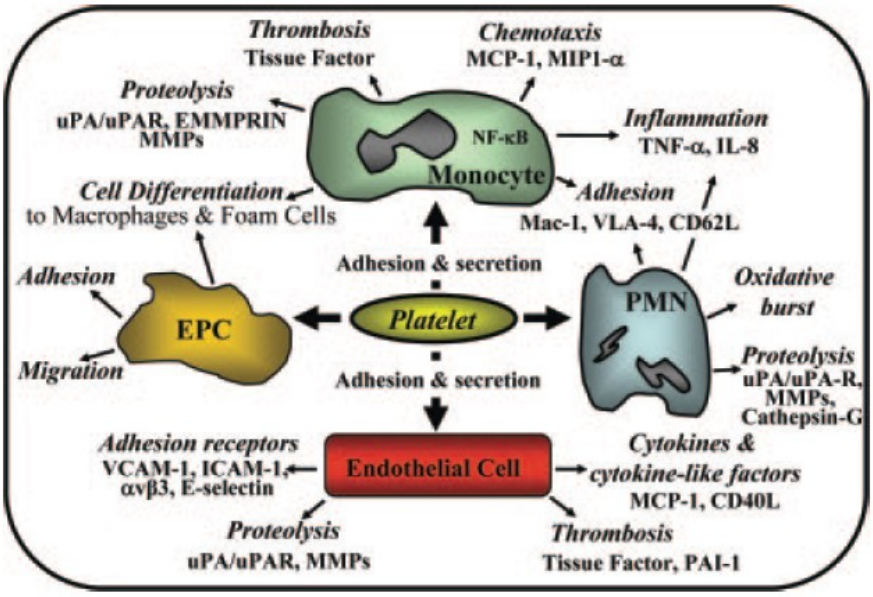


Abbildung 1: Inflammatorische Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und anderen Zellen.
Thrombozyten treten mit anderen Zellen wie neutrophilen Granulozyten (PMN = polymorphonuclear neutrophil), Monozyten, Endothelzellen oder endothelialen Progenitorzellen (EPC = endothelial prgenitor cells) in Wechselwirkung und induzieren die Freisetzung chemotaktischer und inflammatorischer Zytokine wie Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Macrophage Inflammatory Protein-1α (MIP-1α), CD40L (CD40 Ligand), Tumor Nekrose Factor-α (TNF-α), Interleukin-8 (IL-8), Nuclear Factor Kappa B (NFκB), proteolytischer Mediatoren wie Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA)/Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor (uPAR), Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN), Matrixmetalloproteinase (MMP = Matrix Metalloproteinase), die Adhäsion begünstigender Botenstoffe wie Very Late Antigen-4 (VLA-4), L-Selectin (CD62L), Macrophage Antigen-1 (Mac-1) und zu Thrombosierung führender Mediatoren wie Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) durch diese Zellen. Dies führt zu Adhäsion, Chemotaxis, Migration, Proteolyse, Thrombosierung und sogar zur Differenzierung zu Makrophagen und Schaumzellen im Rahmen der Atherogenese. VCAM-1 = Vascular Adhesion Molecule-1, ICAM-1 = Intercellular Adhesion Molecule-1. Diese Abbildung stammt aus: May AE, Seizer P, Gawaz M: Platelets: Inflammatory Firebugs of Vasculary Walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:s5-s10 (Abbildung 2).

Monozyten differenzieren sich im subendothelialen Raum zu Schaumzellen und tragen so zur Plaquebildung bei [93]. Thrombozyten adhärieren an intakte Endothelzellen und verändern deren Phänotyp [94-96]. Aktiviertes Endothel besitzt die Fähigkeit, chemotaktisch Zellen anzulocken, zu binden und proteolytisch aktiv zu werden [94, 97-104]. Eine Aktivierung von Endothel kann aber auch durch infektiöse Stimuli, mechanische Belastung, mangelhafte Durchblutung und entzündliche Prozesse bewirkt werden [34, 105, 106]. Eine Verstärkung der Aktivierung von Thrombozyten im Rahmen der Atherogenese erfolgt durch die Lipoproteine LDL, VLDL und modifiziertes LDL wie oxLDL, HDL dagegen wirkt stabilisierend auf die Plättchen und somit protektiv gegen Atherosklerose [107-109]. Aus Thrombozyten freigesetzte Lipide können von anderen Zellen aufgenommen und verändert werden [34]. Thrombozyten können wie Makrophagen, glatte Muskelzellen und Endothelzellen natives LDL oxidativ verändern und dadurch seine Affinität zu Scavenger-Rezeptoren erhöhen, die sie selbst auch exprimieren [34]. Der CD36-Rezeptor vermittelt die Bindung von oxLDL an Thrombozyten und ihre Aktivierung, außerdem stabilisiert er die Bindung der Thrombozyten untereinander während der Aggregation [71, 110, 111]. Auch SR-A ist an der Aktivierung von Thrombozyten beteiligt [34, 112]. LOX-1 wird nur von aktivierten Thrombozyten exprimiert. Neben der oxLDL-Bindung kann LOX-1 auch die Bindung an andere aktivierte Thrombozyten vermitteln und dient deshalb wahrscheinlich vor allem der Thrombusstabilisierung [34, 113].

Thrombozyten können in Monozyten und Makrophagen die Differenzierung zu Schaumzellen induzieren. Dies erfolgt einerseits über die direkte Aufnahme von Thrombozyten in diese Zellen, andererseits durch Mediatoren vermittelt über ein Wechselspiel der beiden Zelltypen in enger räumlicher Nachbarschaft. Mediatoren wie inflammatorische Zytokine, Mitogene und Adhäsionsmoleküle spielen insgesamt eine wichtige Rolle in der Atherogenese [92, 114]. Die Phagozytose von Thrombozyten führt zu einer Ablagerung von Lipiden in Monozyten [115]. Makrophagen werden nach Aufnahme von Thrombozyten aktiviert und zeichnen sich dann durch die Bildung großer Mengen an TNF-α und Nitrit aus [116]. Von Trombozyten gebildetes und in α-Granula gespeichertes APP (platelet-derived amyloid precursor protein) wird in den Makrophagen

proteolytisch zu β-Amyloid ähnlichen Substanzen umgewandelt. Die Phagozytose von Thrombozyten aus APP-knockout-Mäusen kann keine Aktivierung von Makrophagen induzieren, so dass APP und seine modifizierten Formen für die Aktivierung von Makrophagen über die Phagozytose von Thrombozyten im Rahmen der Schaumzellbildung verantwortlich sind [34, 116-120]. Scavenger-Rezeptoren auf Makrophagen führen zur Aufnahme von Thrombozyten einschließlich der in ihrem Zytoplasma gespeicherten Stoffe wie z.B. Lipiden. Brown et al. bewiesen, dass die Thrombozyten von SR-A auf Makrophagen erkannt und aufgenommen werden. Die bei ihren Experimenten untersuchten Thrombozyten durchliefen vor ihrer Aufnahme im Rahmen ihres natürlichen Alterungsprozesses ein Apoptose-ähnliches Programm, das jedoch im Unterschied zur Apoptose ohne Caspase-Aktivität abläuft [121]. Neben SR-A ist CD36 zusammen mit CD9-positiven Transmembran-Rezeptoren und Integrinen an der Erkennung von Thrombozyten über Scavenger-Rezeptoren beteiligt [122, 123]. Die weitere Umwandlung der Thrombozyten im Inneren der Makrophagen im Laufe ihrer Differenzierung zu Schaumzellen ist noch nicht genau bekannt [34]. Den Prozess der Entwicklung von Schaumzellen durch die Phagozytose lipidbeladener Thrombozyten bezeichnet man als alternativen Weg der Schaumzellentstehung [117, 118]. Aktivierte Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen sind aber auch oft von Thrombozyten umgeben, ohne diese aufzunehmen. Die Aktivierung der Makrophagen erfolgt hier Thrombozyten-induziert über Mediatoren wie beispielsweise den Gerinnungsfaktor Thrombin, den die Thrombozyten aus ihren Granula freisetzen, Kollagen oder Arachidonsäure [117, 119]. Von aktivierten Thrombozyten freigesetzter Cholesterinester wird in Form von Lipidtropfen im Inneren von Makrophagen gespeichert [124]. Thrombozyten steigern über Mediatoren sowohl die Bildung als auch die Ablagerung des Cholesterinesters in den Makrophagen [125].

1.1.3.4 CD34$^+$-Progenitorzellen in der Atherogenese

Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass sich CD34$^+$-Progenitorzellen in Anwesenheit von Thrombozyten zu Schaumzellen differenzieren können. Ko-Kulturen aus aktivierten Thrombozyten und CD34$^+$-Progenitorzellen wurden inkubiert und die entstandenen Zellen über den Nachweis der entsprechenden für Schaumzellen typischen Eigenschaften wie z.B. der Expression des Scavenger-Rezeptors CD68 als Schaumzellen identifiziert. Mit oxLDL vorinkubierte Thrombozyten dienten als Lipidtransporter für die aus CD34$^+$-Progenitorzellen entstandenen Makrophagen. CD34$^+$-Progenitorzellen wirken damit in Anwesenheit von Thrombozyten proatherogen [34, 126]. CD34$^+$-Progenitorzellen stellen ein Reservoir für die Regeneration von geschädigten Endothelzellen in Gefäßwänden und von Infarktarealen dar. Der Oberflächenmarker CD34 wird dabei in allen Entwicklungsstadien von der wenig differenzierten hämapoetischen Stammzelle bis zur reifen Endothelzelle exprimiert [127]. CD34$^+$-Zellen können sich im Blutstrom frei bewegen und auf Signale ischämischer Gewebebereiche oder verletzter Endothelzellen in die entsprechenden Gebiete einwandern und dort deren Erneuerung sowie durch Neovaskularisation eine verbesserte Perfusion geschädigter Gewebsareale bewirken. Mittlerweile sind vor allem die Funktionen der endothelialen Progenitorzellen in diesem Zusammenhang genauer erforscht worden. Dabei wurde festgestellt, dass Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko wie beispielsweise bei Vorliegen von Dyslipidämie über weniger endotheliale Progenitorzellen verfügen als Patienten nach akuten Myokardinfarkten, was die regenerierende Funktion der Progenitorzellen bei Krankheiten des Herzkreislaufsystems wahrscheinlich macht [127-138]. Im Blut zirkulierende Progenitorzellen können nach ihrer Differenzierung zu Endothelzellen die geschädigten Zellen in arteriellen Wänden ersetzen und verzögern dadurch die Entwicklung atherosklerotischer Plaques, für deren Entstehung dysfunktionelles Endothel die zentrale Voraussetzung darstellt [130, 139, 140]. Endotheliale Progenitorzellen sind aber auch an der Bildung einer Neointima im Prozess der Atherogenese und an der Vaskularisation atherosklerotischer Plaques

beteiligt [141-143]. Vaskuläre Progenitorzellen werden Thrombozyten-induziert mittels eines Wachstumsfaktors in vitro zu glatten Muskelzellen, was wiederum die atherosklerotische Arterienwandverdickung unterstützen könnte [144].
Ob Progenitorzellen pro- oder antiatherogene Funktionen erfüllen, scheint von bisher nicht genau bekannten Faktoren abzuhängen. Möglicherweise fungieren Thrombozyten als Schalter zwischen Regeneration und Progression der Atherosklerose durch $CD34^+$-Progenitorzellen.

1.2 Hypothese und Fragestellung

1.2.1 Hypothese

Dieser Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass Scavenger-Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Thrombozyten-induzierten Entwicklung von Schaumzellen aus Monozyten und $CD34^+$-Progenitorzellen spielen.

1.2.2 Fragestellung

Der Einfluss der Scavenger-Rezeptoren auf die durch Thrombozyten vermittelte Bildung von Schaumzellen aus $CD34^+$-Progenitorzellen und Monozyten wurde anhand einer zweiteiligen Fragestellung untersucht:
1. Führt eine Antikörper-Blockade der Scavenger-Rezeptoren CD36 und MSR-A zur Hemmung der Schaumzellbildung in Ko-Kulturen mit $CD34^+$-Progenitorzellen und nativen Thrombozyten sowie Monozyten und nativen Thrombozyten?
2. Nimmt die Aufnahme lipidbeladener Thrombozyten durch Schaumzellen durch eine Antikörper-Blockade von CD36- und MSR-A-Rezeptoren ab?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Begasungsbrutschränke	Sanyo (Bad Nenndorf)
Durchflusszytometer (FACSCalibur)	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Fluoreszenz- und Lichtmikroskop	Zeiss (Göttingen) (Axiovert 200)
Hybridisierungsofen	Amersham Biosciences (München)
Magnetrührer	Janker + Kunkel (Staufen)
Magnetseparationssystem VarioMACS	Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach)
Pipettierhilfen (pipetboy acu)	Brand (Wertheim)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Spannungsgeräte	Gibco (Karlsruhe)
Sterilbänke	Kendro (Hanau)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)
Vortex (Vortex-Genie 2)	Janker + Kunkel (Staufen)
Waage	Santorius (Göttingen)
Zentrifugen	Eppendorf (Hamburg), Heraeus (Hanau)
Zellzählgerät	Sysmex (Norderstedt)

2.1.2 Für die Zellkultur verwendete Lösungen

IMDM-Grundmedium	IMDM-Medium mit Glutamax (Invitrogen) 5 % (v/v) FCS 1 % (v/v) MEM n/e Aminosäuren (Invitrogen) 1 % (v/v) MEM-Vitamines (Invitrogen) 100 I.U./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Monozytenmedium	VLE RPMI 1640 Medium (Invitrogen) 10 % (v/v) FCS (extrem niedriger Endotoxingehalt) 100 I.U./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
RPMI-Grundmedium	RPMI 1640 mit $NaHCO_3$ (0,195%) Glutamax-I,25 mH HEPES (Invitrogen) 10 % (v/v) FCS 100 I.U./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
RPMI-Vollmedium	RPMI 1640 Grundmedium 1 % (v/v) MEM n/e Aminosäuren 1 % (v/v) MEM Na-Pyruvat

2.1.3 Pufferlösungen und weitere Lösungen

ACD (acidum citridum)	20 g/l D-(+)-Glukose 25 g/l Natriumcitrat 13,64 g/l Zitronensäure in Aqua bidest. mit NaOH auf pH 4,69 einstellen sterilfiltrieren und bei 4°C aufbewahren
FACS-Fixierlösung	0,5 % (v/v) Paraformaldehyd in 99 % (v/v) PBS Dulbecco´s
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution (HBSS) mit $NaHCO_3$ ohne Phenolrot, Kalziumchlorid und Magnesiumsulfat (Sigma-Aldrich)
HF-Puffer	100 ml HBSS 10 x 2 % FCS 10 mM HEPES 1 M 1 % Penicillin/Streptomycin in 1000 ml Aqua bidest. steril
Paraformaldehyd 1 %	5 g Paraformaldehyd 500 ml PBS 40 µl 10 N NaOH Erwärmen bei 65 °C, bis Lösung klar wird, einstellen auf pH 7,4, filtrieren (0,2 µm Filter), bei – 20°C lagern oder bei 4 °C für 1 Woche
Tyrodes 10 x	80 g NaCl 10,15 g $NaHCO_3$ 1,95 g KCl in Aqua bidest. sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern
Tyrodes pH 7,4 + 0,1 % BSA/Glukose	0,1 g BSA 0,1 g D-(+)-Glukose 10 ml Tyrodes 10 x 90 ml Aqua bidest mit HEPES auf pH 7,4 einstellen
Tyrodes pH 6,5 + 0,1 % BSA/Glukose	80 ml Tyrodes pH 7,4 + 0,1 g BSA/Glukose mit 1 M HCl auf pH 6,5 einstellen

2.1.4 Antikörper

Anti Human Macrophage Scavenger Receptor (MSR-A: CD204) Monoclonal Antibody, Clone SRA-E5	Trans genic Inc. (Japan)
FITC Mouse IgG_1k Isotype Control, Clone MOPC-21	Becton Dickinson (BD)
Goat Anti-Mouse Alexa 488 Molecular Probes A11029	Invitrogen (Karlsruhe)
Monoclonal Antibody to Human LOX-1 Clone 23C11	Cell Sciences (Canton, MA 02021, USA)
Monoclonal Antibody CD36 Clone FA6-152	Immunotech (Marseille, Frankreich)
Monoclonal Mouse Anti-Human CD68/FITC, Clone KP1	DakoCytomation (Hamburg)
Mouse IgG_1 Isotype Control, Low endotoxin, Azide-Free, Clone 15H6	Southern Biotech (Birmingham, AL, USA)
Polyclonal Rabbit Anti-Rat Ig/biotinyliert	DakoCytomation (Hamburg)

2.1.5 Materialien für die Zellkultur

Biocoll (Separation Solution)	Biochrom (Berlin)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
BSA (essentially fatty acid free)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
D-Phospate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen (Karlsruhe)
Ethanol (96 %)	Merck (Schwalbach)
Ethanol absolut	Merck (Schwalbach)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
FACS-Flow	Becton Dickinson (BD) (Heidelberg)
Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation (Hamburg)
Ficoll-Paque (1,077 g/ml)	GE Healthcare (München)
Formaldehyd (36-38 %, aq.)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen (Karlsruhe)
FCS mit extrem niedrigem Endotoxingehalt	Clonetics (San Diego, USA)

Gentamycin (500 x; 20 ml = 1 g)	Roche (Basel, Schweiz)
Gelatine (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
D-(+)-Glukose	Merck (Schwalbach)
L-Glutamin (200 mM)	ICN Biomedicals (Eschwege)
Glycin	AppliChem (Darmstadt)
HBSS	Invitrogen (Karlsruhe)
Heparin	B. Braun (Melsungen)
HEPES (1 M Pufferlösung)	Invitrogen (Karlsruhe)
N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N´-[2-ethansulfonsäure] (HEPES)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kaliumchlorid	Merck (Schwalbach)
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methanol	Merck (Schwalbach)
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem (Darmstadt)
Natronlauge	Merck (Schwalbach)
Paraformaldehyd	AppliChem (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100 x konz.)	Invitrogen (Karlsruhe)
PBS Dulbecco´s ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}	Invitrogen (Karlsruhe)
Rinderserumalbumin	Roche (Basel, Schweiz) (BSA; 100 mg/ml in IMDM)
Salzsäure (1M)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Schwefelsäure (H_2SO_4) 1M	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100 (t-Octylphenooxypoly-ethoxyethanol)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypanblau	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 %/1mM)	Invitrogen (Karlsruhe)
Zitronensäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2.1.5.1 Für die Fluoreszenzmarkierung verwendete Chemikalien

1,1´-Dioctadecyl-3,3,3´,3´-tetramethylindocarbocyanine-labeled Acetylated Low Density Lipoprotein (Dil-AcLDL)	Bio Trend (Köln) (Lipoprotein Low Density, acetylated human)

Quinacrine dihydrochloride (mepacrine)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DAPI (4´,6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

2.1.6 Kit für die $CD34^+$-Isolation

$CD34^+$ Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

2.1.7 Weitere Materialien

Blutabnahmebeutel	Fresenius Biotech (Bad Homburg)
CPDA-Monovetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Einmalspritzen, steril, 1 ml, 10 ml, 20 ml	B. Braun (Melsungen)
Gelatinegel (10%)	Invitrogen (Karlsruhe)
Gewebekulturplatten, 96-well,	Nunc (Roskilde, Dänemark) flacher Boden
Gewebekulturplatten, 6- und 24-well,	BD Falcon, (Franklin Lakes, USA) flacher Boden
Gewebekulturschalen, 10 cm Durchmesser	Greiner (Flacht)
Kanülen 20 G $1^{1/2}$ 0,9 x 40 mm	BD Microlance (Franklin Lakes, USA)
LS+, Large Cell (Magnetseparationssäulen)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Petrischalen 35/10 mm, 94/16 mm	Greiner (Flacht)
Pipetten, steril, 50 ml, 25 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml	BD Falcon (Franklin Lakes, USA)
Pipettenspitzen	Greiner (Flacht)
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf (Hamburg)
Sterilfilter 0,22 µm, Millex	Millipore (Billerica, USA)
Zellkulturflaschen 12,5 cm^2, 25 cm^2, 75 cm^2	BD Falcon (Franklin Lakes, USA)
Zellsiebe 100 µm, Nylon	BD Falcon (Franklin Lakes, USA)
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner (Flacht)

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Zellen

2.2.1.1 Isolierung humaner Thrombozyten

20 ml venöses Blut von gesunden Spendern wurden jeweils in Spritzen mit 4 ml Azid-Zitrat-Dextrose-Puffer entnommen. Aus den Spritzen wurden je 10 ml vorsichtig in 15 ml Röhrchen überführt, um die Thrombozyten nicht zu aktivieren und diese bei 430 x g für 20 Minuten (min) ohne Bremse zentrifugiert. Je 10 ml plättchenreiches Plasma (PRP) wurden mit einer Pipette in ein 50 ml Röhrchen überführt, mit Tyrodes-HEPES-Puffer (pH 6,5) auf 35 ml verdünnt und bei 900 x g für 10 min mit Bremse zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes mittels einer Pipette wurde das entstandene Pellet mit Tyrodes-HEPES-Puffer (pH 6,5 und pH 7,5 im Verhältnis 1:1) gelöst. Von der entstandenen Thrombozytensuspension wurden 20 µl mit 180 µl Tyrodes-HEPES-Puffer (pH 7,4) in Eppendorf-Gefäße (1:10 Verdünnung) für die Bestimmung der Thrombozytenzahl pro ml im Zellzählgerät resuspendiert [126, 145].

2.2.1.2 Isolierung humaner Monozyten

Die Monozyten-Isolierung erfolgte mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation. Venöses Blut gesunder Spender wurde in CPDA-Monovetten entnommen und unter Bildung von zwei Phasen langsam in mit 25 ml Ficoll Paque vorbeladene 50 ml Röhrchen überführt und bei 600 x g für 17 min ohne Bremse zentrifugiert. Die weißlich-trübe Zwischenschicht wurde mit PBS aufgefüllt und bei 720 x g für 10 min mit Bremse zentrifugiert. Dann wurde der Überstand entfernt und der Waschvorgang wiederholt. Die dadurch gewonnenen Zellen im Pellet wurden in 2 ml RPMI 1640 Medium (+ 10 % FCS, + 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) resuspendiert und über Nacht mit RPMI 1640 Medium in 6-Loch-Platten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium mit den sich darin befindenden nicht adhärenten Lymphozyten entfernt.

Jedes Loch in der Loch-Platte wurde mit 1 ml PBS dreimal steril gewaschen. Um die am Boden adhärenten Monozyten abzulösen, wurde nach Zugabe von jeweils 500 µl Trypsin (0,25 %/1 mM) pro Loch resuspendiert. Die Zellsuspension mit dem Trypsin wurde in einem 50 ml Röhrchen mit RPMI Medium (+ 20 % humanes Serum) gesammelt. Die Zellsuspension mit dem Trypsin wurde anschließend mit RPMI 1640 Medium (+ 20 % humanes Serum) bei 720 x g für 10 min zentrifugiert, das Pellet wieder mit 2 ml RPMI 1640 Medium (+ 20 % humanes Serum) resuspendiert. Anschließend wurde die Monozytenzahl in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Ko-Kultivierung der Monozyten mit Thrombozyten erfolgte analog der Ko-Kultivierung von $CD34^+$-Progenitorzellen mit Thrombozyten in 96-Lochplatten [145].

2.2.1.3 Isolierung humaner $CD34^+$-Progenitorzellen

Die Isolierung von $CD34^+$-Progenitorzellen wurde von der Ethik-Kommission der Universität Tübingen und der Universität Stuttgart (Projekt-Nr. 76/2005) genehmigt. Das dabei verwendete Nabelschnurblut war maximal 12 Stunden alt. Heparin oder Zitrat Phosphat Dextrose (CPD) verhinderten seine Gerinnung. Es erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation über Biocoll bei 600 x g für 15 min. Durch ein MACS–System (Magnetic Activated Cell Sorting) wurden mittels $CD34^+$ Cell Isolation Kit CD34-exprimierende Zellen isoliert. $CD34^+$ MicroBeads führten zu einer direkten magnetischen Markierung der $CD34^+$-Progenitorzellen. Die in einem magnetischen Feld positive Vario-MACS-Separationssäule (LS+) wurde mit einer Pufferlösung gespült, anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Die Säule und die aufgrund der magnetischen Markierung mittels MicroBeads an ihr haftenden $CD34^+$-Zellen wurden außerhalb des Magnetbereichs in zwei Vorgängen mit einer Pufferlösung aus der Säule gespült [126, 145].

2.2.2 Ko-Kultivierung von Monozyten und CD34$^+$-Progenitorzellen mit Thrombozyten

Es wurden zwei Arten von Ko-Kulturen verwendet: Ko-Kulturen mit CD34$^+$-Progenitorzellen und Thrombozyten sowie Ko-Kulturen mit Monozyten und Thrombozyten.

Die Ko-Kultivierung erfolgte in 96-Lochplatten. Um das Anhaften der CD34$^+$-Progenitorzellen an die Oberfläche der Lochplatten zu ermöglichen, wurden die Platten mit ca. 50 µl Gelatine (0,2 %) bedeckt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Gelatine komplett abgesaugt. Für die Ko-Kultur von CD34$^+$-Progenitorzellen mit Thrombozyten wurden die CD34$^+$-Zellen mit Tyrodes-HEPES-Puffer (pH 7,4) auf 3,3 x 10^5/ml eingestellt. Davon wurden 150 µl mit jeweils 50 µl Thrombozyten 8 x 10^8/ml in jedes Loch der 96-Loch-Platte gegeben und in IMDM-Medium bei 37 °C ko-kultiviert.

Für die Monozyten-Thrombozyten-Ko-Kulturen wurden 150 µl Monozyten (Konzentration 3,3 x 10^5/ml) mit 50 µl Thrombozyten (Konzentration 8 x 10^8/ml) pro Loch in RPMI-Medium (+ 20 % humanes Serum) bei 37 °C ko-kultiviert. Die Ko-Kultivierung dauerte 7 bis 15 Tage. In dieser Zeit fand kein Mediumwechsel statt [145].

2.2.3 Mikroskopie und Markierung von Zellen

2.2.3.1 Lichtmikroskopie

Innerhalb von sechs bis acht Tagen entwickelten sich in den Ko-Kulturen aus Monozyten bzw. CD34$^+$-Progenitorzellen und Thrombozyten Schaumzellen.

Diese wurden alle zwei Tage im Lichtmikroskop unter 20-facher Vergrößerung ausgezählt, um einen quantitativen Vergleich der in den verschiedenen Löchern der 96-Lochplatten entstandenen Schaumzellen zu erhalten und mit der Farbkamera AxioCam MRc5 fotografiert. Um die Schaumzellzahl in den einzelnen Löchern zu ermitteln, wurde ein Objektivnetz mit einer Fläche von 156,25 mm^2 verwendet. Dieses war in 16 gleich große Quadrate unterteilt.

Eine Zelle wurde dann als Schaumzelle betrachtet, wenn ihre Fläche mindestens so groß wie ein Viertel der Fläche eines der 16 Quadrate im Netz war, eine runde Form aufwies und ihr Zytoplasma gleichmäßig „schaumig“, also wie von kleinen Körnern durchsetzt, aussah (Abbildung 2).

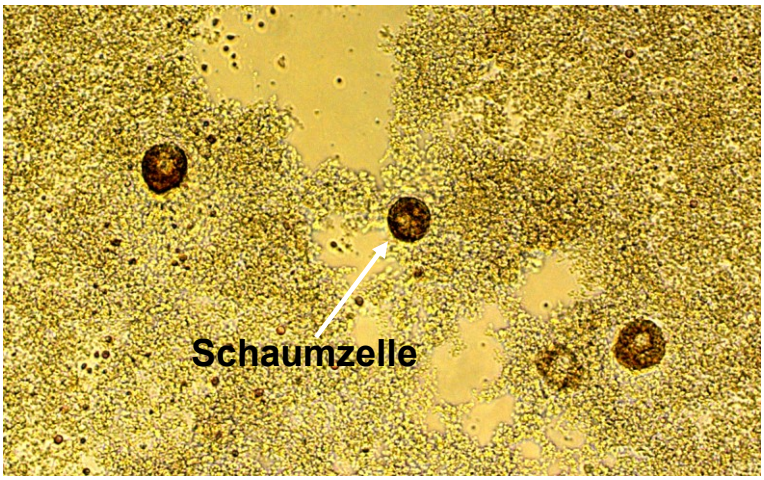


Abbildung 2: Schaumzellen bei 20-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop.

Die entstandenen Schaumzellen wurden in jedem Loch in acht verschiedenen Feldern ausgezählt und daraus der Mittelwert der Schaumzellen pro Loch berechnet.

2.2.3.2 Immunfluoreszenzfärbung von Schaumzellen

Schaumzellen, die in Ko-Kulturen aus $CD34^+$-Progenitorzellen und nativen Thrombozyten entstanden waren, wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI gefärbt, sodass die Schaumzellen im Immunfluoreszenzmikroskop aufgrund der roten Fluoreszenz ihrer mit DAPI gefärbten Kerne als rot fluoreszierende runde Zellen erschienen. Durch Bindung des grün fluoreszierenden anti-CD68-FITC-Antikörpers an den CD68-Rezeptor der Schaumzellen sollte der für Schaumzellen typische Rezeptor CD68 immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Die Schaumzellen wurden mit PBS gewaschen und zur Fixierung für 20 min mit 2% Formaldehyd in destilliertem Wasser (Aqua dest.) inkubiert. Anschließend erfolgten Waschschritte mit 2% Glycin in PBS (2x) und

PBS (1x). Um die Permeabilität der Zellen für die Farbstoffe zu erhöhen, wurden sie für 15 min mit 0,2% Triton-X 100 inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Nach einer Blockierung durch Inkubation mit 3% BSA in PBS für 20 min wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem anti-CD68-FITC-Antikörper (100 µl pro Million Schaumzellen) inkubiert und mit PBS gewaschen. Sie wurden danach für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 (Verdünnung 1:200 in PBS) als Negativkontrolle inkubiert und zwei mal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Kernfärbung mit dem Farbstoff DAPI, welcher in einer Verdünnung mit PBS von 1:3000 zugegeben wurde. Nach drei min erfolgte ein letzter Waschschritt mit PBS. Nach der Färbung wurden die Proben mit Fluorescent Mounting Medium eingedeckelt.

2.2.3.3 Markierung und Beladung von Thrombozyten für die Immunfluoreszenzmikroskopie und die Durchflusszytometrie

Um nachzuweisen, dass lipidbeladene Thrombozyten durch Schaumzellen phagozytiert werden und dies mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzmikroskopie darzustellen, wurden Thrombozyten mit Dil-AcLDL und Mepacrine beladen und Fluoreszenz-markiert. Für die Markierung wurden die Thrombozyten mit Tyrodes-HEPES-Puffer (pH 7,4) auf 2 x 10^7/ml eingestellt und jeweils 100 µl davon mit 4 µl Dil-AcLDL (2 µg/ml) und 4 µl Mepacrine (2 µM) oder nur mit 4 µl Dil-AcLDL (2 µg/ml) für vier Stunden in sterilen FACS-Röhrchen bei 37 °C bei Dunkelheit und unter Rotation in einem Hybridisierungsofen inkubiert. Danach wurden sie mit je 3 ml Tyrodes-HEPES-Puffer (pH 7,4) pro FACS-Röhrchen bei 560 x g für 5 min zentrifugiert und nach Abkippen wurde dieser Waschschritt wiederholt. Dadurch sollte das nicht von den Thrombozyten aufgenommene, freie Dil-AcLDL und Mepacrine entfernt werden. 50 µl der so markierten Thrombozyten wurden in jedes Loch der entsprechenden Ko-Kultur zugegeben. Nach frühestens acht Stunden erfolgte die Immunfluoreszenzmikroskopie, nach durchschnittlich 48 Stunden die durchflusszytometrische Analyse [145].

2.2.3.4 Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei der Darstellung der Phagozytose von Thrombozyten durch Schaumzellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurden mehrdimensionale Aufnahmen gemacht. Damit die optimale Leistung der Fluoreszenzlampe gewährleistet war, musste diese 20 min vor Beginn der Fluoreszenzaufnahmen eingeschaltet werden. Zunächst erfolgte eine schwarz-weiße Kontrollaufnahme der Ko-Kulturen im Durchlicht unter 20-facher Vergrößerung und ohne Fluoreszenzanregung. Dann wurde die Durchlicht-Beleuchtung am Mikroskop ausgeschaltet und die Fluorochrome in den Thrombozyten wurden durch den von der Fluoreszenzlampe emittierten Laser angeregt. Mit dem FITC-Filter wurden die nach Aufnahme Mepacrine-markierter Thrombozyten grün fluoreszierenden Schaumzellen aufgenommen, mit dem Rhodamine-Filter die nach Aufnahme Dil-AcLDL-beladener Thrombozyten rot fluoreszierenden Schaumzellen. Anschließend überlagerte man die Bilder der drei Kanäle [145].

2.2.4 Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometrie

2.2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht innerhalb eines sehr kurzen Zeitraumes die Untersuchung einer sehr großen Anzahl von Zellen. Die Zellen werden mittels eines Laserstrahls einzeln erfasst und analysiert. Das vom Laser ausgesandte Licht wird von einer Fokussierungslinse gebündelt und danach von den Zellen in der Messküvette gestreut. Durch nach vorne abgelenkte Strahlen, die auch als Vorwärtsstreulicht oder Forwardscatter (FSC) bezeichnet werden, wird die Größe der Zellen ermittelt. In einem 90°-Winkel seitlich abgelenkte Strahlen, das sogenannte Seitwärtsstreulicht oder Sidescatter (SSC), dienen der Erfassung der Zellgranularität.
Darüber hinaus können Zellen mit Antikörpern gegen bestimmte Zellstrukturen markiert werden. Diese Antikörper können mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sein (direkte Markierung) oder über einen fluoreszenzgekoppelten

Sekundärantikörper (indirekte Markierung) nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe nehmen einen Teil der Lichtenergie des auftreffenden Laserstrahls auf und emittieren Fluoreszenzlicht einer höheren Wellenlänge. Um dieses Fluoreszenzlicht spezifisch und sensitiv erfassen zu können, sind verschiedene optische Filter notwendig, die möglichst viel emittiertes Licht eines entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffes passieren lassen, dabei aber Fluoreszenzlicht anderer Farbstoffe möglichst stark ausblenden [146].

2.2.4.2 Vorbereitung und Messung von Zellen aus den $CD34^+$-Progenitorzellen/Monozyten-Thrombozyten-Ko-Kulturen am FACS-Gerät

Um die Phagozytose von mit acLDL beladenen Thrombozyten durch Schaumzellen durchflusszytometrisch zu untersuchen, wurden auf sieben bis neun Tage alte Ko-Kulturen mit Dil-AcLDL und Mepacrine markierte und beladene Thrombozyten zugegeben und für durchschnittlich 48 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Lösung der Schaumzellen wurde nach Abziehen des Überstandes jedes Loch mit PBS gespült. Die Spülflüssigkeit wurde in FACS-Röhrchen mit RPMI-Medium mit 10 % FCS gesammelt. Nach Inkubation mit Trypsin bei Dunkelheit für wenige min wurden die Zellen unter Resuspendieren vorsichtig aus der Loch-Platte gelöst und in die FACS-Röhrchen mit aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 500 x g für 5 min wurden die Zellen mit PFA (0,5 %) fixiert. Für die quantitative Ermittlung der Phagozytoseaktivität der Schaumzellen wurde im FL1-Kanal die Fluoreszenzintensität von Mepacrine, im FL2-Kanal die Fluoreszenzintensität von Dil-AcLDL gemessen [145]. Außerdem wurden Ko-Kulturen aus Monozyten/$CD34^+$-Progenitorzellen und Thrombozyten analog aus den Lochplatten gelöst und für 30 min bei Dunkelheit mit anti-CD68 FITC, anti-CD36 FITC und anti-MausIgG_1 FITC markiert. Durch Messung der Fluoreszenzintensität der direkt mit FITC markierten Antikörper gegen die für Schaumzellen spezifischen Scavenger-Rezeptoren CD68 und CD36 wurden die Schaumzellen identifiziert und quantitativ untersucht [145].

2.2.4.3 Durchführung der Messungen

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden am FACSCalibur der Neurologischen Klinik (Prof. Dr. A. Melms) und des Labors für Immunphänotypisierung der Medizinischen Klinik II (Prof. Dr. R. Möhle) durchgeführt.
Bei der Messung wurden positive Ereignisse prozentual über zweidimensionale Punktwolken („dot plots“) dargestellt, bei denen die Parameter Größe und Granularität gegeneinander aufgetragen waren. Für die Darstellung der Fluoreszenzintensitäten in den Histogrammen, in denen die Stärke des Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen wird, wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten relativ im Vergleich zum Kontroll-Antikörper dargestellt. In jeder Messung wurden 10 000 Zellen analysiert. Negativkontrollen mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten, unspezifischen Antikörpern desselben Isotyps wurden in den Messungen mitgeführt. Die Eigenfluoreszenz der Zellen wurde untersucht, indem man Messungen ungefärbter Ansätze durchführte [145].

2.2.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde der Student-t-Test verwendet.
Mittelwerte aus jeweils drei bis vier unabhängigen Versuchen wurden mit positiver und negativer Standardabweichung angegeben. Ein p-Wert $< 0,05$ zeigte dabei, dass die Unterschiede zwischen den verschiedenen Ergebniswerten signifikant waren.

3. Ergebnisse

3.1 Induktion der Schaumzellbildung aus CD34$^+$-Progenitorzellen durch Thrombozyten

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sich CD34$^+$-Progenitorzellen durch native Thrombozyten induziert zu Schaumzellen entwickeln [34, 126]. Schaumzellen zeichnen sich durch ein granuläres, „schaumig“ wirkendes Zytoplasma und eine lichtmikroskopisch sehr rund erscheinende Form aus, sind deutlich größer als undifferenzierte CD34$^+$-Progenitorzellen und exprimieren den für Schaumzellen typischen Oberflächenmarker CD68 (Abbildung 3 und 4). Die Ko-Kultivierung von CD34$^+$-Progenitorzellen (Konzentration 3,3 x 10^5/ml) mit nativen Thrombozyten (Konzentration 8 x 10^8/ml) bei 37 °C führte in dieser Arbeit innerhalb von sieben Tagen zur Entstehung von lichtmikrospkopisch nachweisbaren Schaumzellen (Abbildung 3) und bestätigte damit diese Ergebnisse. Im zeitlichen Verlauf wurden diese größer und zahlreicher.

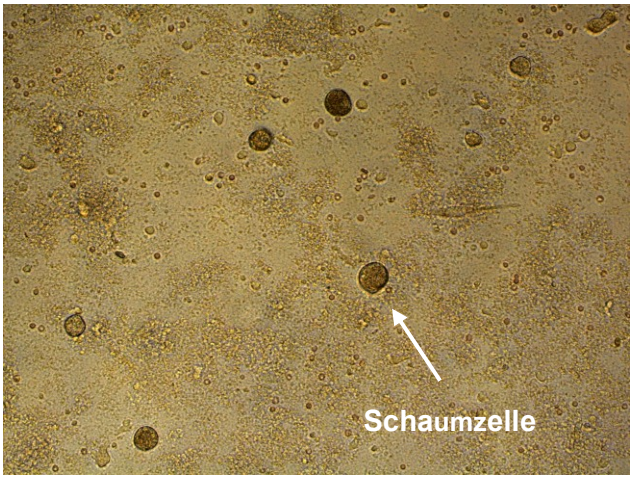


Abbildung 3: Schaumzellen, die sich aus CD34$^+$-Progenitorzellen durch native Thrombozyten induziert innerhalb von 15 Tagen entwickelt haben.

Um nachzuweisen, dass die aus den CD34$^+$-Prognitorzellen und nativen Thrombozyten entstandenen Zellen Schaumzellen sind, welche CD68 als typischen Schaumzellmarker exprimieren, wurde ein anti-CD68-FITC-Antikörper zugegeben. Dieser Antikörper bindet an den CD68-Rezeptor der Schaumzellen und leuchtet durch die direkte Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC

immunfluoreszenzmikroskopisch grün. Eine grüne Fluoreszenz von Zellen weist somit immunfluoreszenzmikroskopisch nach, dass es sich um Schaumzellen handelt. Als Negativkontrolle wurde der Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 verwendet, welcher immunfluoreszenzmikroskopisch ebenfalls grün fluoresziert. Die Schaumzellen wurden außerdem mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff DAPI gefärbt, sodass die Kerne der Zellen im Immunfluoreszenzmikroskop rot erschienen (Abbildung 4).

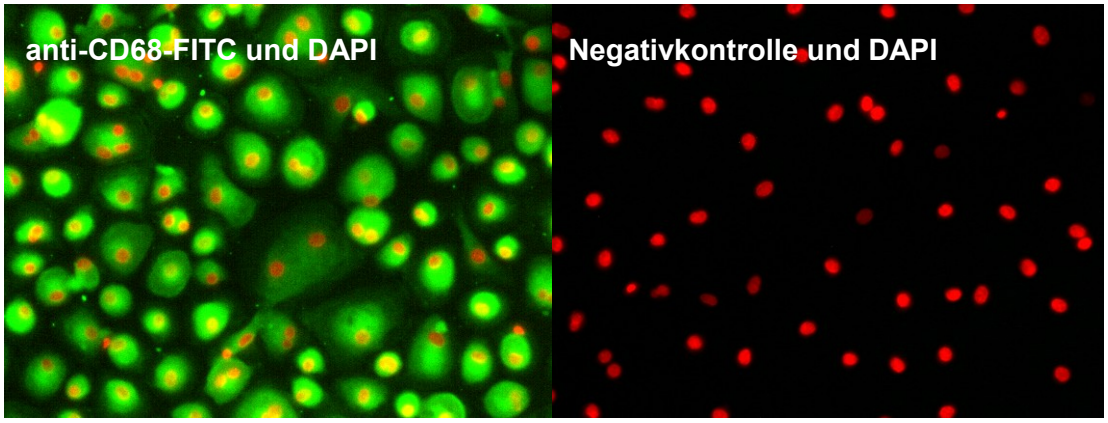


Abbildung 4: Die in den Ko-Kulturen mit CD34$^+$-Progenitorzellen und nativen Thrombozyten entstandenen Schaumzellen wurden durch den Nachweis des für Schaumzellen typischen Oberfächenmarkers CD68 in der Immunfluoreszenzmikroskopie als Schaumzellen identifiziert.
Der grün fluoreszierende anti-CD68-FITC-Antikörper bindet an den CD68-Rezeptor der Schaumzellen, sodass eine grüne Immunfluoreszenz der Zellen die Expression von CD68 nachweist. Die Zellkerne wurden mit dem rot fluoreszierenden Kernfarbstoff DAPI gefärbt. Als Negativkontrolle wurde Alexa Fluor 488 verwendet.

3.2 Induktion der Schaumzellbildung aus Monozyten durch Thrombozyten

Monozyten durchlaufen im Rahmen ihres Differenzierungsprozesses zu Schaumzellen eine Reihe von Veränderungen. Lipidbeladene Thrombozyten werden von Monozyten phagozytiert und führen zu einer Lipidakkumulation in deren Zytoplasma [115]. Native Thrombozyten können in vitro eine Zunahme der Granularität und Größe von Monozyten bewirken und somit die Entwicklung von Schaumzellen induzieren [125].

3.2.1 Etablierung der Methode der Thrombozyten-induzierten Schaumzellentwicklung aus Monozyten

Ausgehend von diesen Beobachtungen wurden Monozyten (Konzentration 3,3 x 10^5/ml) mit Thrombozyten (Konzentration 8 x 10^8/ml) bei 37 °C ko-inkubiert, um eine Entwicklung von Schaumzellen zu induzieren. Die morphologischen Veränderungen der Monozyten im zeitlichen Verlauf wurden lichtmikroskopisch erfasst. Nach sieben Tagen waren lichtmikropskopisch Schaumzellen nachweisbar, ihre Anzahl und Größe nahm im zeitlichen Verlauf bis Tag 15 zu (Abbildung 5).

Abbildung 5: Schaumzellen, die sich innerhalb von 15 Tagen Thrombozyten-induziert aus Monozyten entwickelt haben.

3.3. Inhibition der Thrombozyten-induzierten Entwicklung von Schaumzellen aus CD34$^+$-Progenitorzellen

Scavenger-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Schaumzellen über den klassischen Weg durch die Aufnahme modifizierter Lipoproteine in Monozyten und Makrophagen. CD36 und MSR-A sind maßgeblich an der Phagozytose von AcLDL und oxLDL in Makrophagen und an der daraus resultierenden Differenzierung dieser Zellen zu Schaumzellen beteiligt [12, 13, 33, 59]. LOX-1 trägt über die Bindung und Aufnahme von OxLDL ebenfalls zur Entwicklung von Schaumzellen bei [68, 69]. Schaumzellen entstehen

außerdem durch die Aufnahme lipidbeladener Thrombozyten, diesen Prozess bezeichnet man als alternativen Weg der Schaumzellentwicklung [117, 118].

In den bisher durchgeführten Experimenten wurden vor allem die Funktionen der Scavenger-Rezeptoren CD36, MSR-A und LOX-1 im klassischen Weg der Schaumzellbildung erforscht. Außerdem wurden Versuche durchgeführt, welche die Aufnahme apoptotischer Thrombozyten über Scavenger-Rezeptoren untersuchten [121-123]. Die im Folgenden beschriebene Versuchsreihe soll im Gegensatz dazu die Beteiligung der Scavenger-Rezeptoren an der alternativen Schaumzellentwicklung durch lipidbeladene Thrombozyten untersuchen.

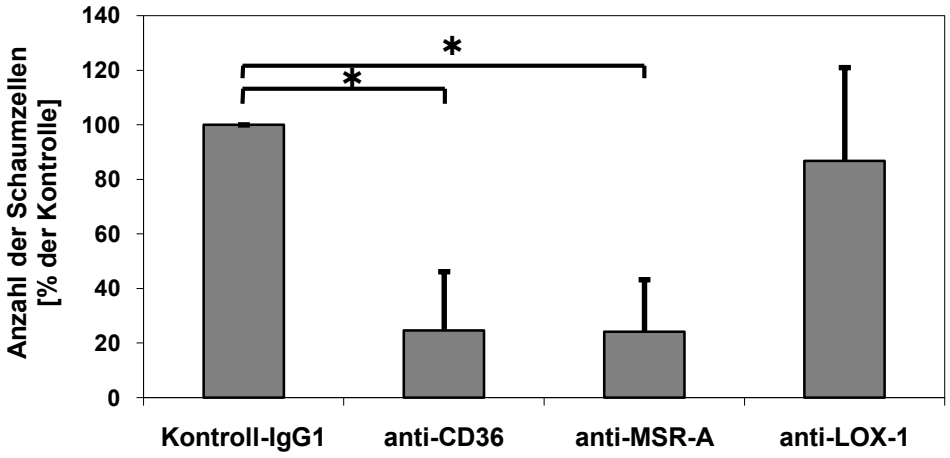
In dieser Reihe wurden Ko-Kulturen mit $CD34^+$-Progenitorzellen und Thrombozyten unter Zugabe blockierender Antikörper gegen die Scavenger-Rezeptoren CD36, MSR-A und LOX-1 bei 37 °C für 15 Tage inkubiert. Die Konzentration der $CD34^+$-Progenitorzellen betrug 3,3 x 10^5/ml, die Konzentration der Thrombozyten 8 x 10^8/ml. Als Kontroll-Antikörper diente der nicht-blockierende anti-MausIgG_1-Antikörper. Alle Antikörper wurden in einer Konzentration von 20 µg/ml sofort nach Ansetzen der Ko-Kultur zugegeben. Die Entstehung von Schaumzellen wurde quantitativ durch Zählung der sich entwickelnden Schaumzellen untersucht. An Tag 15 wurden die Schaumzellen ausgezählt. In allen Versuchen dieser Reihe waren nach Zugabe blockierender Antikörper gegen CD36 oder MSR-A an Tag 15 signifikant weniger Schaumzellen vorhanden als nach Zugabe des Kontroll-Antikörpers oder von anti-LOX-1 (Abbildung 6A). Anschließend wurde die Entwicklung von Schaumzellen in Abhängigkeit von den jeweils blockierten Scavenger-Rezeptoren im zeitlichen Verlauf untersucht. Schaumzellen waren bereits nach sieben Tagen mikroskopisch nachweisbar, deshalb begannen die Zählungen jeweils an Tag sieben. Sie erfolgten im Abstand von zwei Tagen und zeigten eine kontinuierliche Zunahme der Schaumzellbildung bis Tag 15. Die Zugabe von anti-CD36 und anti-MSR-A bewirkte eine signifikante Reduktion der bis Tag sieben entstandenen Schaumzellen im Vergleich zu anti-LOX-1 und zum Kontroll-Antikörper (Abbildung 6B, Tabelle 1). Das Gleiche galt für die Zählung an Tag 11. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Thrombozyten-induzierte Entwicklung von Schaumzellen aus $CD34^+$-Progenitorzellen durch

die Zugabe von anti-CD36 und anti-MSR-A effektiv und signifikant inhibiert wird.

	Kontroll-IgG$_1$ ± STABW	**anti-CD36** ± STABW	**anti-MSR-A** ± STABW	**anti-LOX-1** ± STABW
Tag 7	100 ± 0	0 ± 1,0	1 ± 1,8	62 ± 30,2
Tag 11	100 ± 0	15 ± 8,5	11 ± 9,1	71 ± 12,3
Tag 15	100 ± 0	25 ± 21,6	24 ± 19,2	87 ± 34,2

Tabelle 1: Schaumzellen, die sich in Ko-Kulturen aus CD34$^+$-Progenitorzellen und nativen Thrombozyten nach Blockade der Scavenger-Rezeptoren CD36, MSR-A und LOX-1 entwickelt haben.
Als Kontroll-Antikörper wurde anti-MausIgG$_1$ verwendet. Die Tabelle enthält die Mittelwerte aus jeweils drei bis vier Versuchen mit Standardabweichung. STABW = Standardabweichung.

A



B

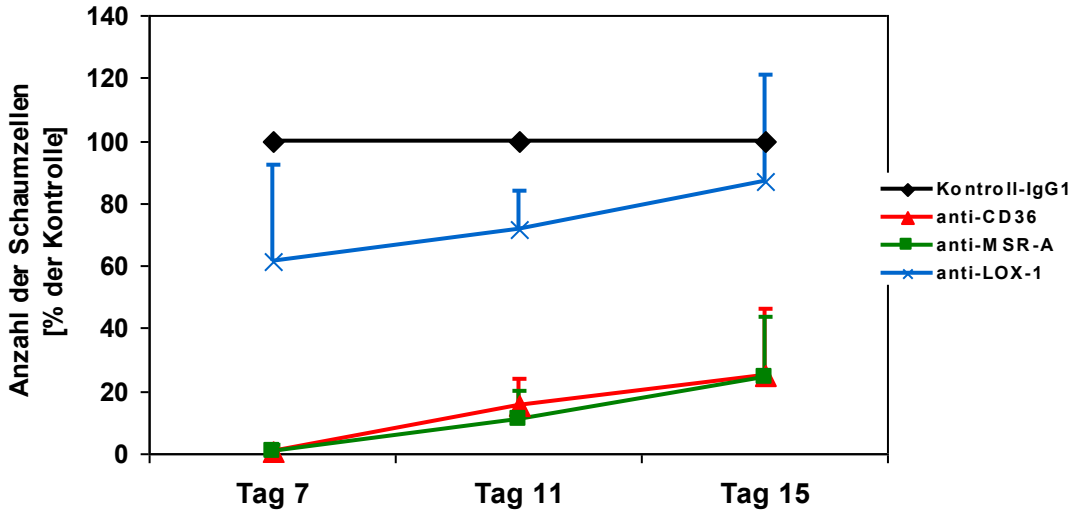


Abbildung 6: Inhibition der Entwicklung von Schaumzellen aus CD34$^+$-Progenitorzellen durch die Blockade von Scavenger-Rezeptoren.
(A) In Ko-Kulturen mit CD34$^+$-Progenitorzellen und nativen Thrombozyten wurden unmittelbar nach dem Ansetzen blockierende Antikörper gegen die Scavenger-Rezeptoren CD36, MSR-A und LOX-1 in einer Konzentration von 20 µg/ml zugegeben. Als nicht-blockierender Kontroll-Antikörper diente anti-MausIgG$_1$. Die Konzentration der CD34$^+$-Progenitorzellen betrug 3,3 x 10^5/ml, die Thrombozyten-Konzentration 8 x 10^8/ml. Die entstehenden Schaumzellen wurden im Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung ausgezählt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der bis Tag 15 entstandenen Schaumzellen aus drei bis vier Versuchen mit Standardabweichung. Alle Werte sind im Verhältnis zum Kontroll-Antikörper angegeben.
(B) Entwicklung der Schaumzellen im zeitlichen Verlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte der Zählungen von drei verschiedenen Zeitpunkten mit Standardabweichung.

Außerdem führte die Blockade von CD36 oder MSR-A zur verzögerten Schaumzellbildung. Morphologisch zeigten sich ebenfalls Unterschiede, die mittels Lichtmikroskopie unter 20-facher Vergrößerung erfasst wurden. Lochplatten, in welchen CD36- oder MSR-A-Rezeptoren blockiert waren, wiesen nicht nur weniger Schaumzellen insgesamt auf, sondern die Zellen waren auch kleiner und die für Schaumzellen typische Granularität des Zytoplasmas geringer. Gekörnte Zellen ab einer Größe von ungefähr 120 µm im Durchmesser wurden als Schaumzellen betrachtet. Sie erreichten eine Maximalgröße von ca. 200 µm (Abbildung 7).

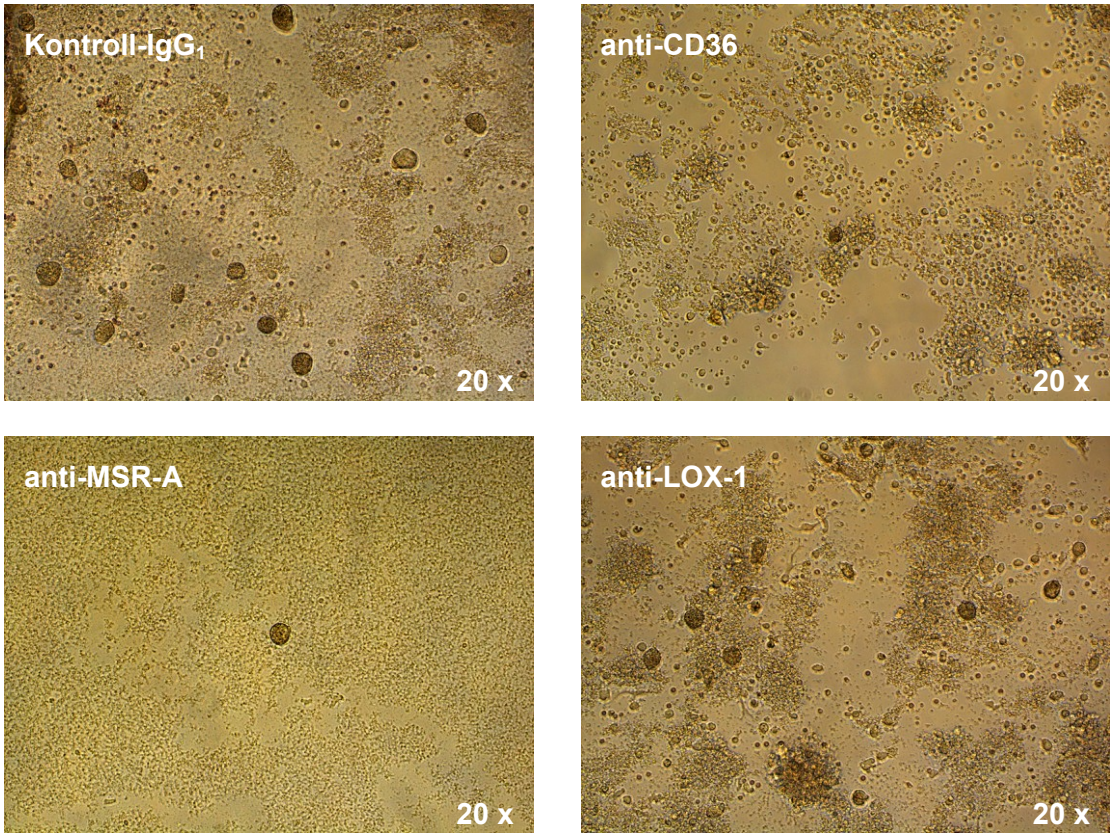


Abbildung 7: Vergleich der in Ko-Kulturen mit CD34$^+$-Progenitorzellen und nativen Thrombozyten entstandenen Schaumzellen in der Lichtmikroskopie bei 20-facher Vergrößerung.
In Ko-Kulturen mit CD34$^+$-Progenitorzellen (3,3 x 10^5/ml) und nativen Thrombozyten (8 x 10^8/ml) wurden unmittelbar nach dem Ansetzen Antikörper gegen CD36, MSR-A und LOX-1 in einer Konzentration von 20µg/ml zugegeben. An Tag 15 zeigten sich lichtmikroskopisch signifikant weniger und kleinere Schaumzellen, wenn CD36 und MSR-A blockiert worden waren als nach Zugabe von anti-LOX-1 oder dem Kontroll-Antikörper.

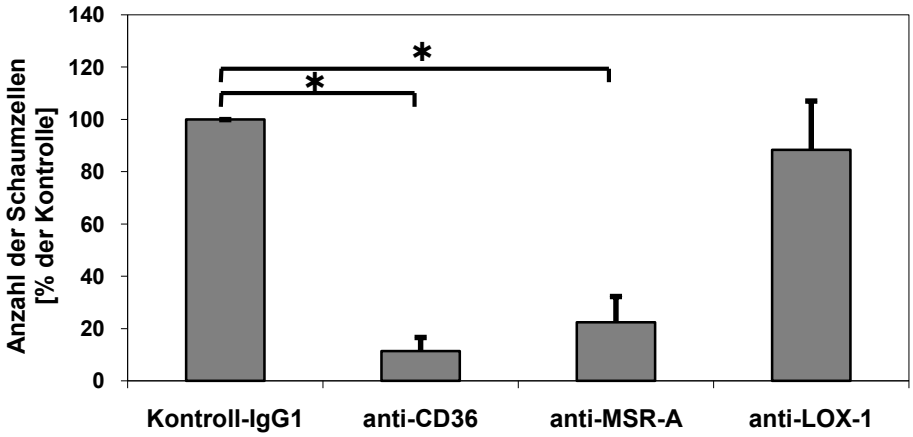
3.4 Inhibition der Thrombozyten-induzierten Entwicklung von Schaumzellen aus Monozyten

Die in 3.3 beschriebene Versuchsreihe wurde analog dazu auch mit Monozyten-Thrombozyten-Ko-Kulturen (Monozyten-Konzentration 3,3 x 10^5/ml, Thrombozyten-Konzentration 8 x 10^8/ml) durchgeführt. Die Differenzierung zu Schaumzellen innerhalb eines Zeitraumes von 15 Tagen wurde auch hier durch anti-CD36 und anti-MSR-A signifikant inhibiert im Vergleich zu anti-LOX-1 und dem nicht-blockierenden Kontroll-Antikörper anti-MausIgG_1 (Tabelle 2, Abbildung 8A und 8B).

	Kontroll-IgG_1 ± STABW	**anti-CD36** ± STABW	**anti-MSR-A** ± STABW	**anti-LOX-1** ± STABW
Tag 7	100 ± 0	1 ± 1,2	8 ± 14,4	47 ± 29,1
Tag 11	100 ± 0	8 ± 2,8	13 ± 10,6	76 ± 12,0
Tag 15	100 ± 0	11 ± 5,3	22 ± 9,8	88 ± 18,6

Tabelle 2: Schaumzellen, die sich in Ko-Kulturen aus Monozyten und nativen Thrombozyten nach Blockade der Scavenger-Rezeptoren CD36, MSR-A und LOX-1 entwickelt haben.
Als Kontroll-Antikörper wurde anti-MausIgG_1 verwendet. Die Tabelle enthält die Mittelwerte aus jeweils drei bis vier Versuchen mit Standardabweichung. STABW = Standardabweichung.

A



B

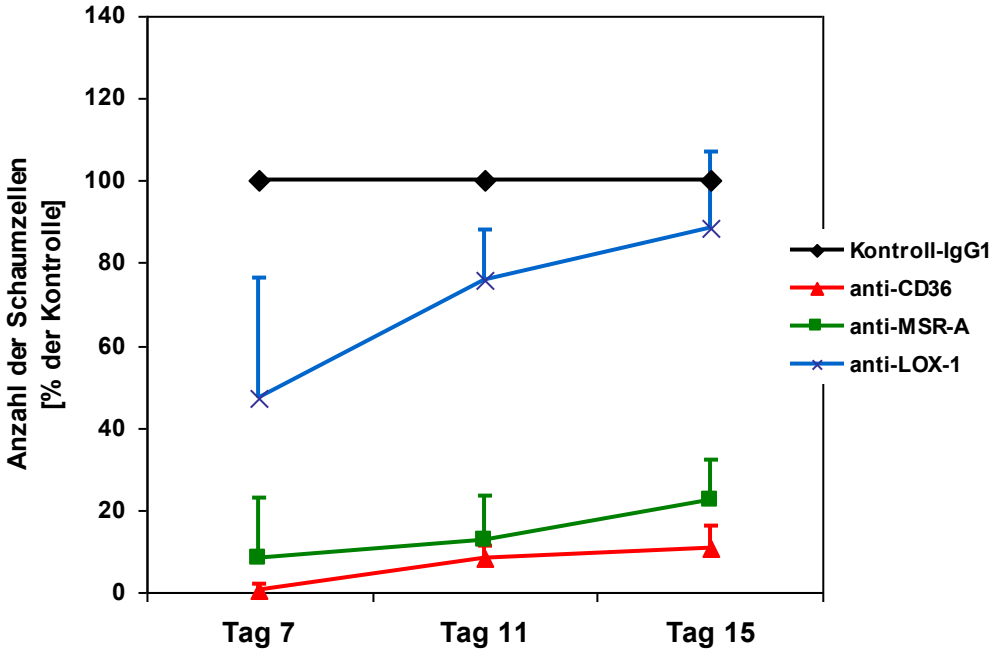


Abbildung 8: Inhibition der Entwicklung von Schaumzellen aus Monozyten durch die Blockade von Scavenger-Rezeptoren.
(A) In Ko-Kulturen mit Monozyten und nativen Thrombozyten wurden unmittelbar nach dem Ansetzen blockierende Antikörper gegen die Scavenger-Rezeptoren CD36, MSR-A und LOX-1 in einer Konzentration von 20 µg/ml zugegeben, als nicht-blockierender Kontroll-Antikörper diente anti-MausIgG_1. Die Konzentration der Monozyten betrug 3,3 x 10^5/ml, die Thrombozyten-Konzentration 8 x 10^8/ml. Die entstehenden Schaumzellen wurden im Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung ausgezählt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der bis Tag 15 entstandenen Schaumzellen aus drei bis vier Versuchen mit Standardabweichung. Alle Werte sind im Verhältnis zum Kontroll-Antikörper angegeben.
(B) Entwicklung der Schaumzellen im zeitlichen Verlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte der Zählungen von drei verschiedenen Zeitpunkten mit Standardabweichung.

Lichtmikroskopisch waren in Ko-Kulturen mit Monozyten und nativen Thrombozyten kleinere und signifikant weniger Schaumzellen nachweisbar, wenn unmittelbar nach Ansetzen der Ko-Kultur die Scavenger-Rezeptoren CD36 und MSR-A durch Antikörper blockiert worden waren als nach Blockade von LOX-1 oder nach Zugabe des Kontroll-Antikörpers (Abbildung 9).

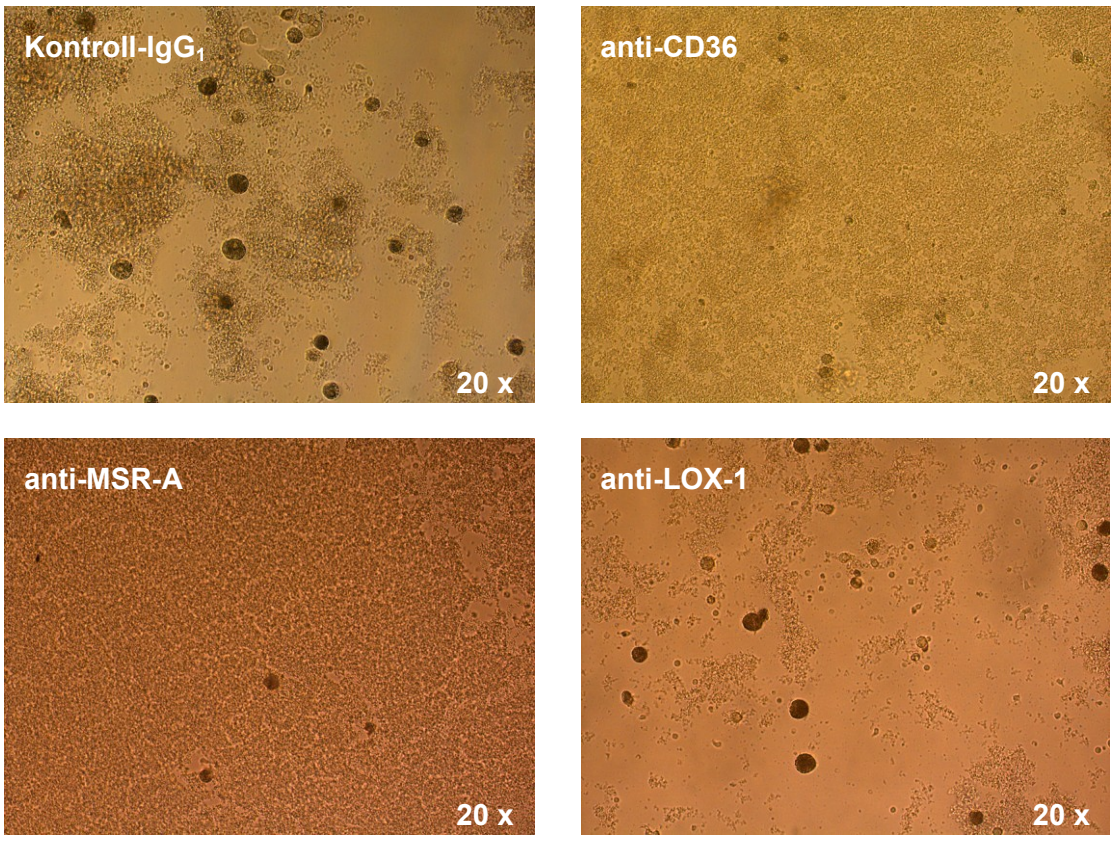


Abbildung 9: Vergleich der in Ko-Kulturen mit Monozyten und nativen Thrombozyten entstandenen Schaumzellen in der Lichtmikroskopie bei 20-facher Vergrößerung.
In Ko-Kulturen mit Monozyten (3,3 x 10^5/ml) und nativen Thrombozyten (8 x 10^8/ml) wurden unmittelbar nach dem Ansetzen Antikörper gegen CD36, MSR-A und LOX-1 in einer Konzentration von 20 µg/ml zugegeben. An Tag 15 zeigten sich lichtmikroskopisch signifikant weniger und kleinere Schaumzellen, wenn CD36 und MSR-A blockiert worden waren als nach Zugabe von anti-LOX-1 oder des Kontroll-Antikörpers anti-MausIgG_1.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen, dass die Scavenger-Rezeptoren CD36 und MSR-A die Thrombozyten-induzierte Differenzierung von Schaumzellen aus $CD34^+$-Progenitorzellen und Monozyten inhibieren, indem sie zu einer verzögerten Entwicklung von Schaumzellen führen. Darüber hinaus sind die entstandenen Schaumzellen bei Blockade der CD36- und MSR-A-Rezeptoren kleiner als bei Blockade der LOX-1-Rezeptoren bzw. nach Zugabe des Kontroll-Antikörpers.

3.5 Phagozytose lipidbeladener Thrombozyten durch Schaumzellen

Die Phagozytose lipidbeladener Thrombozyten durch Monozyten stellt neben der Thrombozyten-induzierten Differenzierung von Monozyten zu Schaumzellen einen weiteren Mechanismus der Schaumzellentwicklung dar [115, 117, 118, 125]. Mit der ersten Versuchsreihe wurde gezeigt, dass die Blockade der Scavenger-Rezeptoren CD36 und MSR-A die durch native Thrombozyten induzierte Entwicklung von Schaumzellen aus $CD34^+$-Progenitorzellen und Monozyten signifikant inhibiert. Aufgrund dieses Ergebnisses stellte sich die Frage, ob eine Blockade von CD36 und MSR-A auch die Schaumzellentwicklung über die Phagozytose lipidbeladener Thrombozyten verhindern kann. Diese Fragestellung bildete die Grundlage für die zweite Versuchsreihe.

Dabei wurde zunächst die Phagozytose lipidbeladener Thrombozyten durch Schaumzellen, die sich in Ko-Kulturen mit $CD34^+$-Progenitorzellen und nativen Thrombozyten entwickelt hatten, immunfluoreszenzmikroskopisch ohne Blockade von Scavenger-Rezeptoren untersucht. Thrombozyten wurden dazu mit AcLDL, das an den rot fluoreszierenden Farbstoff Dil gekoppelt war, beladen und zu den Schaumzellen gegeben.

Anschließend wurden die Schaumzellen immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Schaumzellen waren zunächst von rot fluoreszierenden Thrombozyten umgeben, zeigten unmittelbar nach Zugabe der markierten Thrombozyten selbst aber keine Fluoreszenzaktivität. Nach zwölf Stunden hatte die Dichte rot fluoreszierender Thrombozyten um die Schaumzellen abgenommen, aber die Schaumzellen selbst fluoreszierten nun ebenfalls rot,

wodurch immunfluoreszenzmikroskopisch eindeutig die Phagozytose der lipidbeladenen und markierten Thrombozyten nachgewiesen war (Abbildung 10).

A

B

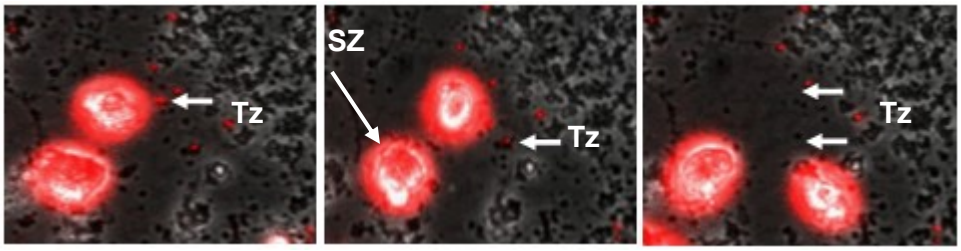


Abbildung 10: Nachweis der Phagozytose lipidbeladener und fluoreszenzmarkierter Thrombozyten durch Schaumzellen in der Immunfluoreszenzmikroskopie.
A. Schaumzellen, die sich durch native Thrombozyten induziert innerhalb von sieben Tagen aus $CD34^+$-Progenitorzellen differenziert haben.
B. Schaumzellen nach Zugabe Dil-AcLDL-beladener Thrombozyten. Dil ist ein rot fluoreszierender Farbstoff, der an das modifizierte Lipoprotein AcLDL gekoppelt wurde. Eine rote Imunfluoreszenz von Schaumzellen weist damit immunfluoreszenzmikroskopisch eindeutig die Aufnahme lipidbeladener Thrombozyten nach. SZ = Schaumzelle, Tz = Thrombozyten.

3.5.1 Phagozytose durch Schaumzellen aus $CD34^+$-Progenitorzellen

In Ko-Kulturen mit $CD34^+$-Progenitorzellen und nativen Thrombozyten wurden nach sieben Tagen Antikörper gegen die Scavenger-Rezeptoren CD36, MSR-A und LOX-1 in einer Konzentration von 20 µg/ml zugegeben und die Lochplatten für zwei Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, damit die Antikörper an ihre spezifischen Rezeptoren binden konnten. Als nicht-blockierender Kontroll-Antikörper wurde anti-MausIgG_1 verwendet. Die Konzentration der $CD34^+$-Progenitorzellen betrug 3,3 x 10^5/ml, die Thrombozyten-Konzentration

8 x 10^8/ml. Anschließend wurden mit DiI-AcLDL und Mepacrine beladene und markierte Thrombozyten in einer Konzentration von 2 x 10^7/ml auf die Ko-Kulturen gegeben. Mepacrine ist ein grün fluoreszierender Farbstoff, den Thrombozyten aufnehmen und in ihren dichten Granula (δ-Granula) ablagern [147, 148]. AcLDL wird als modifiziertes Lipoprotein im Zytoplasma von Thrombozyten gespeichert [112, 145, 149, 150]. Durch seine Bindung an den fluoreszierenden Farbstoff DiI leuchten mit DiI-AcLDL beladene Thrombozyten im Immunfluoreszenzmikroskop rot. Die Phagozytose der Thrombozyten durch die Schaumzellen wurde nach 24 h mittels Immunfluoreszenzmikroskopie semiquantitativ dargestellt. Schaumzellen, die Mepacrine-markierte Thrombozyten aufgenommen hatten, fluoreszierten unter Verwendung eines FITC-Filters grün. Nach Phagozytose DiI-AcLDL beladener Thrombozyten fluoreszierten die Schaumzellen mittels eines Rhodamin-Filters rot. Die grüne Fluoreszenz von Zellen wies damit eindeutig die Aufnahme von Mepacrine-markierten Thrombozyten nach, eine rote Fluoreszenz bewies die Phagozytose von thrombozytär gebundenem DiI-AcLDL. Die beiden Fluoreszenzaufnahmen und das Lichtmikroskopbild wurden überlagert. Dadurch leuchteten Schaumzellen, die sowohl Mepacrine- als auch DiI-AcLDL beladene Thrombozyten aufgenommen hatten, gelb. Um auszuschließen, dass die Fluoreszenz der Schaumzellen auf der Phagozytose von freiem, nicht thrombozytär gebundenem DiI-AcLDL oder Mepacrine beruhte, wurde freier Farbstoff vor der Zugabe der Thrombozyten mit zwei Waschschritten entfernt.

In den Lochplatten, in die anti-CD36 oder anti-MSR-A zugegeben worden war, fanden sich weniger fluoreszierende Schaumzellen, d.h. Schaumzellen, die fluoreszenzmarkierte Thrombozyten aufgenommen hatten, als in den Lochplatten, die mit anti-LOX-1 oder dem Kontroll-Antikörper anti-MausIgG_1 versetzt worden waren. Die Blockade von CD36 und MSR-A auf den Schaumzellen bewirkte also eine im Immunfluoreszenzmikroskop eindeutig darstellbare Verminderung der Phagozytose lipidbeladener Thrombozyten. Lochplatten, die mit anti-MausIgG_1 oder anti-LOX-1 inkubiert worden waren, zeigten aber nicht nur mehr fluoreszierende Schaumzellen, sondern auch einen größeren Thrombozyten-freien Hof um die fluoreszierenden Zellen als Indikator

dafür, dass die Mehrzahl der Thrombozyten in der näheren Umgebung der Schaumzellen von diesen phagozytiert worden war. Passend dazu zeigte die Umgebung von Schaumzellen mit blockierten CD36- oder MSR-A-Rezeptoren aufgrund der schwächeren Phagozytose-Aktivität eine höhere Thrombozyten-Dichte (Abbildung 11).

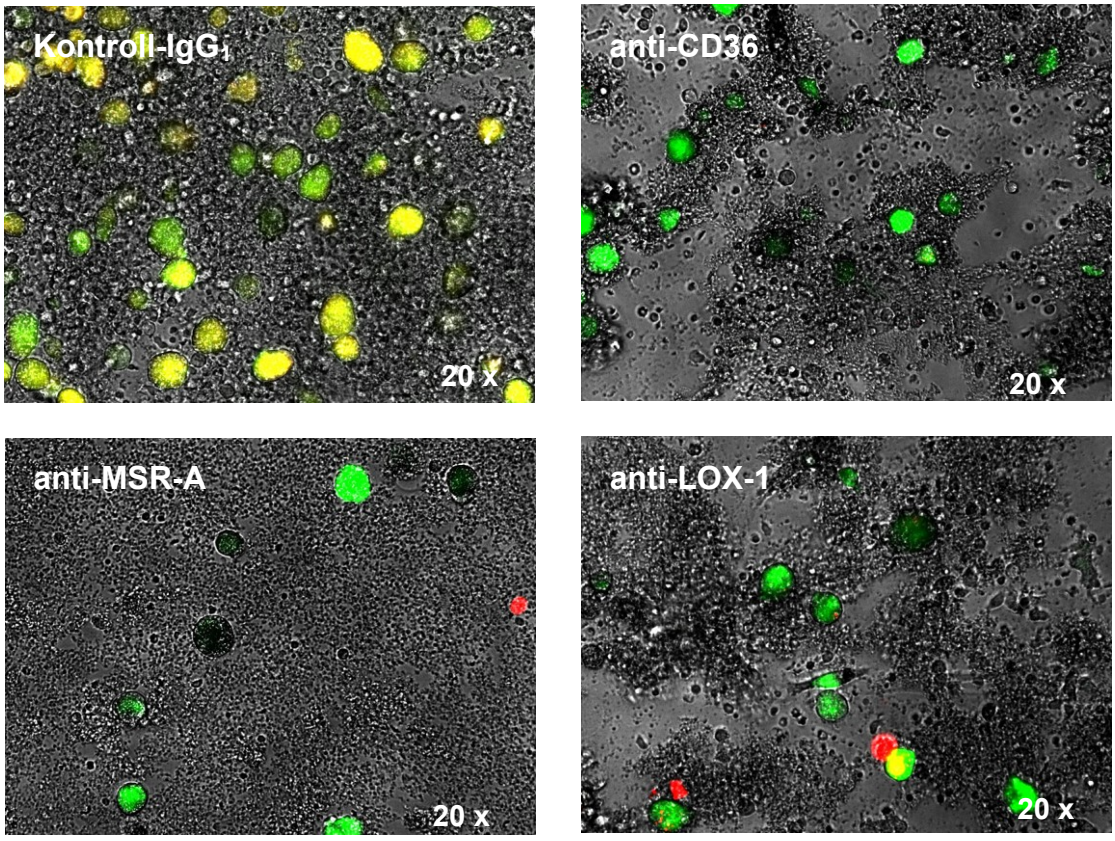


Abbildung 11: Phagozytose markierter und beladener Thrombozyten durch Schaumzellen, die sich aus CD34$^+$-Progenitorzellen entwickelt haben.
In Ko-Kulturen mit CD34$^+$-Progenitorzellen (3,3 x 10^8/ml) und Thrombozyten (8 x 10^8/ml) wurden nach sieben Tagen die Scavenger-Rezeptoren CD36, MSR-A und LOX-1 durch Antikörper in einer Konzentration von 20 µg/ml blockiert. Zwei Stunden später wurden mit Mepacrine und Dil-AcLDL markierte und beladene Thrombozyten (2 x 10^7/ml) zugegeben. Nach 24 Stunden wurden die Ko-Kulturen immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Phagozytose Mepacrine-markierter Thrombozyten ließ die Schaumzellen grün fluoreszieren, die Aufnahme Dil-AcLDL-beladener Thrombozyten bewirkte eine rote Fluoreszenz. Die beiden Aufnahmen und das Lichtmikroskopbild wurden überlagert. Zellen, die sowohl Mepacrine- als auch Dil-AcLDL beladene Thrombozyten phagozytiert hatten, stellten sich dadurch gelb dar. Nach Blockade der Scavenger-Rezeptoren CD36 und MSR-A nahmen Schaumzellen die markierten und beladenen Thrombozyten in geringerem Ausmaß auf als nach Zugabe von anti-LOX-1 oder des Kontroll-Antikörpers, sodass weniger fluoreszierende Schaumzellen beobachtet werden konnten.

3.5.2 Phagozytose durch Schaumzellen aus Monozyten

Der in 3.5.1 beschriebene Versuch wurde mit Schaumzellen, die sich in Ko-Kulturen mit Monozyten und nativen Thrombozyten entwickelt hatten, entsprechend durchgeführt. Nach sieben Tagen wurden die Scavenger-Rezeptoren CD36, MSR-A und LOX-1 durch Antikörper in einer Konzentration von 20 µg/ml blockiert, als Kontroll-Antikörper diente anti-MausIgG_1. Nach zwei Stunden wurden mit Dil-AcLDL und Mepacrine beladene und markierte Thrombozyten zugegeben. Diese wurden von den Schaumzellen phagozytiert. Immunfluoreszentmikroskopisch ließ eine Phagozytose Dil-AcLDL beladener Thrombozyten die Schaumzellen rot fluoreszieren, eine Aufnahme Mepacrine-markierter Thrombozyten bewirkte eine grüne Fluoreszenz der Schaumzellen. Hatten die Schaumzellen Dil-AcLDL und Meparine beladene und markierte Thrombozyten phagozytiert, leuchteten sie durch die Überlagerung der beiden Aufnahmen immunfluoreszenzmikroskopisch gelb. Lochplatten, in welchen CD36- oder MSR-A-Rezeptoren blockiert waren, wiesen immunfluoreszenzmikroskopisch weniger fluoreszierende Schaumzellen auf als Lochplatten, in welche anti-LOX-1 oder der Kontroll-Antikörper zugegeben worden war (Abbildung 12).

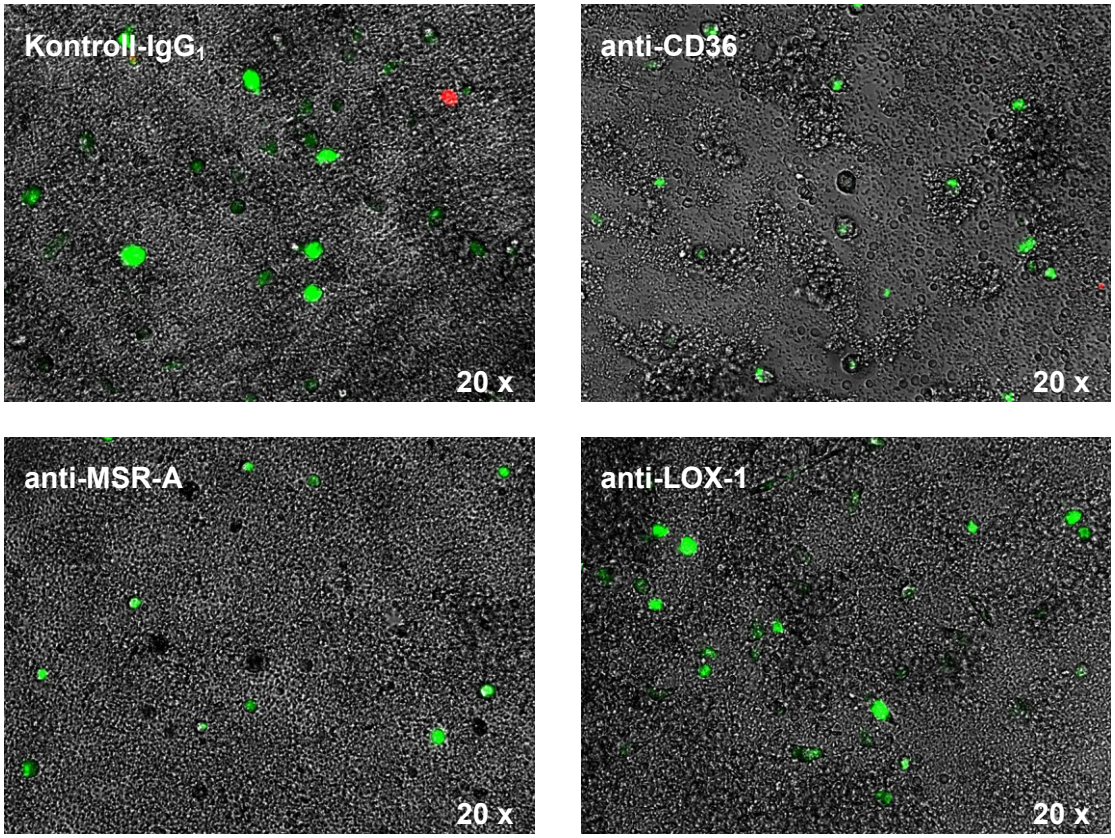


Abbildung 12: Phagozytose markierter und beladener Thrombozyten durch Schaumzellen, die sich aus Monozyten entwickelt haben.
In Ko-Kulturen mit Monozyten (3,3 x 10^5/ml) und Thrombozyten (8 x 10^8/ml) wurden nach sieben Tagen die Scavenger-Rezeptoren CD36, MSR-A und LOX-1 durch Antikörper (20 µg/ml) blockiert. Zwei Stunden später wurden mit Mepacrine und Dil-AcLDL markierte und beladene Thrombozyten (2 x 10^7/ml) zugegeben. Nach 24 Stunden wurden die Ko-Kulturen immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Phagozytose Mepacrine-markierter Thrombozyten ließ die Schaumzellen grün fluoreszieren, die Aufnahme Dil-AcLDL-beladener Thrombozyten bewirkte eine rote Fluoreszenz. Die beiden Aufnahmen und das Lichtmikroskopbild wurden überlagert. Zellen, die sowohl Mepacrine- als auch Dil-AcLDL beladene Thrombozyten phagozytiert hatten, stellten sich dadurch gelb dar. Nach Blockade der Scavenger-Rezeptoren CD36 und MSR-A nahmen Schaumzellen die markierten und beladenen Thrombozyten in geringerem Ausmaß auf als nach Zugabe von anti-LOX-1 oder des Kontroll-Antikörpers anti-MausIgG_1, sodass weniger fluoreszierende Schaumzellen beobachtet werden konnten.

3.5.3 Durchflusszytometrische Analyse der Phagozytose lipidbeladener Thrombozyten durch Schaumzellen mit blockierten Scavenger-Rezeptoren

Zur quantitativen Erfassung der Unterschiede in der Phagozytose lipidbeladener Thrombozyten bei Blockade verschiedener Scavenger-Rezeptoren wurden die Schaumzellen 48 Stunden nach Zugabe der markierten Thrombozyten mit Trypsin aus den Lochplatten gelöst, mit PFA fixiert und im Durchflusszytometer untersucht. Diese Versuchsreihe wurde wieder sowohl mit Schaumzellen durchgeführt, die sich durch native Thrombozyten induziert aus $CD34^+$-Progenitorzellen entwickelt hatten, als auch mit Schaumzellen, die Thrombozyten-induziert aus Monozyten entstanden waren. Die mittlere Fluoreszenzintensität von Dil-AcLDL wurde im FL2-Kanal gemessen, die mittlere Fluoreszenzintensität von Mepacrine im FL1-Kanal. Hohe mittlere Fluoreszenzwerte im FL1-Kanal zeigten dabei eine starke Phagozytose-Aktivität der Zellen bezüglich Fluoreszenz-markierter Thrombozyten an, hohe mittlere Fluoreszenzwerte im FL2-Kanal bewiesen die starke Aufnahme von thrombozytär gebundenem und mit Dil markiertem AcLDL. In der durchflusszytometrischen Messung ergab sich eine signifikant niedrigere mittlere Fluoreszenzintensität der Schaumzellen, deren CD36- und MSR-A-Rezeptoren zuvor mit spezifischen Antikörpern blockiert worden waren im Vergleich zu den Schaumzellen, die mit anti-LOX-1 oder dem Kontroll-Antikörper anti-MausIgG_1 behandelt worden waren. Dies wurde für Schaumzellen, die sich aus $CD34^+$-Progenitorzellen entwickelt hatten, jeweils in beiden Kanälen beobachtet (Abbildung 13, 14, 15, Tabelle 3). Schaumzellen, die aus Monozyten entstanden waren, wiesen bei blockierten CD36- und MSR-A-Rezeptoren eine signifikant niedrigere Fluoreszenz-Aktivität bezüglich Dil-AcLDL auf als bei blockierten LOX-1-Rezeptoren oder nach Zugabe des Kontroll-Antikörpers. Die auf Mepacrine zurückzuführende mittlere Fluoreszenzaktivität war nach Zugabe von anti-CD36 signifikant und nach Zugabe von anti-MSR-A tendenziell niedriger im Vergleich zu anti-LOX-1 und zum Kontroll-Antikörper (Abbildung 16, 17, 18, Tabelle 4).

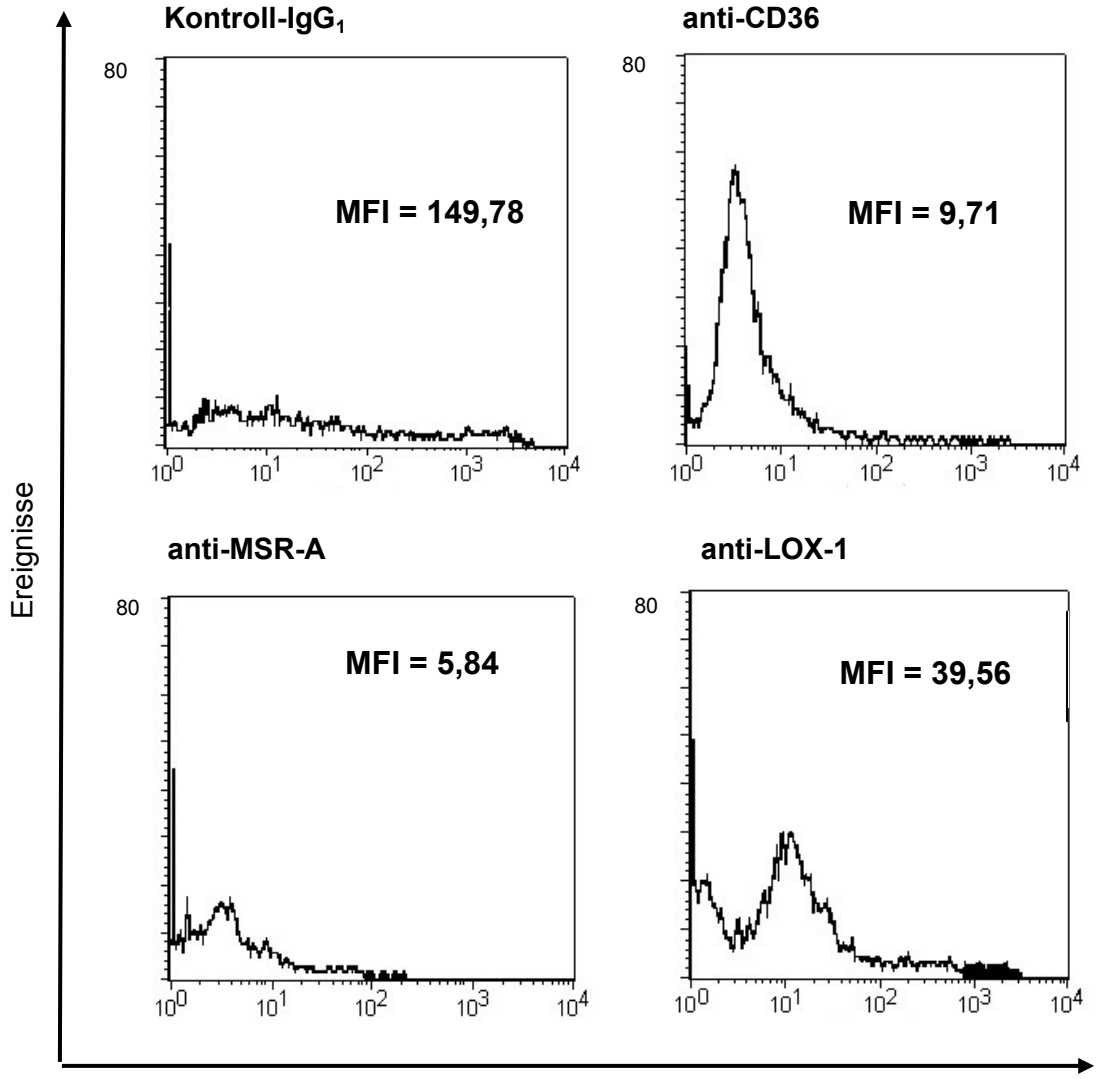
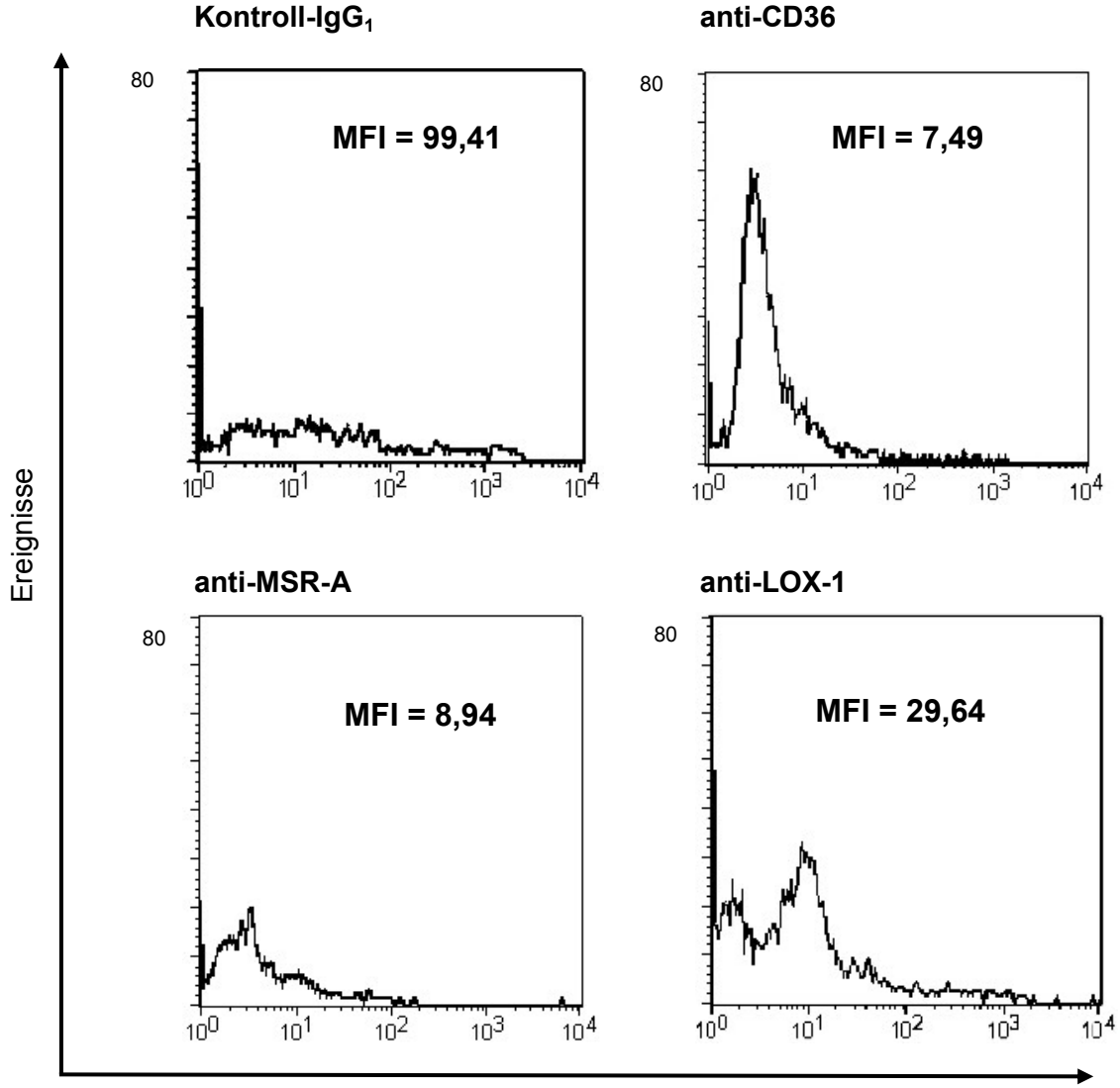


Abbildung 13: Phagozytoseaktivität der aus CD34$^+$-Progenitorzellen differenzierten Schaumzellen bezüglich Mepacrine-markierter Thrombozyten im Histogramm.
Nach sieben Tagen wurden in Ko-Kulturen mit CD34$^+$-Progenitorzellen (3,3 x 10^5/ml) und nativen Thrombozyten (8 x 10^8/ml) anti-CD36, anti-MSR-A oder anti-LOX-1 (20 µg/ml) sowie zwei Stunden später mit dem fluoreszierenden Farbstoff Mepacrine markierte Thrombozyten (2 x 10^7/ml) zugegeben. Die durch die Aufnahme markierter Thrombozyten vermittelte mittlere Fluoreszenzintensität der Schaumzellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Zellen, deren CD36- oder MSR-A-Rezeptoren durch Antikörper blockiert waren, wiesen signifikant niedrigere Fluoreszenzintensitäten als Maß ihrer Phagozytose-Aktivität bezüglich Mepacrine-markierter Thrombozyten auf als Zellen mit blockierten LOX-1-Rezeptoren oder nach Zugabe des Kontroll-IgG$_1$.



Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der aus $CD34^+$-Progenitorzellen differenzierten Schaumzellen

Abbildung 14: Phagozytoseaktivität der aus $CD34^+$-Progenitorzellen differenzierten Schaumzellen bezüglich DiI-AcLDL-beladener Thrombozyten im Histogramm.
Nach sieben Tagen wurden in Ko-Kulturen mit $CD34^+$-Progenitorzellen (3,3 x 10^5/ml) und nativen Thrombozyten (8 x 10^8/ml) anti-CD36, anti-MSR-A oder anti-LOX-1 (20 µg/ml) sowie zwei Stunden später mit DiI-AcLDL beladene Thrombozyten (2 x 10^7/ml) zugegeben. DiI ist ein Fluoreszenzfarbstoff und wurde zum durchflusszytometrischen Nachweis der Phagozytose von Thrombozyten verwendet, die zuvor mit DiI markiertes AcLDL in ihrem Zytoplasma gespeichert hatten. Schaumzellen, deren CD36- oder MSR-A-Rezeptoren durch Antikörper blockiert waren, wiesen signifikant niedrigere Fluoreszenzintensitäten als Maß einer geringeren Phagozytose-Aktivität bezüglich DiI-AcLDL beladener Thrombozyten auf als Zellen mit blockierten LOX-1-Rezeptoren oder nach Zugabe des Kontroll-Antikörpers.

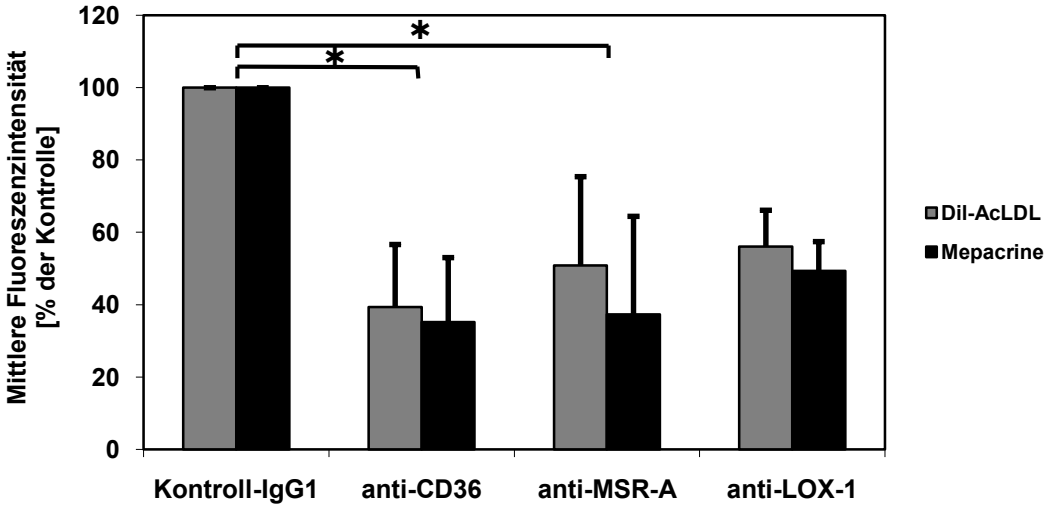


Abbildung 15: Phagozytose beladener Thrombozyten durch Schaumzellen, die sich aus CD34$^+$-Progenitorzellen differenziert haben.
Nach Blockade der Scavenger-Rezeptoren CD36, MSR-A oder LOX-1 durch Antikörper in einer Konzentration von 20 µg/ml wurden mit Mepacrine und DiI-AcLDL beladene und markierte Thrombozyten (2 x 10^7/ml) in sieben Tage alte Ko-Kulturen mit CD34$^+$-Progenitorzellen (3,3 x 10^5/ml) und nativen Thrombozyten (8 x 10^8/ml) zugegeben. Die Phagozyose markierter Thrombozyten durch die in den Ko-Kulturen entstandenen Schaumzellen wurde durchflusszytometrisch untersucht. Die Phagozytose-Aktivität war bei blockierten CD36- oder MSR-A-Rezeptoren signifikant geringer als bei blockierten LOX-1-Rezeptoren oder nach Zugabe des Kontroll-Antikörpers. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bis vier Versuchen mit Standardabweichung.

	Kontroll-IgG$_1$ ± STABW	**anti-CD36** ± STABW	**anti-MSR-A** ± STABW	**anti-LOX-1** ± STABW
DiI-AcLDL	100 ± 0	39 ± 17,3	51 ± 24,6	56 ± 10,1
Mepacrine	100 ± 0	35 ± 17,8	37 ± 27,1	49 ± 8,1

Tabelle 3: Mittlere Fluoreszenzaktivität der Schaumzellen aus CD34$^+$-Progenitorzellen nach Phagozytose Mepacrine-markierter und DiI-AcLDL-beladener Thrombozyten.
Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bis vier Versuchen mit Standardabweichung. STABW = Standardabweichung.

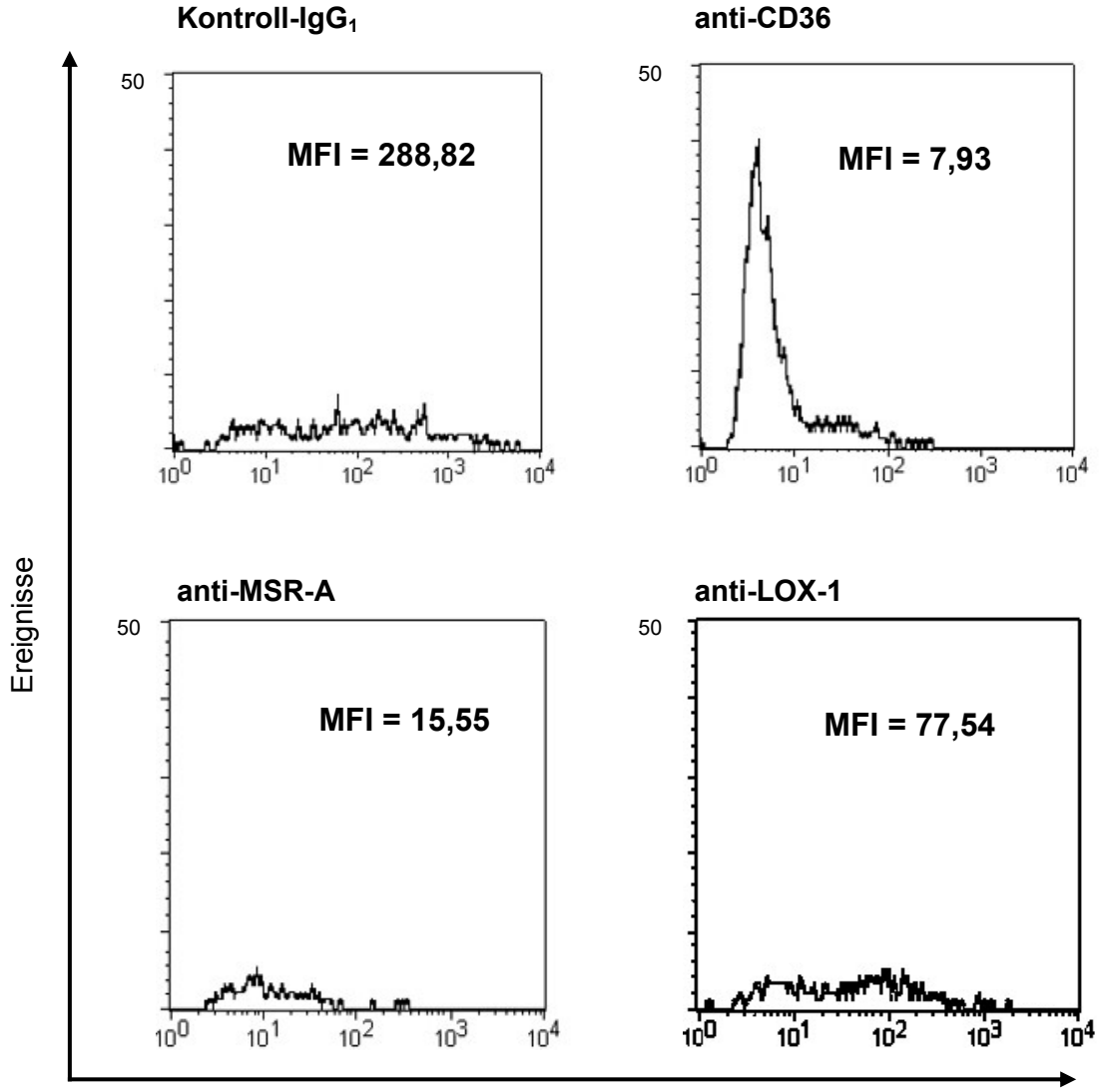
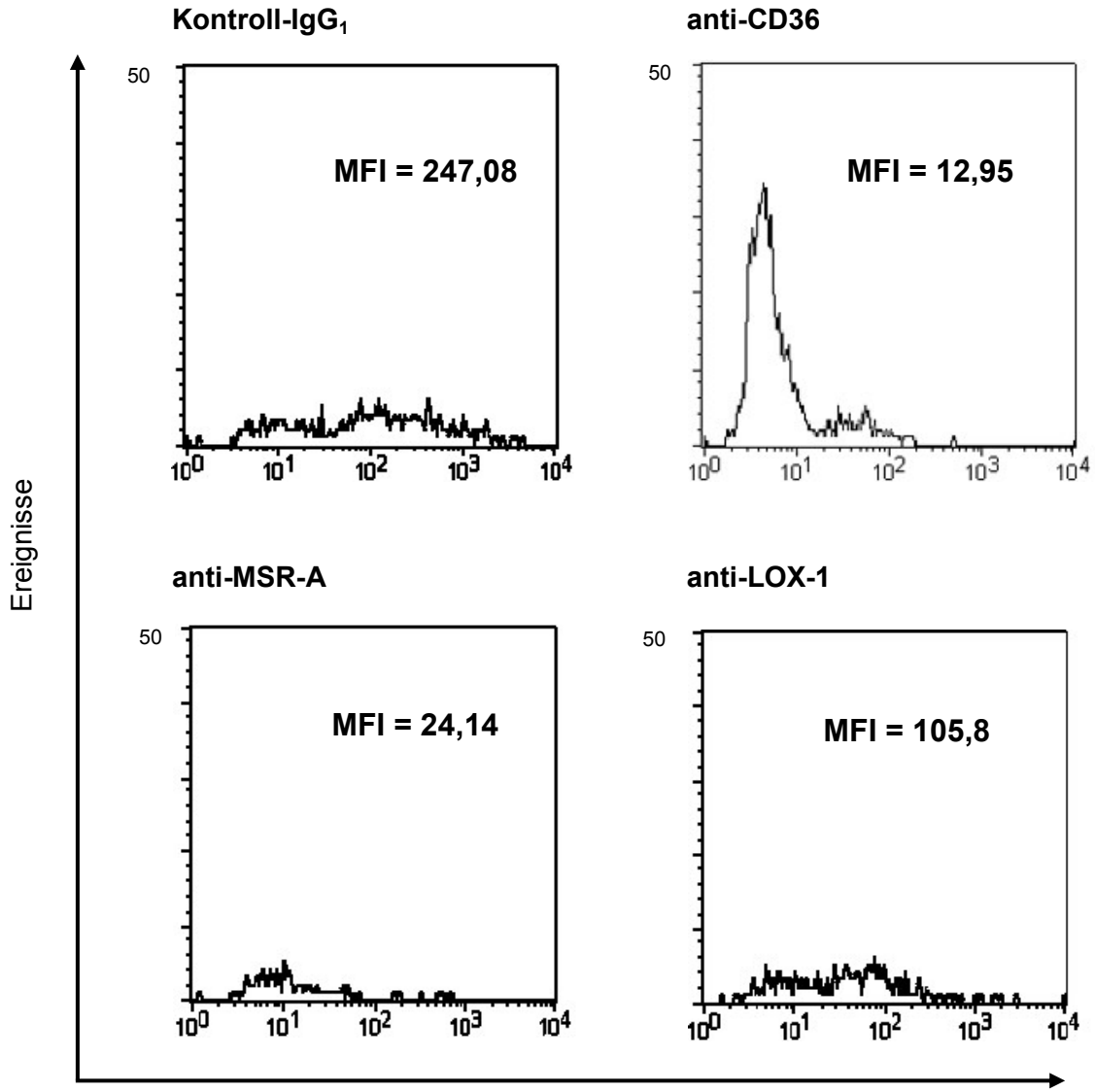


Abbildung 16: Phagozytoseaktivität der aus Monozyten entstandenen Schaumzellen bezüglich Mepacrine-markierter Thrombozyten im Histogramm.
Nach sieben Tagen wurden in Ko-Kulturen mit Monozyten (3,3 x 10^5/ml) und nativen Thrombozyten (8 x 10^8/ml) anti-CD36, anti-MSR-A oder anti-LOX-1 in einer Konzentration von 20 µg/ml sowie zwei Stunden später mit dem fluoreszierenden Farbstoff Mepacrine markierte Thrombozyten (2 x 10^7/ml) zugegeben. Die durch die Aufnahme markierter Thrombozyten vermittelte mittlere Fluoreszenzintensität der Schaumzellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Zellen, deren CD36- oder MSR-A-Rezeptoren durch Antikörper blockiert waren, wiesen signifikant niedrigere Fluoreszenzintensitäten als Maß einer geringeren Phagozytose-Aktivität bezüglich Mepacrine-beladener Thrombozyten auf als Zellen mit blockierten LOX-1-Rezeptoren oder nach Zugabe des Kontroll-Antikörpers.



Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der aus Monozyten differenzierten Schaumzellen

Abbildung 17: Phagozytoseaktivität der aus Monozyten entstandenen Schaumzellen bezüglich Dil-AcLDL-beladener Thrombozyten im Histogramm.
Nach sieben Tagen wurden in Ko-Kulturen mit Monozyten (3,3 x 10^5/ml) und nativen Thrombozyten (8 x 10^8/ml) anti-CD36, anti-MSR-A oder anti-LOX-1 (20 µg/ml) sowie zwei Stunden später mit Dil-AcLDL beladene Thrombozyten (2 x 10^7/ml) zugegeben. Dil ist ein Fluoreszenzfarbstoff und wurde zum durchflusszytometrischen Nachweis der Phagozytose von Thrombozyten verwendet, die zuvor mit Dil markiertes AcLDL in ihrem Zytoplasma gespeichert hatten. Schaumzellen, deren CD36- oder MSR-A-Rezeptoren durch Antikörper blockiert waren, wiesen signifikant niedrigere Fluoreszenzintensitäten als Maß einer geringeren Phagozytose-Aktivität bezüglich Dil-AcLDL beladener Thrombozyten auf als Zellen mit blockierten LOX-1-Rezeptoren oder nach Zugabe des Kontroll-Antikörpers.

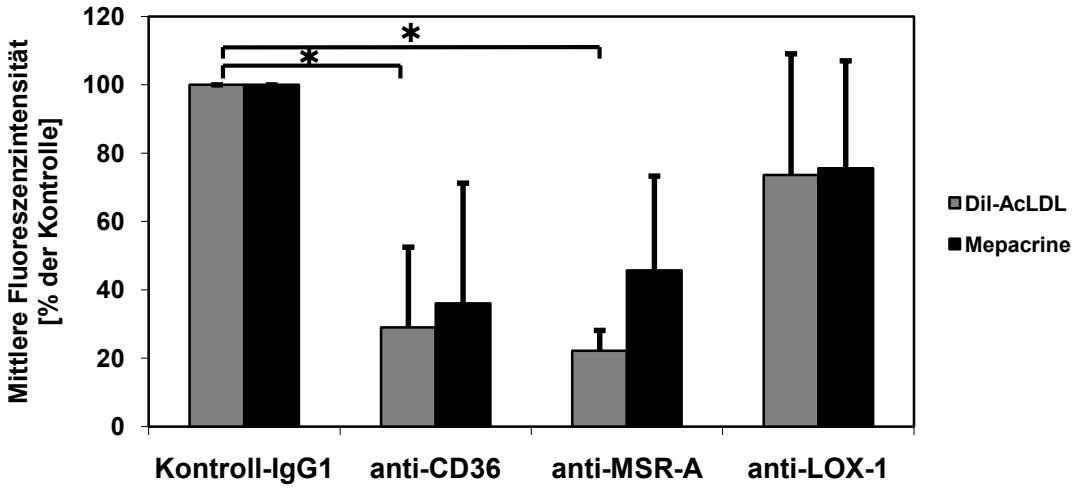


Abbildung 18: Phagozytose beladener Thrombozyten durch Schaumzellen, die sich aus Monozyten differenziert haben.
Nach Blockade der Scavenger-Rezeptoren CD36, MSR-A oder LOX-1 durch Antikörper in einer Konzentration von 20 µg/ml wurden mit Mepacrine und DiI-AcLDL beladene und markierte Thrombozyten (2 x 10^7/ml) in Ko-Kulturen mit Monozyten (3,3 x 10^5/ml) und nativen Thrombozyten (8 x 10^8/ml) zugegeben. Die Phagozyose-Aktivität der aus den Monozyten entstandenen Schaumzellen bezüglich markierter Thrombozyten wurde durchflusszytometrisch untersucht. Die Phagozytose-Aktivität war bei blockierten CD36- oder MSR-A-Rezeptoren signifikant geringer als bei blockierten LOX-1-Rezeptoren oder nach Zugabe des Kontroll-Antikörpers. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bis vier Versuchen mit Standardabweichung.

	Kontroll-IgG$_1$ ± STABW	**anti-CD36** ± STABW	**anti-MSR-A** ± STABW	**anti-LOX-1** ± STABW
DiI-AcLDL	100 ± 0	29 ± 23,5	22 ± 5,9	74 ±35,5
Mepacrine	100 ± 0	36 ± 35,2	46 ± 27,6	76 ± 31,4

Tabelle 4: Mittlere Fluoreszenzaktivität der Schaumzellen aus Monozyten nach Phagozytose Mepacrine-markierter und DiI-AcLDL-beladener Thrombozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bis vier Versuchen mit Standardabweichung. STABW = Standardabweichung.

4. Diskussion

Native Thrombozyten können in vitro die Differenzierung von $CD34^+$-Progenitorzellen und Monozyten zu Schaumzellen induzieren. Dies geschieht durch Phagozytose lipidbeladener Thrombozyten Die vorliegende Arbeit untersucht in vitro die Funktion der Scavenger-Rezeptoren CD36, MSR-A und LOX-1 in diesem Prozess.

4.1 Thrombozyten-induzierte Entwicklung von Schaumzellen in der Atherogenese

4.1.1 Mechanismen

Thrombozyten können die Differenzierung von Monozyten über Makrophagen zu Schaumzellen induzieren und spielen damit eine wichtige Rolle in der Atherogenese [34, 124, 125]. In der vorliegenden Arbeit wurden Monozyten-Thrombozyten-Ko-Kulturen verwendet, um eine Differenzierung zu Schaumzellen zu induzieren. Thrombozyten dürften diesen Differenzierungsprozess über vielfältige Mechanismen bewirken. Curtiss et al. wiesen nach, dass die Ko-Kultivierung von Thrombozyten mit aus Monozyten entstandenen Makrophagen den Cholesterinestergehalt der Makrophagen massiv steigert, wodurch die Transformation zu Schaumzellen gefördert wird [118, 125]. Vergleiche zwischen einer Ko-Inkubation von Makrophagen mit AcLDL und Makrophagen mit Thrombozyten zeigen sogar eine deutliche Überlegenheit der Thrombozyten, den Cholesterinestergehalt in den Makrophagen zu erhöhen [118]. Die Ko-Kultivierung von nativen Thrombozyten mit Monozyten fördert deren Transformation zu Schaumzellen. Dabei verändern sich die Monozyten morphologisch und entwickeln nach und nach die für Schaumzellen typischen intrazellulären Lipideinschlüsse. Mittels Lichtmikroskopie konnten diese Veränderungen im zeitlichen Verlauf beobachtet werden. Innerhalb von 15 Tagen entstanden große, durch Lipidakkumulationen „schaumig“ erscheinende,

runde Zellen. Thrombozyten induzieren diese Veränderungen spezifisch, andere Zellen oder Substanzen sind nicht dazu in der Lage [118]. Voraussetzungen dafür sind die Aktivierung der Thrombozyten und die nach Aktivierung erfolgende Freisetzung von Mediatoren, die auch in Abwesenheit von Thrombozyten die Schaumzellbildung induzieren können [118, 125]. Der Mechanismus dieses Prozesses ist bisher noch nicht genau charakterisiert.

4.1.2 Phagozytose der Thrombozyten

Einen wesentlichen Bestandteil der Thrombozyten-induzierten Schaumzellbildung bildet die Phagozytose von Thrombozyten durch Monozyten. Thrombozyten agieren dabei als direkte Transporter der sich in ihrem Zytoplasma befindenden Substanzen. Nach Aufnahme von modifizierten Lipoproteinen dienen sie als Lipidquelle für die Schaumzellentwicklung [34, 115]. Lichtmikroskopisch zeigte sich eine im zeitlichen Verlauf zunehmende Auflockerung des anfangs dichten Thrombozyten-Rasens in den Zellkulturplatten, wobei insbesondere in der unmittelbaren Umgebung der Schaumzellen nach 15 Tagen kaum noch Thrombozyten zu sehen waren (Abbildung 9). Dies wurde als Hinweis für eine im Rahmen der Differenzierung zu Schaumzellen stattfindende Phagozytose der Thrombozyten durch die Monozyten und die sich aus ihnen entwickelnden Schaumzellen betrachtet. Um die Phagozytose der Thrombozyten durch Schaumzellen immunfluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch darzustellen, mussten die Thrombozyten mit Dil-AcLDL und Mepacrine beladen und markiert werden. Mepacrine ist ein grün fluoreszierender Farbstoff, der innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne in die dichten Granula (δ-Granula) der Thrombozyten aufgenommen und dort abgelagert wird [147, 148]. Schaumzellen, die Mepacrine-markierte Thrombozyten phagozytiert haben, lassen sich aufgrund der Fluoreszenzaktivität dieses Farbstoffes mittels Immunfluoreszenzmikroskopie als grün fluoreszierende Zellen darstellen. Quantitativ kann die Phagozytose von markierten Thrombozyten durchflusszytometrisch ermittelt werden.

Thrombozyten nehmen modifizierte Lipoproteine, darunter auch AcLDL, in ihr Zytoplasma auf [112, 145, 149, 150]. Durch die Bindung an den Fluoreszenzfarbstoff Dil leuchten Thrombozyten nach Aufnahme von Dil-AcLDL unter dem Immunfluoreszenzmikroskop rot. Die rote Fluoreszenz von Schaumzellen weist deshalb die Phagozytose Dil-AcLDL-markierter Thrombozyten nach. Außerdem lässt sich wie bei Mepacrine die Fluoreszenzaktivität als Indikator für das Ausmaß der Phagozytose-Aktivität durchflusszytometrisch bestimmen. Um auszuschließen, dass die Fluoreszenz der Schaumzellen auf der Phagozytose von freiem, nicht in Thrombozyten gespeichertem Dil-AcLDL oder Mepacrine beruht, wurde freier Farbstoff in zwei Waschschritten aus der Thrombozyten-Lösung entfernt.

In dieser Arbeit wurde als modifiziertes LDL Dil-AcLDL verwendet, da Dil-OxLDL in der Zellkultur in Abhängigkeit von seinem LDL-Anteil weiter modifiziert und oxidiert wird und deshalb weniger konstante und vergleichbare Ergebnisse liefert. Der Oxidierungsgrad beeinflusst die Eigenschaften des OxLDL erheblich. Minimal modifiziertes LDL (mmLDL = minimally modified Low Density Lipoprotein) wird z.B. noch von den klassischen LDL-Rezeptoren erkannt, höhergradig oxidiertes OxLDL dagegen von den Scavenger-Rezeptoren der Klasse A [11, 21, 60-62, 151, 152]. OxLDL weist zytotoxische Effekte auf, die positiv mit seinem Oxidierungsgrad korrelieren und führt zu einer Hemmung oder Verstärkung der Freisetzung von Mediatoren im Rahmen entzündlicher Prozesse und Wachstumsfaktoren [153-156], die unter Umständen die Ergebnisse der Versuche verändern können. AcLDL weist dagegen immer einen nahezu identischen Grad der Acetylierung auf. Experimente werden dadurch reproduzierbar, weil bei jeder Acetylierung das gleiche Produkt entsteht [21, 157].

4.2 Regeneration und Progression der Atherosklerose durch CD34$^+$-Progenitorzellen

Die Rolle der Thrombozyten in der Atherogenese ist komplex.
CD34$^+$-Progenitorzellen können zur Regeneration von verletztem oder geschädigtem Gewebe einschließlich atherosklerotisch veränderter Gefäßwände beitragen und sind deshalb Hoffungsträger in der modernen Atherosklerose-Therapie. Allerdings können sie wie Monozyten auch den Differenzierungsprozess zu Schaumzellen durchlaufen und damit eine Progression atherosklerotischer Veränderungen hervorrufen.
Laut Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe führt eine Ko-Kultivierung von Thrombozyten mit CD34$^+$-Progenitorzellen zu einer Differenzierung dieser Zellen zu Schaumzellen [34, 126]. Die Differenzierung von CD34$^+$-Progenitorzellen zu Schaumzellen wurde in dieser Arbeit analog zu den Experimenten von Daub et al. herbeigeführt. Ohne Zugabe von Thrombozyten hatten sich bei Daub et al. keine Schaumzellen aus den CD34$^+$-Progenitorzellen entwickelt, sodass wir diese als wichtige Initiatoren in der Schaumzellbildung aus Progenitorzellen betrachten.
Analog zu den Versuchen mit Monozyten wurde im zeitlichen Verlauf eine Entwicklung von Schaumzellen in Ko-Kulturen mit CD34$^+$-Progenitorzellen und Thrombozyten beobachtet. Die entstehenden Schaumzellen nahmen ebenfalls lipidbeladene und markierte Thrombozyten auf. CD34$^+$-Progenitorzellen können sich allerdings auch zu endothelialen Zellen differenzieren [133] und geschädigtes Endothel im Gefäßsystem durch eine neue intakte Endothelschicht ersetzen [130, 139, 140]. Entscheidend dafür ist die Anzahl endothelialer Progenitorzellen im Blut sowie deren Qualität [141]. Die Regenerationsfähigkeit der endothelialen Progenitorzellen wird durch bestimmte Einflüsse wie Hyperlipidämie und oxLDL beeinträchtigt [137, 158, 159]. Akute ischämische Schädigungen des Herzmuskelgewebes können im Gegensatz dazu die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen erhöhen, sodass eine Regeneration eingeleitet werden kann. Die Einwanderung von Progenitorzellen in ischämische oder verletzte Bereiche kann über eine Neubildung gesunder Zellen sowie eine Verbesserung der

Versorgung dieses Gewebes über die Induktion der Einsprossung von Blutgefäßen also zur Gewebeerneuerung führen [127-138]. Endotheliale Progenitorzellen dienen aber nicht nur der Reparatur geschädigter Endothelzellen, sie können auch die atherosklerotische Plaque-Entstehung durch Vaskularisierung fördern und die Bildung und Hyperplasie der Neointima in der Atherogenese induzieren [141- 143]. Vaskuläre Progenitorzellen können sich zusätzlich unter dem Einfluss eines thrombozytären Wachstumsfaktors in vitro in glatte Gefäßmuskelzellen umwandeln und könnten damit auch proatherogen wirken [144]. Progenitorzellen können deshalb unterschiedliche Auswirkungen auf den Prozess der Atherogenese haben in Abhängigkeit von einem komplexen Zusammenspiel verschiedener und zum Teil noch nicht genau verstandener Faktoren. Da die Entwicklung von Schaumzellen aus $CD34^+$-Progenitorzellen nur in Anwesenheit von Thrombozyten induziert wird, stellen diese möglicherweise einen Schalter dar, der die Entwicklung und Differenzierung von $CD34^+$-Progenitorzellen in die Richtung der Regeneration atherosklerotisch veränderter Gefäßwandabschnitte lenkt, oder aber über die Bildung von Schaumzellen eine Progression der Atherogenese verursacht (Abbildung 19).

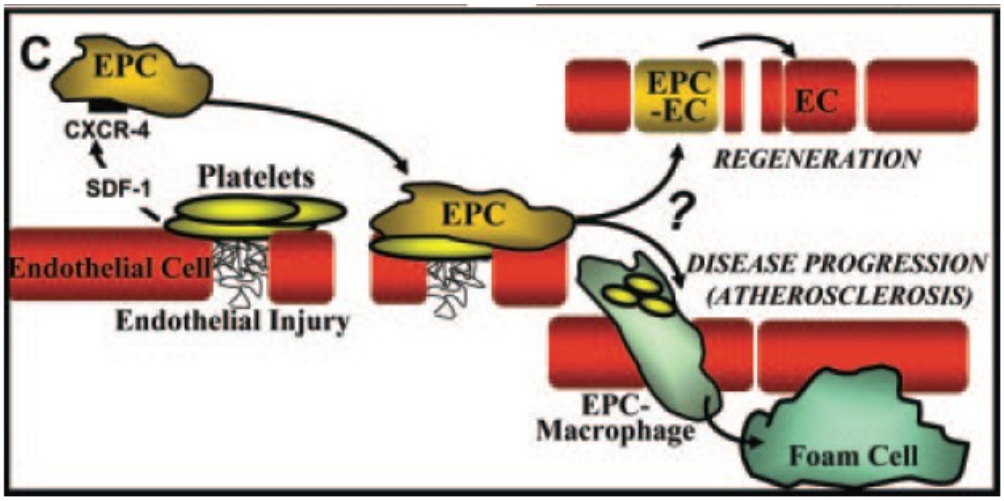


Abbildung 19: Thrombozyten-vermittelte Differenzierung von endothelialen Progenitorzellen zu Endothelzellen oder Schaumzellen.
Native Thrombozyten induzieren die Differenzierung von endothelialen Progenitorzellen zu lipidbeladenen, CD86-positiven Schaumzellen und tragen damit zur atherosklerotischen Plaquebildung bei. Im Rahmen der Regeneration geschädigter Gefäßwände können sich endotheliale Progenitorzellen unter dem Einfluss nativer Thrombozyten zu Endothelzellen entwickeln und somit protektiv gegen die Atherosklerose wirken. EPC = Endothelial Progenitor Cell, EC = Endothelial Cell, CXCR-4 = CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor = Fusin, SDF-1 = Stroma-Cell Derived Factor-1. Diese Abbildung stammt aus: May AE, Seizer P, Gawaz M: Platelets: Inflammatory Firebugs of Vasculary Walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:s5-s10 (Abbildung 3).

4.3 Scavenger-Rezeptoren in der Atherogenese

4.3.1 Scavenger-Rezeptoren in der Thrombozyten-induzierten Schaumzellbildung

Scavenger-Rezeptoren, die im Rahmen der Differenzierung von Monozyten und $CD34^+$-Progenitorzellen zu Schaumzellen auf deren Zelloberfläche exprimiert werden, vermitteln neben der ungehemmten Aufnahme im Blut zirkulierender Lipide auch die Phagozytose lipidbeladener Thrombozyten. Dieser Prozess gilt als alternativer Weg für die Entstehung von Schaumzellen [117, 118].

In dieser Arbeit wurde die Hypothese, dass die Scavenger-Rezeptoren CD36, MSR-A und LOX-1 die Phagozytose lipidbeladener Thrombozyten vermitteln und damit maßgeblich an der Entwicklung von Schaumzellen beteiligt sind, überprüft.

Ko-Kulturen aus Monozyten und Thrombozyten bzw. $CD34^+$-Progenitorzellen und Thrombozyten wiesen dabei lichtmikroskopisch signifikant weniger Schaumzellen auf, wenn blockierende Antikörper gegen CD36 oder MSR-A zugegeben worden waren als nach Zugabe von anti-LOX-1 oder des nicht-blockierenden Kontroll-Antikörpers anti-MausIgG_1. Die Abnahme der Thrombozyten-Dichte um die entstehenden Schaumzellen durch Phagozytose der sie umgebenden Thrombozyten war dabei geringer und die Phagozytose-Aktivität der Zellen deshalb schwächer, wenn die CD36- oder MSR-A-Rezeptoren blockiert waren. Außerdem stellten sich die Schaumzellen bei Blockade von CD36 oder MSR-A in der Lichtmikroskopie kleiner dar als in den Kontrollversuchen, bei denen anti-LOX-1 oder ein Kontrollantikörper zugegeben worden war. Die Feststellung von Miao et al., dass CD36 zusammen mit CD9 und Integrinen auf Thrombozyten die alternative Schaumzellentstehung über die Phagozytose lipidbeladener Thrombozyten maßgeblich mitbestimmt [122], wird teils durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche untermauert. Darüber hinaus ist CD36 wahrscheinlich an der Erkennung der Thrombozyten durch die phagozytierenden Zellen beteiligt [122,123]. MSR-A unterstützt den alternativen Prozess der Schaumzellbildung, indem er die

Erkennung und Aufnahme alter Thrombozyten vermittelt, die laut Brown et al. ein durch externe Faktoren beeinflusstes Apoptose-ähnliches Programm durchlaufen und dann durch phagozytierende Zellen aus der Blutbahn entfernt werden [121]. Die Aufnahme von Thrombozyten führt zu einer Aktivierung der Makrophagen, die sich durch eine massive Produktion von TNF-α und Nitrit und die Expression des Enzyms iNOS (induzierbare NO-Synthase) zeigt [116, 117, 123]. De Meyer et al. wiesen nach, dass aktivierte Makrophagen in atherosklerotischen Plaques β-Amyloid-Peptid (Aβ) und Platelet-Derived Amyloid Precursor Protein (APP) enthalten [117, 123]. Aβ entsteht durch die proteolytische Spaltung von APP, welches typischerweise in den α-Granula von Thrombozyten vorkommt [117, 160-163]. Aktivierte Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen wiesen dann besonders viel APP und Aβ auf, wenn sie von Thrombozyten umgeben waren oder diese phagozytiert hatten. Deshalb vermuteten De Meyer et al., dass die Aktivierung der Makrophagen durch die enzymatische Umwandlung von thrombozytärem APP zu Aβ bewirkt wird. Thrombozyten dienen dabei als zelluläre Transporter für das in ihrem Zytoplasma enthaltene APP. Jans et al. untermauerten diese Hypothese, indem sie zeigten, dass Thrombozyten aus APP-knockout-Mäusen keine Aktivierung von Makrophagen induzieren können [120]. Thrombozyten können wahrscheinlich auch ohne vorherige Phagozytose eine Aktivierung von Makrophagen hervorrufen, wenn sie in deren unmittelbare Umgebung APP abgeben, welches dann über SR-A-Rezeptoren in die Makrophagen aufgenommen wird [164]. Thrombozyten wirken dadurch begünstigend auf den Differenzierungsprozess von Makrophagen zu Schaumzellen.

Die Blockade des LOX-1-Rezeptors führte in der vorliegenden Arbeit nur zu einer allenfalls geringen (nicht signifikanten) Reduktion der Schaumzellbildung im Vergleich zum nicht-blockierenden Kontroll-Antikörper. LOX-1 wird insbesondere durch Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Makrophagen im Zentrum atherosklerotischer Plaques exprimiert und bewirkt eine massive OxLDL-Aufnahme in diese Zellen [75, 80], wodurch die Entstehung von Schaumzellen deutlich gefördert wird. Monozyten in der Blutbahn dagegen weisen fast kein LOX-1 auf [88, 89]. LOX-1 kann alte und apoptotische Zellen

binden und aufnehmen [71, 72] und die Bindung an aktivierte Thrombozyten vermitteln [34], sodass eine Beteiligung des Rezeptors an der Thrombozyten-induzierten Schaumzellentwicklung möglich ist. LOX-1 bindet hauptsächlich OxLDL, aber auch AcLDL [70, 74], sodass der Rezeptor möglicherweise in der klassischen Schaumzellbildung über die Aufnahme von OxLDL eine wichtigere Rolle spielen könnte, als unsere Versuche vermuten lassen. Die Ergebnisse der Versuche in dieser Arbeit deuten zumindest darauf hin, dass LOX-1 keine prominente Rolle in der Schaumzellentwicklung spielt, wie dies auch durch eine in vitro-Versuchsreihe von Tsukamoto et al. [56] impliziert wird, sondern vielmehr als eine der zahlreichen Komponenten im komplexen Zusammenspiel der Scavenger-Rezeptoren zu sehen ist.

4.3.2 Rolle der Scavenger-Rezeptoren bei der Aufnahme von modifiziertem LDL durch Thrombozyten

Thrombozyten können über Scavenger-Rezeptoren modifizierte Lipoproteine aufnehmen. Die Expression von Scavenger-Rezeptoren der Klasse B auf Thrombozyten wurde durch Volf et al. nachgewiesen, der in Experimenten mit modifiziertem LDL zeigte, dass Thrombozyten über CD36 OxLDL binden und aufnehmen können [57, 113, 165]. CD36 wird von ruhenden und aktivierten Thrombozyten exprimiert und ist an der Aktivierung der Thrombozyten beteiligt [34, 110]. SR-B1, ebenfalls ein Mitglied der Klasse B, wurde im Zytoplasma und auf der Oberfläche von Thrombozyten beschrieben [150]. SR-B1 bewirkt unter anderem die Aufnahme von AcLDL und HDL in Thrombozyten [34, 57, 58, 165]. Korporaal et al. bewiesen, dass CD36 und MSR-A zusammen an der Aktivierung von Thrombozyten durch oxLDL beteiligt sind [112]. AcLDL wird wahrscheinlich durch SR-B1 und SR-A in Thrombozyten aufgenommen oder aber durch weitere Modifikationen durch die Thrombozyten zu einer stärker oxidierten Form umgewandelt und dann durch die anderen Scavenger-Rezeptoren gebunden und nach intrazellulär transportiert. Volf et al. erklärt die Aufnahme von AcLDL in Thrombozyten dadurch, dass auch AcLDL oxidiert ist, allerdings nur in geringem Maß und dass der CD36-Rezeptor AcLDL aufgrund

dieser Oxidierung, nicht aufgrund der Acetylierung des LDL, spezifisch binden kann [165]. Ein weiterer Scavenger-Rezeptor auf Thrombozyten ist LOX-1, ein Rezeptor, der wie CD36 die Bindung von oxLDL vermittelt, allerdings aufgrund der Tatsache, dass er nur von aktivierten Thrombozyten exprimiert wird, wahrscheinlich ein etwas anderes Aufgabenspektrum als CD36 aufweist. LOX-1 ermöglicht außerdem die Erkennung und Bindung aktivierter Thrombozyten untereinander [57, 113].

Thrombozyten speichern modifizierte Lipoproteine nach ihrer Aufnahme über Scavenger-Rezeptoren in ihren dichten Granula, werden anschließend von Makrophagen phagozytiert und führen dort zu einer Ablagerung von Lipidtropfen [34]. Der klassische LDL-Rezeptor, der die LDL-Aufnahme in kernhaltige Zellen vermittelt, existiert auf Thrombozyten nicht in dieser Form [166]. Ob native Lipoproteine über Diffusion von Vesikeln in Thrombozyten aufgenommen werden können oder aber von außen an die Thrombozyten-Membran binden, ist bislang unklar [34]. Thrombozyten werden durch natives LDL gegenüber aktivierenden Substanzen sensibilisiert [167]. Außerdem wird ihre Funktion durch die Einlagerung von Phospholipiden aus zirkulierenden Lipoproteinen in die Thrombozyten-Membran beeinflusst [34, 168].

4.4 Schlussfolgerung

Geht man von vergleichbaren Folgen einer Blockade der Scavenger-Rezeptoren in vivo aus, könnte eine Blockade der beiden Scavenger-Rezeptoren CD36 und MSR-A die Schaumzellbildung über diesen alternativen Weg der Thrombozyten-Induktion, aber auch über den klassischen Weg der Lipoprotein-Induktion im menschlichen Organismus hemmen. Welcher dieser beiden Mechanismen den größeren Anteil an der Entstehung von Schaumzellen hat, ist bisher nicht spezifisch untersucht worden. Durch eine pharmakologische Intervention an diesen Rezeptoren könnte man gegebenenfalls die Entstehung bzw. Progression atherosklerotischer Plaques aufhalten. Dennoch steht einer unkritischen Blockade der Scavenger-Rezeptoren in vivo die Tatsache entgegen, dass die Folgen aufgrund der vielfältigen Funktionen dieser Rezeptoren schwer abzuschätzen sind und dass Scavenger-Rezeptoren in anderen Bereichen als der Atherosklerose wie z.B. in der Immunabwehr Aufgaben erfüllen, die den menschlichen Organismus vor schweren Krankheiten schützen. Auch in der Atherogenese nehmen die Scavenger-Rezeptoren keineswegs einheitliche Funktionen wahr. In Tierversuchen beobachtete man eine weniger stark ausgeprägte Arterienwandverhärtung bei erhöhter SR-A-Expression, wodurch eine Atherosklerose-protektive Wirkung des SR-A impliziert wird [40, 41]. Babaev et al. fanden dagegen heraus, dass Mäuse bei fehlenden SR-A-Rezeptoren trotz fettreicher Diät weniger atherosklerotische Läsionen entwickelten [169]. In fortgeschrittenen Stadien der Atherogenese führt die SR-A-induzierte Apoptose von lipidüberladenen Makrophagen zu einer Vergrößerung des Lipidkerns in den Plaques [43]. SR-A kann die Atherogenese also abhängig von ihrem jeweiligen Stadium und den Rahmenbedingungen aufhalten oder beschleunigen, in der Frühphase kann man sogar eine schützende Funktion vermuten [43]. SR-A kann apoptotische Zellen beseitigen, wenn keine Entzündung vorliegt, und wirkt damit der Atherogenese entgegen [43]. SR-A ist über die Erkennung von pathogenen Keimen an angeborenen und erworbenen Prozessen des Immunsystems beteiligt [170].

Auch CD36 weist unterschiedliche Funktionen auf. CD36 vermittelt zusammen mit MSR-A den Großteil der Aufnahme modifizierten LDLs in Makrophagen, wobei stark oxidiertes LDL bevorzugt über SR-A und schwach oxidiertes LDL bevorzugt über CD36 aufgenommen wird [60-62]. Diese Funktion fördert die Atherogenese. Moore et al. zogen aus Versuchen mit Mäusen, deren klassische LDL-Rezeptoren und CD36-Rezeptoren gleichzeitig ausgeknockt waren, den Rückschluss, dass ein Fehlen von Scavenger-Rezeptoren die Entstehung atherosklerotischer Plaques begünstigt, weil durch die verminderte Aufnahme modifizierter Lipoproteine aufgrund der ausgeknockten Rezeptoren ein stärker entzündliches Milieu entsteht und die Atherogenese dadurch eher beschleunigt wird als durch die fehlende Aufnahme von Lipiden verzögert [171]. CD36 reguliert Entzündungsmediatoren hoch; diese steigern wiederum die CD36-Expression [63-65]. Dies wirkt proatherogen, da die Atherogenese einen chronisch-inflammatorischen Prozess darstellt [5]. Febbraio et al. führten Experimente mit CD36/Apoliprotein E-knockout-Mäusen durch. Die resultierende Größenabnahme der entstehenden atherosklerotischen Läsionen stützt jedoch die Hypothese, dass ein Fehlen dieser beiden Rezeptor-Typen vor der Atherogenese schützt, weil die zelluläre Lipidaufnahme dadurch vermindert wird [60]. Wichtige Funktionen erfüllt CD36 bei der Beseitigung apoptotischer Zellen durch Makrophagen [43] und in der Energiegewinnung von Zellen [53, 66].

Es gibt Menschen, deren Zellen CD36 durch einen genetischen Defekt nicht exprimieren. CD36-Rezeptor-negative Makrophagen nahmen in in vitro Versuchen 50 % weniger oxLDL auf als CD36 exprimierende Makrohagen [58]. Die durch oxLDL induzierte Steigerung der Freisetzung entzündlicher Mediatoren durch Makrophagen war bei fehlender CD36-Expression deutlich schwächer [65]. In vivo wiesen Patienten mit CD36-Defekt höhere Triacylglycerin-Spiegel, Insulinresistenz und eine leichte Hypertonie auf, wodurch das kardiovaskuläre Risiko deutlich erhöht wird [172, 173]. KHK-Patienten wiesen dementsprechend dreimal so häufig eine fehlende CD36-Expression auf als Gesunde [172]. Ein Fehlen des CD36-Rezeptors in vivo kann die Atherogenese positiv und negativ beeinflussen [172]. Ob die Blockade der Scavenger-Rezeptoren CD36 und MSR-A in vivo durch eine Verminderung der

Phagozytose modifizierter Lipoproteine und lipidbeladener Thrombozyten durch entstehende Schaumzellen effektiv antiatherogen wirkt oder ob proatherogene Faktoren, die im Zusammenhang mit einer fehlenden CD36- und MSR-A-Expression auftreten, überwiegen, gilt es zukünftig noch aufzuklären.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Scavenger-Rezeptoren für die Entwicklung von Schaumzellen aus $CD34^+$-Progenitorzellen und Monozyten untersucht. Die erste Versuchsreihe beschäftigte sich mit der Thrombozyten-induzierten Schaumzellbildung aus $CD34^+$-Progenitorzellen und Monozyten. Die zweite Versuchsreihe untersuchte die Funktion von Scavenger-Rezeptoren in der Phagozytose lipidbeladener Thrombozyten durch $CD34^+$-Progenitorzellen und Monozyten.

Nach Blockade der Scavenger-Rezeptoren CD36 und MSR-A durch Antikörper entstehen im zeitlichen Verlauf signifikant weniger Schaumzellen in Ko-Kulturen mit Monozyten und nativen Thrombozyten bzw. $CD34^+$-Progenitorzellen und nativen Thrombozyten als nach Blockade des Scavenger-Rezeptors LOX-1 oder nach Zugabe eines nicht-blockierenden Kontroll-Antikörpers. Schaumzellen phagozytieren nach Blockade von CD36 und MSR-A signifikant weniger Thrombozyten als nach Zugabe des Kontroll-Antikörpers oder nach Blockade von LOX-1. Dies wurde immunfluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch nachgewiesen.

Scavenger-Rezeptoren vermitteln in vitro sowohl den klassischen Weg der Schaumzellentstehung über die ungehemmte Aufnahme von Lipiden durch Monozyten und Makrophagen als auch den alternativen Mechanismus durch die Phagozytose lipidbeladener Thrombozyten.

Geht man von einer vergleichbaren Wirkung im menschlichen Organismus aus, so könnten die Scavenger-Rezeptoren CD36 und MSR-A mögliche pharmakologische Angriffsziele für die präventive Therapie der Atherosklerose darstellen. Scavenger-Rezeptoren können die Atherogenese in Abhängigkeit von ihrem Stadium positiv und negativ beeinflussen, außerdem erfüllen sie wichtige Funktionen unter anderem in der Immunologie und der Energiegewinnung von Zellen. Bisher existieren keine Daten über die Folgen einer Blockade von Scavenger-Rezeptoren in vivo.

$CD34^+$-Progenitorzellen können über ihre Differenzierung zu Schaumzellen proatherogen wirken oder durch die Regeneration von ischämisch

geschädigtem Gewebe und atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden die Atherogenese aufhalten. Thrombozyten stellen möglicherweise den Schalter zwischen Regeneration und Progression der Atherogenese durch Progenitorzellen dar.

6. Literaturverzeichnis

1. World Health Organization, Genf: Classification of atherosclerotic lesions. *World Health Organization Technical Report Series* 1998;No.143
2. Lusis AR: Atherosclerosis. *Nature* 2000;407(6801):233-241
3. Ross R: Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 1995;57:791-804
4. Bühling KJ, Lepenies J, Witt K: Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie. 3. Aufl., Urban und Fischer, München 2004, S. 145-147
5. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809
6. Roche Lexikon Medizin, 5. Aufl., Urban und Fischer, München 2003, S. 131
7. Hsich E, Zhou YF, Paigen B, Johnson TM, Burnett MS, Epstein SE: Cytomegalovirus infection increases development of atherosclerosis in Apolipoprotein-E knockout mice. *Atherosclerosis* 2001;156:23-28
8. Liu L, Hu H, Ji H, Murdin AD, Pierce GN, Zhong G: Chlamydia peumoniae infection significantly exacerbates aortic atherosclerosis in an LDLR -/- mouse model within six months. *Mol Cell Biochem* 2000;215:123-128
9. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr.: Endothelial expresssion of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;251:788-791
10. Simionescu N, Simionescu M: Cellular interactions of lipoproteins with the vascular endothelium: endocytosis and transcytosis. *Targeted Diagn Ther* 1991;5:45-95
11. Steinberg D, Lewis A: Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997a;95:1062-1071
12. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS: Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:333-337
13. Brown MS, Goldstein JL: Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983;52:223-261
14. Rubic T: Effekte des anti-inflammatorischen Cytokins IL-10 auf die Expression und Regulation von Scavenger Rezeptoren, des Cholesterinexporters ABCA1 und die Cholesterin-Homöostase monocytoider Zellen, Medizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2004

15. Schlitt A: Bedeutung des Phospholipid-Transferproteins (PLTP) im Krankheitsbild der Athersklerose. Medizinische Habilitation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2007

16. Faggiotto A, Ross R, Harker L: Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Atherosclerosis* 1984;4:323-340

17. Faggiotto A, Ross R: Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Atherosclerosis* 1984;4:341-356

18. Glass CK, Witztum JL: Atherosclerosis. The road ahead. *Cell* 2001;104:503-516

19. Weissberg PL: Atherogenesis: current understanding of the causes of atheroma. *Heart* 2000;83:247-252

20. Libby P: What have we learned about the biology of atherosclerosis? The role of inflammation. *Am J Cardiol* 2001;11:3J-6J

21. Lüchtenborg B: Expression und Aktivität von Scavenger-Rezeptoren in vaskulären glatten Muskelzellen. Biochemische Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2001

22. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA: A modern view of atherogenesis. *Am J Cardio* 1993;71:9B-14B

23. van der Waal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK: Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994;89:36-44

24. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM: Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 1995;77:863-868

25. Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G, Fallon JT, Regenstrom J, Fuster V: Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 1995;92:1565-1569

26. Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P: Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:19-27

27. Krieger M, Acton S, Ashenas J, Pearson A, Penman M, Resnick D: Structure, binding properties and functions of macrophage scavenger-receptor. *J Biol Chem* 1993;268:4569-4572

28. Brown MS, Basu SK, Falck JR, Ho YK, Goldstein JL: The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. *J Supramol Struct* 1980;13:67-81

29. Henriksen T, Mahoney AM, Steinberg D: Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:6499-6503

30. Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM: Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 1984;4:357-364

31. Steinbrecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S, Steinberg D: Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis* 1987a;7:135-143

32. Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, Moriwaki H, Kataoka H, Nishi E, Horiuchi H, Arai H, Yokode M. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001:947:199-205

33. Davies MJ, Woolf N: Atherosclerosis: what is it and why does it occur? *Br Heart J* 1993;69:S3-S11

34. Siegel-Axel D, Daub K, Seizer P, Lindemann S, Gawaz M: Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2008;78(1):8-17

35. Murphy JE, Tedbury PR, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, Ponnambalam S: Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis* 2005;182:1-15

36. Pearson AM: Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996;8:20-28

37. Naito M, Suzuki H, Mori T, Matsumoto A, Kodama T, Takahashi K: Coexpression of type I and type II human macrophage scavenger receptors in macrophages of various organs and foam cells in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1992;141:591-599

38. Daugherty A, Cornicelli JA, Welch K, Sendobry SM, Rateri DL: Scavenger receptors are present on rabbit aortic endothelial cells in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2369-2375

39. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto S, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T: A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 1997;386:292-296

40. Teupser D, Stein O, Burkhardt R, Nebendahl K, Stein Y, Thiery J: Scavenger receptor activity is increased in macrophages from rabbits with low atherosclerotic response: studies in normocholesterolemic high and low atherosclerotic response rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1299-1305

41. Jalkanen J, Leppanen P, Narvanen O, Greaves DR, Ylä-Hertualla S: Adenovirus-mediated gene transfer of a secreted decoy human macrophage scavenger receptor (SR-AI) in LDL receptor knock-out mice. *Atherosclerosis* 2003;169:95-103

42. Devries-Seimon T, Li Y, Yao PM, Stone E, Wang Y, Davis RJ, Flavell R, Tabas I: Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor. *J Cell Biol* 2005;171:61-73

43. Moore KJ, Freeman MW: Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006*;26:1702-1711

44. Armesilla AL, Vega MA: Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein. *J Biol Chem* 1994;269:18985-18991

45. Cao G, Garcia CK, Wyne KL, Schultz RA, Parker KL, Hobbs HH: Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. *J Biol Chem* 1997;272:33068-33076

46. Webb NR, de Villiers WJ, Connell PM, de Beer FC, van der Westhuyzen DR: Alternative forms of the scavenger receptor BI (SR-BI). *J Lipid Res* 1997;38:1490-1495

47. Puente Navazo MD, Daviet L, Ninio E, McGregor JL: Identification on human CD36 of a domain (155-183) implicated in binding oxidized low-density lipoproteins (Ox-LDL). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1033-1039

48. Pearce SF, Roy P, Nicholson AC, Hajjar DP, Febbraio M, Silverstein RL: Recombinant glutathione *S*-transferase/CD36 fusion proteins define an oxidized low density lipoprotein-binding domain. *J Biol Chem* 1998;273:34875-34881

49. Terpstra V, van Amersfoort ES, van Velzen AG, Kuiper J, van Berkel TJ: Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1860-1872

50. Greenwalt D, Lipsky R, Ochenhouse C, Ikedo H, Tandon N, Jamieson G: Membrane glykoprotein CD36: a review of its role in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 1992;80:1105-1115

51. Calvo D, Gomez-Coronado D, Suarez Y, Lasuncion MA, Vega MA: Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res* 1998;39:777-788

52. Rigotti A, Acton SL, Krieger M: The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* 1995;270:16221-16224

53. Jostarndt K: Wirkungsweise enzymatisch-modifizierten LDLs bei der Expression des Scavenger-Rezeptors CD36 in monozytären Zelllinien, Medizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2004

54. Matsumoto K, Hirano K, Nozaki S, Takamoto A, Nishida M, Nakagawa-Toyama Y, Janabi MY, Ohya T, Yamashita S, Matsuzawa Y: Expression of macrophage (Mphi) scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma, which regulates gain of Mphi-like phenotype in vitro, and its implication in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1027-1032

55. Calvo D, Dopazo J, Vega MA: The CD36, CLA-1 (CD36L1), and LIMPII (CD36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution. *Genomics* 1995:25:100-106

56. Tsukamoto K, Kinoshita M, Kojima K, Mikuni Y, Kudo M, Mori M, Fujita M, Horie E, Shimazu N, Teramoto T: Synergically Increased Expression of CD36, CLA-1 and CD68, but Not of SR-A and LOX-1, with the Progression to Foam Cells from Macrophages. *J Atheroscler Thromb* 2002;9:57-64

57. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA: CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1993;268:11811-1816

58. Nozaki S, Kashiwagi H, Yamashita S, Nakagawa T, Kostner B, Tomiyama Y, Nakata A, Ishigami M, Miyagawa J, Kameda-Takemura K: Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J Clin Invest* 1995;96:1859-1865

59. Kunjathoor V, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF, Freeman MW: Scavenger Receptors Class A-I/II and CD36 Are the Principal Receptors Responsible for the Uptake of Modified Low Density Lipoprotein Leading to Lipid Loading in Macrophage. *J Biol Chem* 2002;277(51):49982-49988

60. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL: Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 2000;105:1049-1056

61. Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein RL, Hajjar DP, Cohen PA, Frazier WA, Hoff HF, Hazen SL: Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest* 2000; 105(8):1095-1108

62. Ling W, Lougheed M, Suzuki H, Buchan A, Kodama T, Steinbrecher UP: Oxidized or acetylated low density lipoproteins are rapidly cleared by the liver in mice with disruption of the scavenger receptor class A type I/II gene. *J Clin Invest* 1997;272(20):12938-12944

63. Yesner LM, Huh HY, Pearce SF, Silverstein RL: Regulation of monocyte CD36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1019-1025

64. Huh HY, Lo SK, Yesner LM, Silverstein RL: CD36 induction on human monocytes upon adhesion to tumor necrosis factor-activated endothelial cells. *J Biol Chem* 1995;270:6267- 6271

65. Janabi M, Yamashita S, Sakai N, Hirano K, Hiraoka H, Matsumoto K, Zhang Z, Nozaki S, Matzusawa Y: Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36- deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000:20:1953-1960

66. Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, Pearce SFA, Silverstein RL: A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* 1999;274:19055-19062

67. Fadok VA, Warner ML, Bratton DL, Henson PM: CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor ($\alpha_v\beta_3$). *J Immunol* 1998;161:6250-6257

68. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T: An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 1997;386:73-77

69. Chen M, Masaki T, Sawamura T: LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther* 2002;95:89-100

70. Moriwaki H, Kume N, Sawamura T, Aoyama T, Hoshikawa H, Ochi H, Nishi E, Masaki T, Kita T: Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1541-1547

71. Kakutani M, Masaki T, Sawamura T: A platelet-endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:360-364

72. Oka K, Sawamura T, Kikuta K, Itokawa S, Kume N, Kita T, Masaki T: Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9535-9540

73. Shimaoka T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Sawamura T, Kita T, Yonehara S: LOX-1 supports adhesion of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Immunol* 2001;166:5108-5114

74. Marsche G, Levak-Frank S, Quehenberger O, Heller R, Sattler W, Malle E: Identification of the human analog of SR-BI and LOX-1 as receptors for hypochlorite-modified high density lipoprotein on human umbilical venous endothelial cells. *FASEB J* 2001;15:1095- 1097

75. Chen M, Kakutani M, Minami M: Increased expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in initial atherosclerotic lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1107-1115

76. Nagase M, Hirose S, Sawamura T, Masaki T, Fujita T: Enhanced expression of endothelial oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) in hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1997:237;496-498

77. Kita T, Kume N, Ishii K, Arai H, Yokode M: Oxidized LDL and expression of monocyte adhesion molecules. *Diabetes Res Clin Pract* 1999:45:123-126

78. Kume N, Murase T, Moriwaki H, Aoyama A, Sawamura T, Masaki T, Kita T, Nishi E, Ueno Y: Inducible expression of LOX-1, a novel lectin-like receptor for oxidized low density lipoprotein, in vascular endothelial cells. *Circ Res* 1998;83:322-327

79. Murase T, Kume N, Korenaga R, Ando J, Sawamura T, Masaki T, Kita T: Fluid shear stress transcriptionally induces lectinlike oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res* 1998;83:328-333

80. Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, Minami M, Moriwaki H, Murase T, Sawamura T, Masaki T, Hashimoto N, Kita T: Expression of Lectinlike Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 in Human Atherosclerotic Lesions. *Circ* 1999;99:3110-3117

81. Chen M, Nagase M, Fujita T, Narumiya S, Masaki T, Sawamura T: Diabetes enhances lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in the vascular endothelium: possible role of LOX-1 ligand and age. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;87:962-968

82. Mehta JL: The role of LOX-1, a novel lectin-like rceptor for oxidized low density lipoprotein, in atherosclerosis. *Can J Cardiol* 2004;20(Suppl B):32B-36B

83. Chen H, Li D, Saldeen T, Metha JL: Transforming growth factor-beta(1) modulates oxidatively modified LDL-induced expression of adhesion molecules: role of LOX-1. *Circ Res* 2001;89:1155-1160

84. Nagase M, Ando K, Nagase T, Kaname S, Sawamura T, Fujita T: Redox-sensitive regulation of lox-1 gene expression in vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:720-725

85. Li D, Mehta JL: Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1116-1122

86. Li D, Mehta JL: Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circ* 2000;101:2889-2895

87. Moriwaki H, Kume N, Kataoka H, Murase T, Nishi E, Sawamura T, Masaki T, Kita T: Expression of lectinlike oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human and murine macrophages: upregulated expression by TNF-α. *FEBS Lett* 1998:40:29-32

88. Yoshida H, Kondratenko N, Green S, Steinberg D, Quehenberger O: Identification of the lectinlike receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor. *Biochem J* 1998;334:9-13

89. Li D, Williams V, Liu L, Chen H, Sawamura T, Romeo F, Metha JL: Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptors during ischemia-reperfusion and its role in determination of apoptosis and left ventrivular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1048-1055

90. Zhang W, Li D, Metha JL: Role of AIF in human coronary artery endothelial cell apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H354-358

91. Gawaz M, Langer H, May AE: Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005;115:3378-3384

92. Siegel-Axel D, Langer H, Lindemann S, Gawaz M: Role of platelets in atherosclerosis and inflammation. *Med Klin (Munich)* 2006;101:467-475

93. Lindemann S, Krämer B, Seizer P, Gawaz M: Platelets, inflammation and atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2007;5(S1):203-211

94. Gawaz M: Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res* 2004;61:498-511

95. Gawaz M: Do platelets trigger atherosclerosis? *Thromb Haemost* 2003;90:971-972

96. Gawaz M: Patelets in the onset of atherosclerosis. *Blood Cells Mol Diss* 2006;36:206-210

97. Siegel-Axel DI, Gawaz M: Platelets and endothelial cells. *Semin Thromb Hemost* 2007;33:128-135

98. Ruggeri ZM: Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002;8:1227-1234

99. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schömig A, Brand K: Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998;98:1164-1171

100. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schömig A, Neumann FJ: Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implication for atherogenesis. *Atherosclerosis* 2000;148:75-85

101. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmermann GA, Weyrich AS: Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol* 2001;154:485-490

102. Lindemann S, Krämer B, Daub K, Stellos K, Gawaz M: Molecular pathway used by platelets to initiate and accelerate atherogenesis. *Current Opin Lipidol* 2007;18:566-573

103. Henn V, Slupsky J, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Müller-Berghaus G, Kroczek RA: CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591-594

104. May AE, Kalsch T, Massberg S, Herouy Y, Schmidt R, Gawaz M: Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha(IIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation* 2002;106:2111-2117

105. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K: Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998;92:507-515

106. Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD: Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell* 1996;84:563-574

107. Ferroni P, Basili S, Santilli F, Davi G: Low-density lipoprotein-lowering medication and platelet function. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006;35:346-354

108. Elisaf M, Karabina SA, Bairaktari E, Goudevenos JA, Siamopoulos KC, Tselepis AD: Increased platelet reactivity to the aggregatory effect of platelet activating factor, in vitro, in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Platelets* 1999;10:124-131

109. Surya II, Akkerman JW: The influence of lipoproteins on platelets. *Am Heart J* 1993;125:272-275

110. Aiken ML, Ginsberg MH, Byers-Ward V, Plow EF: Effects of OKM5, a monoclonal antibody to glycoprotein IV, on platelet aggregation and thrombospondin surface expression. *Blood* 1990;76:2501-2509

111. Silverstein RL, Febbraio M: CD36 and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:483-491

112. Korporaal SJ, van Eck M, Adelmeijer J, Ijsseldijk M, Out R, Lisman T, Lenting PJ, van Berkel TJ, Akkerman JW: Platelet activation by oxidized low density lipoprotein is mediated by CD36 and scavenger receptor-A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2476-2483

113. Chen M, Kakutani M, Naruko T: Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:153-158

114. May AE, Langer H, Seizer P, Bigalke B, Lindemann S, Gawaz M: Platelet-leukocyte interactions in inflammation and atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2007;33:123-127

115. Chandler AB, Hand RA: Phagocytized platelets: a source of lipids in human thrombi and atherosclerotic plaques. *Science* 1961;134:946-947

116. Schrijvers DM, De Meyer GRY, Herman AG, Martinet W: Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res* 2007; 73(3):470-480

117. De Meyer Y, De Cleen DM, Cooper S, Knaapen MW, Jans DM, Martinet W, Herman AG, Bult H, Kockx MM: Platelet phagocytosis and processing of beta-amyloid precursor protein as a mechanism of macrophage activation in atherosclerosis. *Circ Res* 2002;90:1197-1204

118. Curtiss LK, Dyer CA, Banka CL, Black AS: Platelet-mediated foam cell formation in atherosclerosis. *Clin Invest Med* 1990;13:189-195

119. Sokronovsky DM, Lee VM, Pratico D: Amyloid precursor protein and amyloid ß peptide in human platelets: role of cyclooxygenase and protein kinase C. *J Biol Chem* 2001;276:17036-17043

120. Jans DM, Martinet W, Van De Parre TJL, Herman AG, Bult H, Kockx MM, De Meyer GR: Processing of amyloid precursor protein as a biochemical link between atherosclerosis and Alzheimer`s disease. *Cardiovasc Haematol Disord Drug Targets* 2006;6:21-34

121. Brown SB, Clarke MC, Magowan L, Sanderson H, Savill J: Constitutive death of platelets leading to scavenger receptor-mediated phagocytosis. A caspase-independent cell clearance program. *J Biol Chem* 2000:275:5987-5996

122. Miao WM, Vasile E, Lane WS, Lawler J: CD36 associates with CD9 and integrins on human blood platelets. *Blood* 2001;97:1689-1696

123. Tedgui A, Mallat Z: Platelets in atherosclerosis: a new role for beta-amyloid peptide beyond Alzheimer´s disease. *Circ Res* 2002;90:1145-1146

124. Kruth HS: Platelet-mediated cholesterol accumulation in cultured aortic smooth muscle cells. *Science* 1985;227:1243-1245

125. Curtiss LK, Black AS, Takagi Y, Plow EF: New mechanism for foam cell generation in atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1987;80:367-373

126. Daub K, Langer H, Seizer P, Stellos K, May AE, Goyal P, Bigalke B, Schönberger T, Geisler T, Siegel-Axel D, Oostendorp RA, Lindemann S, Gawaz M: Platelets induce differentiation of human $CD34^+$ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *FASEB J* 2006;20:2559-2561

127. Scharlau JB: Charakterisierung einer CD34-/CD133+/VEGFR-2+Subpopulation von endothelialen Progenitorzellen mit hohem vasoregenerativem Potential, Medizinische Dissertation, Universität des Saarlandes, Bad Homburg, 2007

128. Rafii S, Lyden D: Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003;9:702-712

129. Urbich C, Dimmeler S: Endothelial progenitor cells. Characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004;95:343-353

130. Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Böhm M, Nickenig G: Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res* 2003;93:e17-e24

131. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Miche E, Böhme M, Nickenig G: Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004;109:220-226

132. Blau HM, Brazelton TR, Weinmann JM: The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 2001;105:829-841

133. Asahara T, Murohara T, Sulliva A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-967

134. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM: Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106:3009-3017

135. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S: Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of $VEGFR2^+$ $AC\ 133^+$ endothelial precursor cells. *Circ Res* 2001;88:167-174

136. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katho A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T: Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001;103:2776-2779

137. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyumi AA, Finkel T: Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348:593-600

138. Werner N, Nickenig G: Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis. *J Cell Mol Med* 2006;10:318-322

139. Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G: Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1567-1572

140. Walter DH, Rittig K; Bahlmann FH, Kirchmaier R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM: Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002;105:3017-3024

141. Xu Q: The impact of progenitor cells in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3:94-101

142. Hu Y, Davison T, Zhang Z, Xu Q.: Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation* 2003;108:3122-3127

143. Rotmans JI, Heyligers JM, Verhagen HJ, Velema E, Nagtegaal MM, de Kleijn PD, de Groot FG, Stroes ES, Pasterkamp G: In vivo cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Circulation* 2005;112:12-18

144. Hu Y, Zhang Z, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B, Xu Q: Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2004;113:1258-1265

145. Daub K: Interaktionen von humanen $CD34^+$-Progenitorzellen und Thrombozyten, Biologische Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2007

146. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D: Der Experimentator Immunologie, 2. Aufl., Urban und Fischer, Elsevier, 2006, S.75-100

147. Gawaz M, Bogner C, Gurland HJ: Flow-cytometric analysis of mepacrine-labelled platelets in patients with end-stage renal failure. *Haemostasis* 1993;23:280-292

148. Wall JE, Buijs-Wilts M, Arnold JT, Wang W, White MM, Jennings LK, Jackson CW: A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents. *Br J Haematol* 1995;89:380-385

149. Asch AS, Barnwell J, Silverstein RL, Nachman RL: Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest* 1987;79:1054-1061

150. Imachi H, Murao K, Cao W, Tada S, Taminato T, Wong NC, Takahara J, Ishida T: Expression of human scavenger receptor BI on and in human platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:898-904

151. Steinberg D: Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997;272:20963-20966

152. Ylä-Hertualla S: Oxidized LDL and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1999;874:134-137

153. Han CY, Pak YK: Oxidation-dependent effects of oxidized LDL: proliferation or cell death. *Exp Mol Med* 1999;31:165-173

154. Viora M, Straface E, Di Genova G, Fattorossi A, Rivabene R, Camponeschi B, Masella R, Malorni W: Oxidized low density lipoproteins impair peripheral blood mononuclear cell proliferation and cytokine production. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232:359-363

155. Thai SF, Lewis JG, Williams RB, Johnson SP, Adams DO: Effects of oxidized LDL on mononuclear phagocytes: inhibition of induction of four inflammatory cytokine gene RNAs, release of NO, and cytolysis of tumour cells. *J Leukoc Biol* 1995;57;427-433

156. Chai YC, Howe PH, DiCorleto PE, Chisolm GM: Oxidized low density lipoprotein and lysophosphatidylcholine stimulate cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. Evidence for release of fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem* 1996;271:17791-17797

157. Haberland ME, Olch CL, Fogelman AM: Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the scavenger receptor of human monocyte macrophages. *J Biol Chem* 1984;259:11305-11311

158. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher A, Dimmeler S: Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001;103:2885-2890

159. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher A, Dimmeler S: Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001;89:E1-E7

160. Bush AI, Martins RN, Rumble B, Moir R, Fuller S, Milward E, Currie J, Ames D, Weidemann A, Fischer P, Multhaup G, Beyreuhter K, Masters CL: The amyloid precursor protein of Alzheimer´s disease is released by human platelets. *J Biol Chem* 1990;265;15977-15983

161. Gardella JE, Ghiso J, Gorgone GA, Marratta D, Kaplan AP, Frangione B, Gorevic PD: Intact Alzheimer amyloid precursor protein (APP) is present in platelet membranes and is encoded by platelet mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:1292-1298

162. Smith RP, Broze GJ Jr.: Characterization of platelet-releasable forms of ß-amyloid precursor proteins: the effect of thrombin. *Blood* 1992;80:2252-2260

163. Li QX, Berndt MC, Bush AI, Rumble B, Mackenzie I, Friedhuber A, Beyreuther K, Masters CL: Membrane-associated forms of the ßA4 amyloid protein precursor of Alzheimer´s disease in human platelet and brain: surface expression on the activated human platelet. *Blood* 1994;84:133-142

164. Santiago-Garcia J, Mas-Oliva J, Innerarity TL, Pitas RE: Secreted forms of the amyloid-ß precursor protein are ligands for the class A scavenger receptor. *J Biol Chem* 2001;276:30655-30661

165. Volf I, Moeslinger T, Cooper J, Schmid W, Koller E: Human platelets exclusively bind oxidized low density lipoprotein showing no specifity for acetylated low density lipoprotein. *FEBS Lett* 1999;449:141-145

166. Pedreno J, Fernandez R: Proteolytic susceptibility of platelet low density lipoprotein receptor. *Lipids* 1995;30:927-933

167. Malle E, Sattler W: Platelets and the lipoproteins: native, modified and platelet modified lipoproteins. *Platelets* 1994;5:70-83

168. Engelmann B, Kogl C, Kulschar R, Schaipp B: Transfer of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and sphingomyelin from low- and high-density lipoprotein to human platelets. *Biochem J* 1996;315:781-789

169. Babaev VR, Gleaves LA, Carter KJ, Suzuki H, Kodama T, Fazio S, Linton MF: Reduced atherosclerotic lesions in mice deficient for total or macrophage-specific expression of scavenger receptor-A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2593-2599

170. Greaves DR, Gordon S: Themativ review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res* 2005;46:11-20

171. Moore KJ, Kunjathoor VV, Koehn SL, Manning JJ, Tseng AA, Silver JM, McKee M, Freeman M: Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *J Clin Invest* 2005;115:2192-2201

172. Yamashita S, Hirano KI, Kuwasako T, Janabi M, Toyama Y, Ishigami M, Sakai N: Physiological and pathological roles of a mulit-ligand receptor CD36 in atherogenesis; insights from CD36-deficient patients. *Mol and Cell Biochem* 2007;299:19-22

173. Miyaoka K, Kuwasako T, Hirano K, Nozaki S, Yamashita S, Matsuzawa Y: CD36 deficiency is associated with insulin resistance. *Lancet* 2001;357;686-687

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AcLDL	Acetylated Low Density Lipoprotein
APP	Platelet-Derived Amyloid Precursor Protein
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CPD	Citrat Phosphate Dextrose
CPDA	Citrat Phosphate Dextrose Acid
Dil-AcLDL	1,1´-Dioctadecyl-3,3,3´,3´-tetramethylindocarbocyanine-labeled Acetylated Low Density Lipoprotein
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPC	Endothelial Progenitor Cell
EMMPRIN	Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum
FL1/2-Kanal	Fluoreszenz-1/2-Kanal
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forwardscatter
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
H	Wasserstoff
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HDL	High Density Lipoprotein
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N´-[2-ethansulfonsäure]

IFN-γ	Interferon-γ
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
I.U.	International Units
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
LOX-1	Lectin-like Oxidized LDL-receptor-1
M	Molar (mol/Liter)
Mac-1	Macrophage Antigen-1
MACS	Magnetic Associated Cell Sorting
mAntikörper	monoklonaler Antikörper
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
min	Minute
MIP-1α	Macrophage Inflammatory Protein-1α
mM	Millimolar
mmLDL	minimal modifiziertes Low Density Lipoprotein
MMP	Matrix Metalloproteinase
Monos	Monozyten
MSR-A	Macrophage Scavenger Receptor A
µl	Mikroliter
Na	Natrium
NaCl	Kochsalzlösung
NFκB	Nuclear Factor kappa B
NaOH	Natronlauge
$NaHCO_3$	Natriumbicarbonat
n/e	nicht essentiell
NO	Stickstoffmonoxid
OxLDL	Oxidized Low Density Lipoprotein
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1

PBS	Phosphat Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PMN	Polymorphonuclear Neutrophil
PRP	Plättchenreiches Plasma
SR-A	Scavenger Receptor A
SR-B	Scavenger Receptor B
SSC	Sidescatter
STABW	Standardabweichung
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
Tz	Thrombozyten
U	Unit
uPA	Urokinase-Type Plasminogen Activator
uPAR	Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule
VLA-4	Very Late Antigen Komplex 4
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VLE	Very Low Endotoxin
WHO	World Health Organisation
W/v	Gewicht/Volumen (Mischungsverhältnis)

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inflammatorische Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und anderen Zellen aus: May AE, Seizer P, Gawaz M: Platelets: Inflammatory Firebugs of Vasculary Walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:s5-s10 (Abbildung 3) 8

Abbildung 2: Schaumzellen bei 20-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop 22

Abbildung 3: Schaumzellen, die sich aus $CD34^+$-Progenitorzellen durch native Thrombozyten induziert innerhalb von 15 Tagen entwickelt haben 27

Abbildung 4: Die in den Ko-Kulturen mit $CD34^+$-Progenitorzellen und nativen Thrombozyten entstandenen Schaumzellen wurden durch den Nachweis des für Schaumzellen typischen Oberfächenmarkers CD68 in der Immunfluoreszenzmikroskopie als Schaumzellen identifiziert 28

Abbildung 5: Schaumzellen, die sich innerhalb von 15 Tagen Thrombozyten-induziert aus Monozyten entwickelt haben 29

Abbildung 6: Inhibition der Entwicklung von Schaumzellen aus $CD34^+$-Progenitorzellen durch die Blockade von Scavenger-Rezeptoren 32

Abbildung 7: Vergleich der in Ko-Kulturen mit $CD34^+$-Progenitorzellen und nativen Thrombozyten entstandenen Schaumzellen in der Lichtmikroskopie bei 20-facher Vergrößerung 33

Abbildung 8: Inhibition der Entwicklung von Schaumzellen aus Monozyten durch die Blockade von Scavenger-Rezeptoren 35

Abbildung 9: Vergleich der in Ko-Kulturen mit Monozyten und nativen Thrombozyten entstandenen Schaumzellen in der Lichtmikroskopie bei 20-facher Vergrößerung 36

Abbildung 10: Nachweis der Phagozytose lipidbeladener und fluoreszenzmarkierter Thrombozyten durch Schaumzellen in der Immunfluoreszenzmikroskopie 38

Abbildung 11: Phagozytose markierter und beladener Thrombozyten durch Schaumzellen, die sich aus $CD34^+$-Progenitorzellen entwickelt haben 40

Abbildung 12: Phagozytose markierter und beladener Thrombozyten durch Schaumzellen, die sich aus Monozyten entwickelt haben 42

Abbildung 13: Phagozytoseaktivität der aus $CD34^+$-Progenitorzellen differenzierten Schaumzellen bezüglich Mepacrine-markierter Thrombozyten im Histogramm 44

Abbildung 14: Phagozytoseaktivität der aus $CD34^+$-Progenitorzellen differenzierten Schaumzellen bezüglich Dil-AcLDL-beladener Thrombozyten im Histogramm 45

Abbildung 15: Phagozytose beladener Thrombozyten durch Schaumzellen, die sich aus $CD34^+$-Progenitorzellen differenziert haben 46

Abbildung 16: Phagozytoseaktivität der aus Monozyten entstandenen Schaumzellen bezüglich Mepacrine-markierter Thrombozyten im Histogramm 47

Abbildung 17: Phagozytoseaktivität der aus Monozyten entstandenen Schaumzellen bezüglich DiI-AcLDL-beladener Thrombozyten im Histogramm 48

Abbildung 18: Phagozytose beladener Thrombozyten durch Schaumzellen, die sich aus Monozyten differenziert haben 49

Abbildung 19: Thrombozyten-vermittelte Differenzierung von endothelialen Progenitorzellen zu Endothelzellen oder Schaumzellen aus: May AE, Seizer P, Gawaz M: Platelets: Inflammatory Firebugs of Vasculary Walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:s5-s10 (Abbildung 3) 55

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Schaumzellen, die sich in Ko-Kulturen aus $CD34^+$-Progenitorzellen und nativen Thrombozyten nach Blockade der Scavenger-Rezeptoren CD36, MSR-A und LOX-1 entwickelt haben 31

Tabelle 2: Schaumzellen, die sich in Ko-Kulturen aus Monozyten und nativen Thrombozyten nach Blockade der Scavenger-Rezeptoren CD36, MSR-A und LOX-1 entwickelt haben 34

Tabelle 3: Mittlere Fluoreszenzaktivität der Schaumzellen aus $CD34^+$-Progenitorzellen nach Phagozytose Mepacrine-markierter und Dil-AcLDL-beladener Thrombozyten 46

Tabelle 4: Mittlere Fluoreszenzaktivität der Schaumzellen aus Monozyten nach Phagozytose Mepacrine-markierter und Dil-AcLDL-beladener Thrombozyten 49

7.4 Danksagung

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz und meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andreas May, die mir neben der Bereitstellung des Themas viele wertvolle und konstruktive Anregungen gaben und ohne deren Ratschläge die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meinem Betreuer Herrn Dr. Peter Seizer danke ich herzlich für seine Geduld und sein Engagement, die mir besonders bei der Durchführung der Experimente und der wissenschaftlichen Auseinandersetzung mit dem Thema meiner Promotion geholfen haben sowie für die durch ihn vermittelte Begeisterung und Motivation für die Forschung auf dem Gebiet der Herz- und Kreislauf-Erkrankungen.

Dank schulde ich auch Frau Klaudia Posavec für ihre praktische Unterstützung im Labor, die vor allem bei den FACS-Versuchen und der Monozyten-Isolation hilfreich war und Frau Jadwiga Kwiatkowska für die Isolation der $CD34^+$-Progenitorzellen.

Außerdem danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors, die mir bei meiner Labortätigkeit Fragen beantwortet oder mich anderweitig unterstützt haben.

Herrn Senator E.h. Josef Martin, Dipl. Ing. FH danke ich besonders herzlich für seine Hilfe bei den Computerarbeiten.

Ich danke allen Kommilitoninnen und Kommilitonen, die für meine Experimente Blut spendeten.

Meiner Mutter danke ich für ihre liebevolle Unterstützung während der Promotion und des gesamten Studiums.

7.5 Lebenslauf

Name:	Susanne Barbara Schiemann
Geboren:	26.02.1984 in Ostfildern-Ruit
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulausbildung:	1990-1994 Besuch der Grundschule Riedlingen 1994-2003 Besuch des Kreisgymnasiums Riedlingen
Schulabschluss:	Abitur im Juni 2003 e-fellows.net-Stipendium Preis des Landrats für Französisch und Physik Preis des Kreisgymnasiums Großes Latinum 2001
Studium:	seit Oktober 2003 Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Herbst 2005
Praktisches Jahr:	Erstes Tertial: August bis November 2008, Neurologische Klinik, Kantonsspital Aarau, Schweiz Zweites Tertial: Dezember 2008 bis April 2009, Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Sigmaringen Drittes Tertial: April bis Juli 2009, Chirurgie, Kreiskrankenhaus Sigmaringen.
06.05.2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung