

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
(Schwerpunkte: Kardiologie und Kreislauferkrankungen)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz

Einfluss von Thrombozyten auf die Adhäsion und Funktion dendritischer Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Gregor Braun

aus

Stuttgart

2008

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
(Schwerpunkte: Kardiologie und Kreislauferkrankungen)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz

Einfluss von Thrombozyten auf die Adhäsion und Funktion dendritischer Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Gregor Braun

aus

Stuttgart

2008

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

Meinen Eltern gewidmet

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	8
2.1. Verwendete Chemikalien, Antikörper und Materialien.....	8
2.2. Medien und Puffer-Lösungen	10
2.3. Isolierung von dendritischen Zellen	11
2.4. Charakterisierung der isolierten dendritischen Zellen, Durchflusszytometrie	12
2.5. Isolierung von Thrombozyten	13
2.6. Statische Adhäsion.....	13
2.7. Adhäsion unter arteriellen Flussbedingungen	14
2.8. Analyse von potentiellen Adhäsionsrezeptoren auf dendritischen Zellen (Durchflusszytometrie).....	17
2.9. Evaluation der Differenzierung von dendritischen Zellen durch Thrombozyten (Durchflusszytometrie).....	17
2.10. „Mixed-Lymphocyte-Reaction“ (MLR-Assay).....	17
2.11. Koinkubation und Phagozytose	18
2.12. Transmissionselektronenmikroskopie	19
2.13. Propidiumjodid-Kernfärbung nach Nicoletti	19
2.14. „Terminal-uridine-nick-end-labeling“(TUNEL)-Assay.....	21
2.15. Statistische Analyse	21
3. Ergebnisse	22
3.1. Charakterisierung der isolierten dendritischen Zellen.....	22
3.2. Thrombozyten vermitteln die Adhäsion von dendritischen Zellen an Kollagen	23
3.3. Expression von Adhäsionsrezeptoren	25
3.4. Adhäsionsverhalten unter arteriellen Flussbedingungen.....	26

3.5. Einfluss von Thrombozyten auf die Differenzierung von dendritischen Zellen	30
3.6. Aktivierung von dendritischen Zellen durch Thrombozyten	32
3.7. Phagozytose von Thrombozyten durch dendritische Zellen	34
3.8. Thrombozyteninduzierte Apoptose von dendritischen Zellen	39
4. Diskussion	43
5. Zusammenfassung	48
6. Abkürzungsverzeichnis	50
7. Literaturverzeichnis	51
8. Veröffentlichungen	55
9. Danksagung	57
10. Lebenslauf	58

1. Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind in Deutschland für nahezu jeden zweiten Todesfall verantwortlich und die führende Todesursache in der westlichen Welt [1]. Darüber hinaus gehören sie zu den Hauptursachen für Behinderung und bleibende Einschränkung der Lebensqualität. Die bedeutsamste Ursache kardiovaskulärer Erkrankungen ist die Atherosklerose [2, 3].

Studien an Tiermodellen und am Menschen haben gezeigt, dass Atherosklerose nicht nur eine Ablagerung von Lipiden in der Wand großer Arterien mit dadurch entstehender Wandverdickung ist. Atherosklerose ist vielmehr eine über Jahrzehnte verlaufende entzündliche Erkrankung der Gefäße, deren Verlauf durch zahlreiche Risikofaktoren beeinflusst wird, aber auch in starkem Maße vom Ablauf lokaler Prozesse im Milieu der atherosklerotischen Läsion abhängt [2-4].

Hauptursache für das Entstehen von Komplikationen der Atherosklerose, wie Myokardinfarkt und Schlaganfall, ist der Gefäßverschluss durch Bildung eines Thrombus. Ausgelöst wird die Thrombusbildung durch Ruptur der Plaque oder durch Erosion des Endothels [2]. Dabei wird stark thrombogenes Material aus dem Inneren der Plaque dem Blutstrom ausgesetzt und führt zur unkontrollierten Aktivierung von Thrombozyten. Der Abbau der schützenden und stabilisierenden fibrösen Kappe im Bereich der Plaqueschulter durch entzündliche Mechanismen begünstigt die Plaqueruptur [2].

Atherosklerose beginnt bereits beim jungen Menschen als eine rein entzündliche Läsion der Gefäßwand („fatty streak“), eine stets symptomlose, sub-endotheliale Ansammlung von hauptsächlich Makrophagen und T-Zellen [2, 3]. Durch Aktivierung des Endothels, durch LDL-Aufnahme mit nachfolgender Oxidierung, durch in der Intensität wechselnden hämodynamischen Stress [2, 4] sowie weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes mellitus und Hyperhomocysteinämie [3] kommt es zur Expression von Leukozyten-adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und V-CAM [2-4] und darauf folgend zur Leukozyteninvasion. Die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen führt zur Entstehung eines Entzündungsmilieus im Bereich der Gefäßintima, das zur

weiteren Bildung von oxidiertem LDL und zur Aktivierung von Endothelzellen, eingewanderten Makrophagen, T-Zellen und dendritischen Zellen beiträgt [2]. Im Verlauf der Entzündungsreaktion wächst die Plaque durch weitere Leukozyteninvasion und Proliferation von glatten Muskelzellen [3].

Die eingewanderten Makrophagen nehmen u.a. über Scavengerrezeptoren oxidiertes LDL auf und werden zu Schaumzellen [2]. Die Plaque wird zum Atherom, eine fortgeschrittene Plaque mit einem zentralen Kern aus Lipiden, Schaumzellen und nekrotischem Material, umgeben von einer fibrösen Kappe aus kollagenreicher Matrix [2, 3]. Ein vulnerabler Bereich der Plaque ist die Plaqueschulter, welche eine Prädilektionsstelle für den Einriss der fibrösen Kappe und die daraus entstehende Plaqueruptur darstellt. In den Bereich der Plaqueschulter wandern T-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen und Mastzellen ein. Dort stimulieren T-Zellen Makrophagen zur Bildung von Matrixmetalloproteasen und radikalen Sauerstoffspezies, die die fibröse Kappe ausdünnen und so deren Riss begünstigen [2, 3].

Neben Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen sind aufgrund neuerer Studien andere, bisher weniger beachtete Zellarten in den Blickpunkt der Forschung gerückt, da sie möglicherweise entscheidend zur Plaqueentstehung beitragen und ein Angriffspunkt für neue Therapien sein könnten. Besondere Beachtung verdienen hierbei Thrombozyten und dendritische Zellen.

Thrombozyten spielen durch ihre Fähigkeit zur Thrombusbildung eine Schlüsselrolle im Heilungsprozess von Gefäßverletzungen. Sie bewirken bei ihrer Aktivierung an denudierten Gefäßabschnitten aber auch einen thrombotischen Verschluss von Gefäßen. Über ihren Beitrag zur Hämostase hinaus sind Thrombozyten auch direkt an der Entstehung und dem Progress der Atherosklerose beteiligt. So trägt die thrombozytenvermittelte Rekrutierung von Leukozyten in die Arterienwand entscheidend zur Bildung einer atherosklerotischen Läsion bei [5]. Im Tiermodell konnte demonstriert werden, dass eine Hemmung des Plättchenadhäsionsrezeptors GPIIb bei ApoE-knockout-Mäusen die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen drastisch reduziert [5].

Durch ihre Interaktion mit Endothelzellen triggern Thrombozyten die Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen und fördern damit indirekt die Leukozyteninvasion. Auch konnte kürzlich gezeigt werden, dass durch Thrombozyten die Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen in vaskuläre Läsionen vermittelt wird [6]. Darüber hinaus präsentieren oder sezernieren aktivierte Thrombozyten proinflammatorische Substanzen wie CD40L [7], Chemokine (RANTES, PF4), Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- β , EGF, bFGF) und zytokinartige Faktoren (IL-1 β , β -Thromboglobulin) [8]. Dies unterstreicht die Bedeutung von Thrombozyten bei der Entstehung der Atherosklerose.

Dendritische Zellen kommen in allen Geweben stets nur in geringer Zahl vor; sie haben aber aufgrund ihrer stark ausgeprägten Fähigkeit, Antigene zu präsentieren, eine herausragende Bedeutung bei der Initiierung einer Immunantwort und bei der Regulierung sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems [9].

Langerhans beschrieb die nach ihm benannten dendritischen Zellen der Haut bereits im Jahre 1868; Steinman und Cohen entdeckten 1973 ihre Funktion als antigenpräsentierende Zellen [10]. 1995 wurden durch Bobryshev und Lord dendritische Zellen in der Wand großer Arterien beschrieben [11]. Seither wurden einige Hinweise gefunden, die dafür sprechen, dass dendritische Zellen eine wichtige Rolle bei der Plaquentstehung und Plaquestabilisierung spielen.

Dendritische Zellen sind die am stärksten antigenpräsentierenden Zellen des Körpers und in der Lage, T- und B-Zellen effektiv zu stimulieren. Ihre wichtigste Aufgabe ist die Stimulation von T-Zellen, wobei Gedächtnis-, Effektor- und selbst naive T-Zellen stimuliert werden können. Wenn antigenes Material ohne Kostimulation präsentiert wird, unterdrücken sie die T-Zell-Antwort und vermitteln so Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen [12].

Alle Funktionen von dendritischen Zellen können durch alleinigen Kontakt mit infektiösen Agenzien oder Entzündungsprodukten ausgelöst werden [12].

Dendritische Zellen spielen daher eine Schlüsselrolle bei der Initiierung oder Unterdrückung einer Immunantwort.

Dendritische Zellen lassen sich aus mehreren Quellen differenzieren: Aus CD34⁺-Stammzellen des Knochenmarks gehen Vorläuferzellen der dendritischen Zellen hervor, die in den meisten Geweben vorkommen, und durch verschiedene Zytokine (CD40L, GM-CSF, IL-3, TNF α) zu Wachstum und Differenzierung angeregt werden. Auch aus Monozyten des Blutes können durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF [12] oder CD40L [13] dendritische Zellen gewonnen werden.

Dendritische Zellen durchlaufen in ihrer Entwicklung drei Reifungsstadien, während denen sie im Allgemeinen als Vorläuferzellen, unreife und reife dendritische Zellen bezeichnet werden. Unreife dendritische Zellen prüfen ihre Umgebung kontinuierlich auf antigenes Material. Durch Phagozytose, adsorptive Endozytose über C-Typ Lectine, Fc γ und Fc ϵ und einen als Makropinozytose bezeichneten Prozess, bei dem große pinozytische Vesikel mit Extrazellulärflüssigkeit aufgenommen werden, können Antigene so effizient aufgenommen werden, dass zu deren Präsentation selbst Konzentrationen im nano- und pikomolekularen Bereich genügen [12]. Wenn Antigene aufgenommen wurden, werden sie an MHCII-Komplexe oder CD1-Moleküle gebunden und auf der Zelloberfläche präsentiert [14]. Um T-Zellen stimulieren zu können, müssen dendritische Zellen ihren Reifungsprozess durchlaufen und wandern dazu meist über die Lymphwege in Lymphknoten oder die Milz. Während der Reifung wird die Antigenaufnahme gedrosselt und stattdessen werden Adhäsionsmoleküle (CD11b, CD50, CD54, CD58), kostimulierende Moleküle (CD40, CD80, CD86) und antigenpräsentierende Moleküle (MHCI und II, CD1) exprimiert. Dadurch sind dendritische Zellen in der Lage, an T-Zellen zu binden und diese zu aktivieren [14]. Dendritische Zellen scheinen aber auch in nicht-lymphatischen Geweben reifen und T-Zellen stimulieren zu können [15].

Eine Subspezies von dendritischen Zellen, die vaskulären dendritischen Zellen, bilden in der Intima von gesunden Arterien ein Netzwerk mit T-Zellen und Makrophagen, das Teil eines vaskulären lymphatischen Gewebes (VALT) sein soll [16].

In Gefäßabschnitten, die für Atherosklerose prädisponiert sind, treten dendritische Zellen gehäuft auf [17]. So sind insbesondere an zu Atherosklerose neigenden Abschnitten von Carotiden und Aorta mehr dendritische Zellen zu finden als in nicht zu Atherosklerose neigenden Wandabschnitten [17]. Bei Kindern im Alter zwischen 8 Monaten und 10 Jahren fanden sich in den Carotiden an Stellen, die stärkerem hämodynamischen Stress ausgesetzt sind, mehr dendritische Zellen als in anderen Wandabschnitten [18].

In atherosklerotischen Gefäßen steigt die Zahl der dendritischen Zellen an [14]. Auch werden vaskuläre dendritische Zellen in frühen Stadien der Atherosklerose vermehrt aktiviert [18]. Lymphknoten im Abflussgebiet von atherosklerotischen Läsionen, so zum Beispiel paraaortale Lymphknoten, zeigen mehr interdigitierende Zellen als solche in Arterienabschnitten ohne Atherosklerose [9]. Dies stützt die These, wonach dendritische Zellen in Plaques Antigen aufnehmen und prozessieren, um dann zur Reifung in benachbarte Lymphknoten zu wandern und dort T-Zellen zu stimulieren. Aufgrund von histopathologischen Studien scheint es plausibel, dass nur einige dendritische Zellen in Lymphknoten auswandern, während andere direkt in der Intima T-Zellen aktivieren [15]. So sind in atherosklerotischen Läsionen dendritische Zellen am häufigsten in T-Zell-reichen Gebieten zu finden und bilden dort mit T-Zellen Cluster [15].

In fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen steigt die Zahl der dendritischen Zellen noch einmal deutlich an, wobei über 90 % der dendritischen Zellen sich im rupturgefährdeten Bereich der Plaqueschulter konzentrieren [15, 19]. Yilmaz et al. zeigten in einer histologischen Untersuchung an 44 Thrombendarteriektomie-Präparaten, dass in fortgeschrittenen Läsionen mehr dendritische Zellen vorkommen als in kleinen und dass bei vulnerablen Plaques gegenüber stabilen fortgeschrittenen Läsionen die Zahl der dendritischen Zellen noch weiter erhöht ist. Darüber hinaus steigt mit Fortschreiten der Läsion der Anteil von reifen dendritischen Zellen an. So sind in initialen Läsionen 55 % der dendritischen Zellen positiv auf den Reifemarker CD83, in fortgeschrittenen sind es 70 % [19].

Bei Patienten, deren Gefäßstenosen durch transitorisch ischämische Attacke oder Schlaganfall symptomatisch geworden waren, fanden sich signifikant mehr dendritische Zellen in der Plaque als bei Patienten ohne klinische Symptome [19]. Mit Statinen behandelte Patienten hingegen zeigten eine signifikant geringere Zahl dendritischer Zellen in den untersuchten Plaques, als dies bei unbehandelten Patienten der Fall war [19].

Diese Ergebnisse legen nahe, dass sowohl Thrombozyten wie auch dendritische Zellen zur Entstehung und Progression der Atherosklerose beitragen. Auf welchem Weg dendritische Zellen in vaskuläre Läsionen einwandern und welche Stimuli dort zu ihrer Reifung beitragen, ist bisher noch weitgehend unbekannt. Einzelne Untersuchungen in jüngster Zeit belegen aber eine direkte Wechselwirkung von Thrombozyten mit dendritischen Zellen [20-23].

Es zeigt sich dabei ein uneinheitliches Bild, da einige Arbeiten eine Hemmung der Aktivität dendritischer Zellen durch Blutplättchen belegen, wohingegen andere Untersuchungen eine vermehrte Aktivierung und Reifung von dendritischen Zellen durch Thrombozyten ergaben [20-23].

In vitro Versuche mit Thrombozyten, die GP96 gebunden hatten und mit dendritischen Zellen koinkubiert wurden, zeigten, dass unter diesen Bedingungen dendritische Zellen weniger TNF α und IL-12 produzieren und eine reduzierte Expression von Reifungsmarkern wie CD83 und CD86 aufweisen [20].

Versuche mit dendritischen Zellen und aktivierten Thrombozyten ergaben, dass die Expression von CD1a, einem MHC-ähnlichen Molekül zur Präsentation von Antigen auf dendritischen Zellen, durch aktivierte Thrombozyten um 62 % reduziert wird [22]. Außerdem wird laut diesen Daten die Produktion von IL-12 und TNF α durch ruhende und aktivierte Thrombozyten vermindert. IL-10, ein antiinflammatorisches Zytokin, das die Funktion von dendritischen Zellen und Makrophagen drosselt, wird hingegen vermehrt gebildet [22].

Eine Beeinflussung der Fähigkeit, allogene T-Zellen zu stimulieren, wurde von dieser Arbeitsgruppe allerdings nicht beobachtet [20].

Andere Arbeiten legen im Gegensatz dazu eine proinflammatorische Wirkung von Thrombozyten auf dendritische Zellen nahe [21, 23].

Eine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass thrombinaktivierte Thrombozyten die Reifung von dendritischen Zellen, gemessen an der Expression von HLA-DR, induzieren. Dieser Effekt war durch einen blockierenden Antikörper gegen CD40-Ligand hemmbar [21].

Martinson et al. beobachteten bei Koinkubation von dendritischen Zellen mit thrombinaktivierten autologen Thrombozyten eine gesteigerte Expression von Reife- und Aktivierungsmarkern wie CD80, CD83 und CD86. Die Expression dieser Marker war ähnlich stark wie auf dendritischen Zellen, die durch löslichen CD40-Ligand stimuliert worden waren [23].

Es gibt also Hinweise auf eine Interaktion zwischen Thrombozyten und dendritischen Zellen. Unbeantwortet bleibt bisher aber die Frage, ob die Interaktion eher zur Aktivierung der dendritischen Zellen beiträgt - und damit proinflammatorisch wirkt - oder ob dendritische Zellen in ihrer Aktivität herabreguliert werden und vielleicht toleranzvermittelnde Funktion gewinnen. Außerdem ist offen, ob Thrombozyten und dendritische Zellen auch unter in vivo Bedingungen, so zum Beispiel unter arteriellen Strömungsverhältnissen, aneinander adhärieren und in Interaktion treten können.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher, zu untersuchen, welche Rolle Thrombozyten bei der Adhäsion von dendritischen Zellen an vaskuläre Läsionen spielen und welche Auswirkungen diese Interaktion auf die Funktion von dendritischen Zellen hat.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Chemikalien, Antikörper und Materialien

Substanz:	Hersteller:
Bovines Serum Albumin Fraktion V 96%	Sigma, St. Louis, USA
CaCl ₂ -Dihydrat	Sigma, St. Louis, USA
CD40-Ligand	Biozol, Eching, Deutschland
Celltracker orange CMTMR	Molecular probes, Leiden, Niederlande
Fetales Kälberserum	PAA, Pasching, Österreich
Zitrat	Sigma, St. Louis, USA
Ficoll	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glucose	Sigma, St. Louis, USA
GM-CSF	Leukine Liquide Sargramostin, Berlex Laboratories, Richmond, USA
Hepes-Puffer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Humanes Fibronectin	BD, Franklin Lakes, USA
Humanes Kollagen I	BD, Franklin Lakes, USA
Interleukin-4	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
MEBSTAIN apoptosis kit direct	Beckmann Coulter, Fullerton, USA
MgCl ₂ -Hexahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mitomycin C	Medac, Hamburg, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS	Gibco, Grand Island, USA
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 + GlutaMAX I + HEPES 25mM	Gibco, Grand Island, USA
Salzsäure 1N	Merck, Darmstadt, Deutschland
X-Vivo-20-Medium	Bio Whittaker, Verviers, Belgien

Antikörper:	Klon:	Hersteller:
anti-CD1a	HI149	BD Pharmingen, San Jose, USA
anti-CD3	SK7	BD, Franklin Lakes, USA
anti-CD11a	HI111	Biozol, Eching, Deutschland
anti-CD11b	ICRF44	Biozol, Eching, Deutschland
anti-CD11b	BEAR 1	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD11c	3.9	Biozol, Eching, Deutschland
anti-CD11d	A01	Abnova, Taipei, Taiwan
anti-CD14	MΦP9	BD, Franklin Lakes, USA
anti-CD18	IB4	Ancell, Bayport, USA
anti-CD19	LT19	Serotec, Düsseldorf, Deutschland
anti-CD29	3S3	BD, Franklin Lakes, USA
anti-CD41	P2	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD49b	AK7	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD49d	9F10	BD Pharmingen, San Jose, USA
anti-CD49e	SAM-1	Serotec, Düsseldorf, Deutschland
anti-CD49f	Go H3	BD Pharmingen, San Jose, USA
anti-CD51	AMF7	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD61	SZ21	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD62P	G1-4	Ancell, Bayport, USA
anti-CD80	L307.4	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD83	HB15e	BD, Franklin Lakes, USA
anti-CD86	GL1	BD Pharmingen, San Jose USA
anti-CD162	KPL-1	BD Pharmingen, San Jose, USA
anti-HLA-DR	L243	BD, Franklin Lakes, USA
Maus IgG _{2b} κ	27-35	BD Pharmingen, San Jose, USA
Maus IgG ₁ κ	MOPC-21	BD Pharmingen, San Jose, USA
Maus IgG ₁ κ	X40	BD, Franklin Lakes, USA

Materialien	Hersteller
1,5 µl-Gefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
15 und 50 ml-Gefäße	BD Biosciences, San Jose, USA
Analysesoftware: Cellquest und Cellquest Pro	BD, Franklin Lakes, USA
Brutschrank: HeraCell 240	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Durchflusszytometer: FACSCalibur	BD, Franklin Lakes, USA
Eppendorf Reference Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Flusskammer: Parallel-Plate-Flow Chamber	Oligene, Berlin, Deutschland
Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Konfokales Mikroskop: Leica TCS-ST	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrotiterplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark
Perfusor fm	Braun, Melsungen, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop: Zeiss Axiovert 200	Zeiss, Jena, Deutschland
Zellzählautomat: Se 9000	Sysmex, Kobe, Japan
β-Counter: 1205 Betaplate Liquidszintillation Counter	Perkin Elmer, Waltham, USA

2.2. Medien und Puffer-Lösungen

Medium für dendritische Zellen:	RPMI 1640 Medium + 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum + 100 IU/ml Penicillin + 100 IU/ml Streptomycin
Tyrodes 10x Lösung:	80 g NaCl + 10,15 g NaHCO ₃ + 1,95 g KCl + 1000 ml Aqua dest.
Tyrodes Puffer pH 7,4:	0,2 g Glucose + 0,2 g BSA + 20 ml Tyrodes 10x Lösung + 180 ml Aqua dest. Mit Hepes-Puffer auf pH 7,4 eingestellt
Tyrodes Puffer pH 6,5:	Tyrodes Puffer pH 7,4 mit HCl 1N auf pH 6,5 eingestellt

2.3. Isolierung von dendritischen Zellen

Dendritische Zellen können aus CD14⁺- Monozyten entstehen, wenn diese in Gegenwart von Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) und Interleukin-4 (IL-4) in Kultur gehalten werden. Es entwickeln sich unreife dendritische Zellen, deren Reifung durch inflammatorische Stimuli wie CD40L, TNF α , IL-1 und LPS erreicht werden kann [13].

Die in dieser Arbeit verwendeten dendritischen Zellen wurden ausschließlich aus CD14⁺-Monozyten aus dem Leukozytenüberstand („Buffycoat“) von Spendern der Blutbank in Tübingen gewonnen. Durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF wurden Monozyten zu dendritischen Zellen differenziert. Um reife dendritische Zellen zu gewinnen, wurden Monozyten in Gegenwart von IL-4, GM-CSF und CD40-Ligand kultiviert.

Aus von der Blutbank freundlicherweise zur Verfügung gestellten HLA-A*02 positiven Buffycoats wurden durch Ficoll/Paque-Dichtegradient-Zentrifugation PBMNCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) gewonnen. Dazu wurde das leukozytenreiche Spenderblut auf 50 ml-Falcon-Gefäße verteilt und mit PBS verdünnt. Pro Gefäß wurden 12 ml Ficoll (Dichte 1,077 g/ml) vorsichtig unterschichtet. Es wurde 15 Minuten bei 1800 U/min und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Buffycoat vorsichtig abgehoben und zweimal gewaschen. Die Zellen wurden in serum-freiem X-Vivo-20-Medium resuspendiert und zur Adhäsion an Kunststoff in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/Well in 3 ml Medium in 6-Well-Platten gegeben. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die nicht-adhärenenten Zellen durch vorsichtiges Waschen entfernt. Die übrig gebliebenen adhärenenten Monozyten wurden zu unreifen dendritischen Zellen differenziert, indem sie für sechs Tage in 3 ml RPMI-Medium, angereichert mit humanem, rekombinant hergestelltem GM-CSF (100 ng/ml) und IL-4 (20 ng/ml), gehalten wurden. An Tag zwei, vier und sechs wurden nochmals 40 ng IL-4 und 200 ng GM-CSF je Well hinzugegeben. Zur Gewinnung von reifen dendritischen Zellen wurde an Tag sechs der Inkubation CD40L (100 ng/ml) hinzugegeben.

Nach sieben Tagen wurden die Zellen durch vorsichtiges Spülen gelöst, gewaschen und in RPMI-Medium aufgenommen.

2.4. Charakterisierung der isolierten dendritischen Zellen, Durchflusszytometrie

Dendritische Zellen wurden nach ihrer Gewinnung aus Monozyten mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von Oberflächenmarkern untersucht, um ihren Reifungs- und Differenzierungsgrad zu bestimmen. Es wurde die Expression von CD1a, CD14, CD40, CD54, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR nach siebentägiger Stimulation mit Zytokinen untersucht. Die Zellen wurden in Gegenwart von IL-4 und GM-CSF oder IL-4, GM-CSF und CD40-Ligand kultiviert (siehe Kapitel 2.3).

Die im Folgenden beschriebene Färbung wurde für alle durchflusszytometrischen Messungen dieser Arbeit verwendet, sofern nicht anders beschrieben.

Es wurden Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) gelabelte Antikörper verwendet. Als Kontrollen dienten unspezifisch bindende Antikörper des gleichen Isotyps (IgG₁ κ oder IgG_{2b} κ).

Für die Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurden dendritische Zellen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden im verbleibenden Medium resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit mit jeweils 10 µl der Antikörperlösung (5 µg/ml) inkubiert. Für CD83 wurden 20 µl der anti-CD83 Antikörperlösung zugegeben. Danach wurden jeweils 2 ml PBS hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Probe in 100 µl PBS resuspendiert und auf Eis gestellt. Die Messung erfolgte innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer.

Alle durchflusszytometrischen Messungen erfolgten an Durchflusszytometern des Typs FACSCalibur von Becton-Dickinson. Als Analysesoftware wurde Cellquest oder Cellquest Pro verwendet.

2.5. Isolierung von Thrombozyten

Um die Wirkung von Thrombozyten auf dendritische Zellen möglichst unverfälscht zu untersuchen, wurden aus dem Blut von Spendern Thrombozytenisolate hergestellt, wie bereits zuvor in anderen Arbeiten beschrieben [24].

Thrombozytenisolate haben gegenüber plättchenreichem Plasma den Vorteil, dass die Ergebnisse der Versuche nicht durch Plasmabestandteile beeinflusst werden können.

Thrombozyten wurden stets erst kurz vor der Verwendung isoliert, vorsichtig und erschütterungsarm verarbeitet und vor Kälte geschützt um eine Aktivierung und Aggregation zu vermeiden. An gesunden Spendern wurde die Kubitalvene punktiert und das venöse Blut vorsichtig in 20 ml-Spritzen mit 4 ml Acetat-Citrat-Dextrose-Puffer (ACD-Puffer) aufgezogen. Es wurde sichergestellt, dass Blut und ACD-Puffer gut gemischt waren, um eine gute Gerinnungshemmung zu erreichen. Das ACD-Blut wurde vorsichtig in 15 ml-Falcon-Gefäße überführt und 20 Minuten bei 170 g und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma (PRP) wurde abgehoben, in 50 ml-Falcon-Gefäßen auf 35 ml mit Tyrodes Puffer pH 6,5 aufgefüllt und 10 Minuten bei 700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 500 µl Tyrodes Puffer pH 7,4 resuspendiert. Die Thrombozytenkonzentration wurde mit einem Zellzählautomat gemessen. Die Thrombozyten wurden sofort für Versuche verwendet. Für Adhäsionsexperimente wurde kurz vor Beginn CaCl_2 (1 mmol/l) und MgCl_2 (1 mmol/l) hinzugegeben.

2.6. Statische Adhäsion

Um das Adhäsionsverhalten von dendritischen Zellen auf Thrombozyten unter statischen Bedingungen zu untersuchen, wurden Adhäsionsversuche auf immobilisierten Thrombozyten durchgeführt. Als Kontrolle wurde die Adhäsion von dendritischen Zellen auf Kollagen Typ I bestimmt, als Positivkontrolle diente die Adhäsion auf Fibronectin, die bereits in anderen Arbeiten beschrieben wurde [25].

Mikrotiterplatten wurden mit Kollagen Typ I (50 μ l, 10 μ g/ml) oder Fibronectin (50 μ l, 10 μ g/ml) beschichtet, getrocknet, gewaschen und eine Stunde mit PBS/2%BSA geblockt, um unspezifische Bindungen zu verhindern.

Um die Mikrotiterplatten mit Thrombozyten zu beschichten, wurden isolierte Thrombozyten (50 μ l, Konzentration 2×10^8 /ml) eine Stunde in mit Kollagen Typ I beschichtete Mikrotiterplatten gegeben und einmal sanft mit Tyrodes Puffer gewaschen, um nicht haftende Thrombozyten zu entfernen.

In jedes Well wurden 25000 dendritische Zellen in 50 μ l RPMI-Medium gegeben, zehn Minuten bei 1000 U/min anzenrifugiert und für zwei Stunden bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert. Die nichtadhärenten Zellen wurden in zwei vorsichtigen Waschschritten mit Tyrodes Puffer entfernt. Die Anzahl der adhärennten Zellen wurde direkt im Anschluss durch Zählen der Zellen in Phasenkontrastmikroskopie bestimmt.

2.7. Adhäsion unter arteriellen Flussbedingungen

In wichtigen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen wie Wundheilung, Metastasierung und Progression der Atherosklerose spielen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen eine entscheidende Rolle. Um diese Interaktionen zu untersuchen, wurde der zuvor beschriebene statische Adhäsionsassay verwendet. Ein Nachteil statischer Adhäsionsassays ist aber, dass die Scherkräfte, die in Blutgefäßen aufgrund der herrschenden Strömung wirken, nicht berücksichtigt werden können. Diese Scherkräfte sind aber von großer Bedeutung, da sie einerseits die Biologie der adhärennten Zelle und andererseits die Funktion des Adhäsionsziels, z.B. der immobilisierten Thrombozyten, verändern.

Um in vitro die Situation der arteriellen Endstrombahn nachzuahmen, wurde daher eine Parallel-Platten-Flusskammer verwendet (Abb. 1A & B) wie in der Literatur bereits beschrieben [6]. Darin können dendritische Zellen über variable Oberflächen aus Matrixproteinen oder lebenden Zellen wie z.B. Thrombozyten perfundiert werden. Mittels Phasenkontrastmikroskopie lassen sich „Rolling“ und Adhäsionsvorgänge direkt beobachten.

Es wurden dabei in Medium suspendierte dendritische Zellen ($2,5 \times 10^5/\text{ml}$) über eine Schicht aus lebenden Thrombozyten oder aus Kollagen Typ I perfundiert. Dazu wurden Deckgläschen mit Kollagen Typ I ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) beschichtet, getrocknet und in allen Versuchen verwendet. Thrombozyten wurden auf kollagenbeschichteten Deckgläschen immobilisiert indem frisch gewonnene isolierte Thrombozyten ($1 \times 10^8/\text{ml}$ in Tyrodes Puffer pH 7,4) für drei Minuten über Kollagen beschichtete Deckgläschen perfundiert wurden.

Direkt nach Immobilisation der Thrombozyten wurden dendritische Zellen ($2,5 \times 10^5/\text{ml}$ in RPMI-Medium) für 10 Minuten perfundiert. Die Adhäsion und das „Rolling“ der Zellen auf dem mit Proteinen oder Thrombozyten beschichteten Deckgläschen wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop vergrößert und mittels einer digitalen Videokamera und einem VCD-Brenner aufgezeichnet und später ausgewertet.

Als rollende Zellen wurden jene dendritischen Zellen definiert, die sich während der Perfusionszeit deutlich langsamer über die Oberfläche der Flusskammer bewegten. Die Zahl der rollenden Zellen wurde in einminütigen Intervallen zwei, fünf und acht Minuten nach dem Beginn der Perfusion ausgezählt.

Die feste Adhäsion von dendritischen Zellen wurde nach zehnmütiger Perfusion durch das Auszählen mehrerer Gesichtsfelder bestimmt. Als adhären wurden solche Zellen gewertet, die länger als 10 Sekunden anhafteten wie in der Literatur beschrieben [26]. Als Kontrolle dienten mit Kollagen Typ I ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) beschichtete Deckgläschen ohne Thrombozyten.

Über einen Perfusor wurde die Kammer gleichmäßig mit den im Medium gelösten Zellen perfundiert. Die Temperatur wurde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, der pH-Wert durch Tyrodes Puffer für die Thrombozyten und durch RPMI-Medium für die dendritischen Zellen bei 7,4 gehalten. Um Bedingungen ähnlich denen der arteriellen Endstrombahn zu erzeugen, wurde die Flussgeschwindigkeit so gewählt, dass die Scherrate bei allen Versuchen $2000/\text{s}$ betrug.

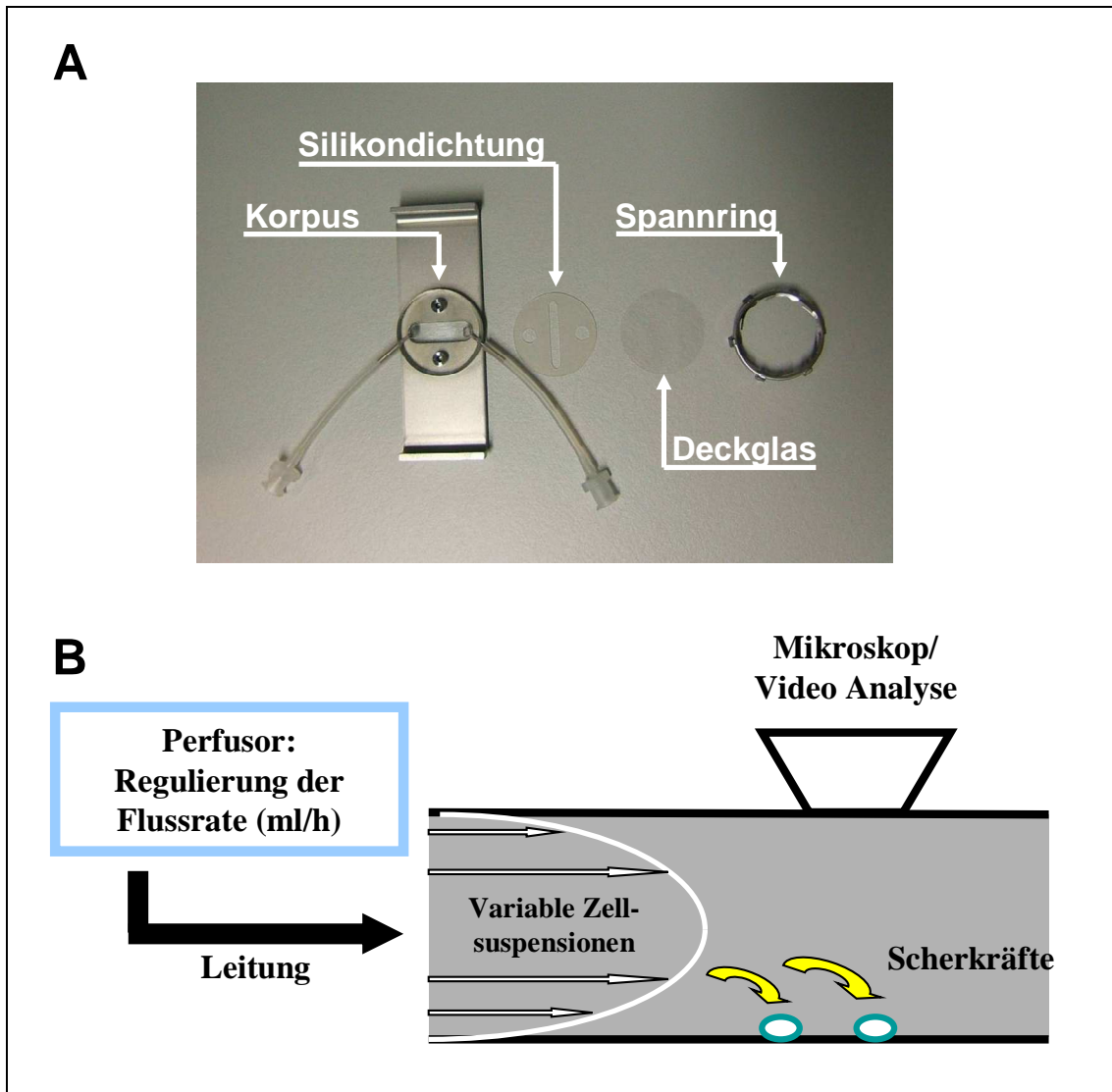


Abb. 1A: Aufbau Parallel-Platten-Flusskammer

B: Schema der Versuchsanordnung, Längsschnitt durch die Flusskammer. Die Flussgeschwindigkeit ist in der Mitte der Kammer am größten, die durch die Strömung entstehenden Scherkräfte wirken der Adhäsion entgegen.

Um zu untersuchen, ob die Adhäsion durch blockierende monoklonale Antikörper hemmbar ist, wurden dendritische Zellen 30 Minuten vor Beginn der Perfusion mit anti-CD162 (anti-PSGL-1, 5 µg/ml), anti-CD18 (5 µg/ml), anti-CD49d (5 µg/ml), anti-CD11a (5 µg/ml), anti-CD11b (5 µg/ml), anti-CD11c (5 µg/ml), anti-CD11d (5 µg/ml), anti-CD42 (5 µg/ml) oder mit einem irrelevanten Antikörper (2D1, 5 µg/ml) inkubiert.

2.8. Analyse von potentiellen Adhäsionsrezeptoren auf dendritischen Zellen (Durchflusszytometrie)

Die Expression von Adhäsionsrezeptoren auf der Oberfläche von unreifen und reifen dendritischen Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.4). In jeweils vier unabhängigen Versuchen wurde die Expression von CD29, CD49b, CD49d, CD49e, CD49f, CD11b, CD18, CD41, CD51, CD61, CD62P und CD162 gemessen. Als Kontrollen dienten unspezifisch bindende Antikörper des gleichen Isotyps.

2.9. Evaluation der Differenzierung von dendritischen Zellen durch Thrombozyten (Durchflusszytometrie)

Um Veränderungen des Reifungszustands von dendritischen Zellen zu beobachten, wurde die Expression verschiedener Reifemarker auf dendritischen Zellen nach Stimulation durch Thrombozyten gemessen. Dazu wurde die Expression von CD14 sowie CD83 und CD86 durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.4).

Über einen Zeitraum von drei Tagen wurde zusätzlich die Expression von CD1a und CD83 auf dendritischen Zellen, ebenfalls nach Stimulation durch Thrombozyten, gemessen.

2.10. „Mixed-Lymphocyte-Reaction“ (MLR-Assay)

Um die Funktion von dendritischen Zellen unter dem Einfluss von Thrombozyten zu untersuchen, wurde die gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) verwendet. Dabei wurde untersucht, ob und in welchem Maße Thrombozyten die Fähigkeit von dendritischen Zellen beeinflussen, allogene T-Zellen zu klonaler Proliferation anzuregen [27].

Dendritische Zellen präsentieren Proteinfragmente über MHC-Moleküle an T-Zellen. Wenn dabei Fremdproteine präsentiert und kostimulierende Moleküle exprimiert werden, werden die T-Zellen zur Proliferation angeregt. Die Stärke der Proliferation kann gemessen werden, indem in den letzten 18 Stunden der Kultivierung Tritium-markiertes Thymidin (^3H -Thymidin) hinzugegeben wird,

welches in Abhängigkeit von der Teilungsrate in die DNA der T-Zellen eingebaut wird. Die Stärke der β -Strahlung als Maß für die Proliferationsaktivität kann daraufhin am β -Counter bestimmt werden.

Dendritische Zellen ($2,5 \times 10^5$ /ml Medium) wurden mit Thrombozyten (2×10^8 /ml) im Verhältnis 1:800 für sieben Tage in 48-Well-Platten bei 37 °C koinkubiert. Dendritische Zellen ohne Thrombozyten unter gleichen Kulturbedingungen dienten als Negativkontrolle. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit RPMI-Medium durch vorsichtiges Spülen abgelöst und gewaschen. Um eine Vermehrung der dendritischen Zellen zu inhibieren, wurden sie mit einer Dosis von 30 Gray bestrahlt. Dann wurden die dendritischen Zellen in verschiedenen Konzentrationen (1×10^2 , 1×10^3 und 1×10^4 /100 μ l in RPMI-Medium) in 96-Well-Platten mit PBMNCs (1×10^5 /100 μ l in RPMI-Medium) für fünf Tage bei 37 °C koinkubiert. ^3H -Thymidin wurde zugegeben und 18 Stunden nach Zugabe wurde mittels β -Counter der Einbau des Isotops in die DNA der PBMNCs gemessen und damit das Ausmaß der Proliferation unter dem Einfluss von thrombozytenstimulierten dendritischen Zellen bestimmt. Es wurden Vierfachbestimmungen durchgeführt. Als interne Kontrolle wurden PBMNCs ohne Stimulation mitgeführt.

Um die Bedeutung von CD40L und CD18 für die lymphoproliferativen Fähigkeiten von dendritischen Zellen zu untersuchen, wurden vier Kokulterversuche in Gegenwart von blockierenden mAk gegen CD40L (5 μ g/ml) und CD18 (5 μ g/ml) durchgeführt.

2.11. Koinkubation und Phagozytose

Um das Verhalten von dendritischen Zellen in Koinkubation mit Thrombozyten zu beobachten, wurden unreife dendritische Zellen ($2,5 \times 10^5$ /ml) und frisch isolierte Thrombozyten (2×10^8 /ml) im Verhältnis 1:800 zusammen für zwölf Tage in RPMI-Medium in Kultur gehalten. Am ersten, siebten und zwölften Tag wurden phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

Um die Phagozytose von Thrombozyten durch dendritische Zellen nachzuweisen, wurden Thrombozyten mit Celltracker-orange-CMTMR markiert. Celltracker-orange-CMTMR ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der nach Passieren der Zellmembran in einer nichtenzymatischen Reaktion in eine impermeable Form umgewandelt wird und sich daher intrazellulär anreichert. Das Absorptionsmaximum liegt bei 541 nm, das Emissionsmaximum bei 565 nm.

Dendritische Zellen und Thrombozyten wurden sieben Tage in Chamber-slides inkubiert, und es wurden daraufhin fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mittels Phasenkontrastmikroskopie und Konfokaler-Laser-Scanning-Mikroskopie angefertigt.

2.12. Transmissionselektronenmikroskopie

Um eine direkte Interaktion zwischen dendritischen Zellen und Thrombozyten sichtbar zu machen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

Dendritische Zellen ($3,3 \times 10^5/\text{ml}$) und Thrombozyten ($2 \times 10^8/\text{ml}$) wurden für zwei Stunden in RPMI-Medium inkubiert. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Spülen mit PBS abgelöst und in 2 %igem Glutaraldehyd über 60 Minuten fixiert. Nach 30 Minuten wurde das Glutaraldehyd erneuert. Das Präparat wurde 24 Stunden bei 4 °C in Karnovskys-Lösung fixiert und dann mit Cacodylat-Puffer gewaschen. Mit Osmiumtetroxid wurden die Zellen postfixiert und für 30 bis 45 Minuten mit Uranylacetat inkubiert. Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe wurde das Präparat entwässert und anschließend in Epon eingebettet. Von den so fixierten und kontrastierten Zellen wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

2.13. Propidiumjodid-Kernfärbung nach Nicoletti

Um apoptotische Zellen nachzuweisen wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewandt. Mit Hilfe der Propidiumjodid-Kernfärbung nach Nicoletti et al. [28] können Kernfragmentierungen nachgewiesen werden, die ein starker Hinweis für apoptotische Vorgänge sind. Dabei können durchflusszytometrisch mittels Propidiumjodidfärbung kleinere und DNA-ärmere Nuklei als Hinweis auf Apoptose nachgewiesen werden.

Sich nicht teilende Zellen enthalten stets den gleichen doppelten Chromosomensatz und damit einen DNA-Gehalt von 2N. Alle Kerne, die nun weniger DNA enthalten, können als fragmentiert betrachtet werden und sind somit ein Zeichen für Apoptose.

Propidiumjodid bindet interkalierend an DNA und kann zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Stärke der Fluoreszenz korreliert mit dem Gehalt an DNA im Zellkern. Daher ist bei apoptotischen Zellkernfragmenten eine geringere Fluoreszenzintensität messbar [28].

Dendritische Zellen ($2,5 \times 10^5/\text{ml}$) und frisch isolierte Thrombozyten ($2 \times 10^8/\text{ml}$) wurden im Verhältnis 1:800 für neun Tage in 96-Well-Platten koinkubiert. Als Kontrollen dienten dendritische Zellen sowie Thrombozyten in RPMI-Medium. Als Positivkontrolle wurden dendritische Zellen 24 Stunden vor Beginn der Messung mit Mitomycin C ($25 \mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt, um Apoptose zu induzieren.

Nach neun Tagen wurden die Zellen durch vorsichtiges Spülen mit PBS-EDTA abgelöst, in V-Bodenplatten überführt und bei 1400 U/min und Raumtemperatur abzentrifugiert. Es wurde $75 \mu\text{l}$ Propidiumjodid in hypotonem Lysepuffer (1 % Natriumcitrat, 0,1 % Triton X-100 und $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ Propidiumjodid) hinzugegeben. Die Zellen wurden in der Propidiumjodidlösung resuspendiert und zehn Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Durchflusszytometrisch wurden die Kerngröße und Granularität und der Gehalt an mit Propidiumjodid gefärbter DNA bestimmt.

Um den Anteil apoptotischer Zellen im Zeitverlauf zu bestimmen wurden Propidiumjodidfärbungen wie oben beschrieben an Tag 1, 3, 5, 7, 9 und 11 durchgeführt.

Da Thrombozyten und apoptotische Kerne sich in Größe und Granularität sehr ähnlich sind, kam es in der Analyse der Durchflusszytometrie zu einer Überlagerung beider Zellwolken. Es wurde daher versucht, die Wolke der apoptotischen Kerne sehr zurückhaltend einzugrenzen und so die Zahl der apoptotischen Kerne eher zu über- als zu unterschätzen.

2.14. „Terminal-uridine-nick-end-labeling”(TUNEL)-Assay

Eine weitere Möglichkeit, apoptotische Zellen zu erkennen, ist der Nachweis von Strangbrüchen der DNA, die durch die Aktivität von Endonukleasen während des Apoptoseprozesses verursacht werden. Die dabei entstehenden freien 3'-OH DNA-Enden können bei diesem Nachweis mit Hilfe eines Enzyms (Terminale Desoxynucleotidyl Transferase, TdT) farbstoffmarkiert werden und sind in der Durchflusszytometrie nachweisbar [29, 30]. Als Testkit wurde das „MEBSTAIN apoptosis kit direct“ verwendet.

Dendritische Zellen ($2,5 \times 10^5/\text{ml}$) und Thrombozyten ($2 \times 10^8/\text{ml}$) wurden im Verhältnis 1:800 für neun Tage in 24-Well-Platten koinkubiert. Als Positivkontrolle wurden dendritische Zellen 24 Stunden vor Versuchsbeginn mit Mitomycin C (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt; als Negativkontrollen dienten dendritische Zellen sowie Thrombozyten in RPMI-Medium. Die Zellen wurden nach neun Tagen in Falcongefäße überführt und zweimalig mit PBS/0,2%BSA gewaschen. Durch Zugabe von 200 μl Paraformaldehyd 4 % (in 0,1 M NaH_2PO_4 , pH 7,4) und Inkubation für 30 Minuten bei 4 °C wurden die Zellen fixiert. Die Zellen wurden drei Minuten bei 700 g abzentrifugiert und zweimalig mit PBS/0,2%BSA gewaschen. Um die Zellmembran zu permeabilisieren wurden 200 μl 70 %iges Ethanol hinzugegeben und der Ansatz 30 Minuten bei -20 °C inkubiert. Die Proben wurden einmal mit PBS/0,2%BSA gewaschen und 30 μl der TdT-Lösung (27 μl TdT Puffer, 1,5 μl FITC-dUTP, 1,5 μl TdT) hinzugegeben. Als interne Kontrolle diente TdT-Lösung ohne TdT. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert, einmal mit PBS/0,2%BSA gewaschen und in 200 μl PBS/0,2%BSA resuspendiert. Die Messung erfolgte innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer.

2.15. Statistische Analyse

Die gewonnenen Daten wurden mittels Student t-Test oder Varianzanalyse auf ihre statistische Aussagekraft hin untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung, $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der isolierten dendritischen Zellen

Die verwendeten dendritischen Zellen wurden aus Monozyten durch Zugabe von Zytokinen gewonnen (siehe Kapitel 2.3). Um die Eigenschaften der gewonnenen Zellen zu charakterisieren, wurde die Expression von acht Oberflächenfaktoren bestimmt, die für die Funktion von dendritischen Zellen bedeutsam sind (Abb. 2).

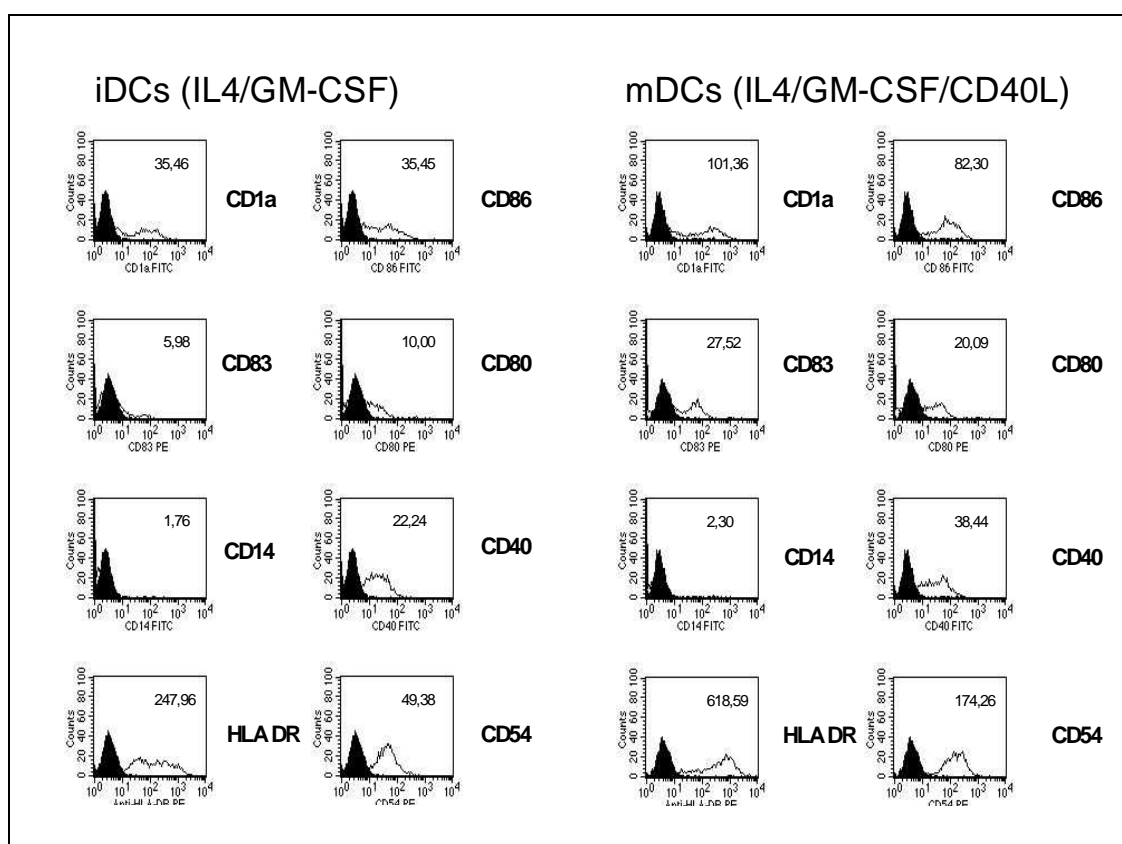


Abb. 2: Expression von Oberflächenmarkern auf unreifen (iDCs) und reifen (mDCs) dendritischen Zellen, nachdem diese über sieben Tage aus Monozyten differenziert worden waren. Es wurde die Expression von antigenpräsentierenden Molekülen (CD1a, HLA-DR), kostimulierenden Molekülen (CD40, CD80, CD83, CD86), des Adhäsionsmoleküls CD54 und des Monozytenmarkers CD14 bestimmt. Histogramme der FACS-Analyse, die horizontale Achse gibt die Stärke der Fluoreszenzintensität an, schwarz unterlegt sind die jeweiligen Isotypenkontrollen.

Sowohl unreife wie reife dendritische Zellen exprimierten die antigen-präsentierenden Moleküle CD1a und HLA-DR, die kostimulierenden Moleküle CD40 und CD86 sowie das Adhäsionsmolekül CD54. Reife dendritische Zellen exprimierten diese in deutlich stärkerem Maße. Reife dendritische Zellen zeigten darüber hinaus auch eine Expression der Reifemarker CD80 und CD83. Auf reifen wie auch auf unreifen dendritischen Zellen war der Monozytenmarker CD14 nicht nachweisbar, sodass eine Rückdifferenzierung zu Monozyten ausgeschlossen werden konnte (Abb. 2).

3.2. Thrombozyten vermitteln die Adhäsion von dendritischen Zellen an Kollagen

Um die Bindung von dendritischen Zellen an Thrombozyten zu untersuchen, wurden statische Adhäsionsversuche durchgeführt. Aus Monozyten durch Stimulation mit GM-CSF/IL-4 oder GM-CSF/IL-4/CD40L gewonnene dendritische Zellen wurden zur Adhäsion in mit Thrombozyten, Kollagen Typ I oder Fibronectin beschichtete 96-Well-Platten gegeben. Nach zwei Waschschritten wurden die adhärennten Zellen gezählt um das Maß der Adhäsion zu quantifizieren.

Es zeigte sich, dass dendritische Zellen unter statischen Bedingungen in deutlich stärkerem Maße an immobilisierte Thrombozyten als an Kollagen Typ I binden ($n=6$, $p<0,05$; Abb. 3A & B).

Das Adhäsionsverhalten der dendritischen Zellen zeigte sich abhängig von ihrem Reifungszustand. Reife dendritische Zellen, die durch GM-CSF/IL-4/CD40L stimuliert worden waren, wiesen eine deutlich stärkere Adhäsion an Thrombozyten auf, als unreife, durch GM-CSF/IL-4 stimulierte Zellen ($n=6$, $p<0,05$; Abb. 3A & B). Dendritische Zellen binden auch an mit Fibronectin beschichtete Mikrotiterplatten (Abb. 3A & B).

Mittels Elektronenmikroskopie wurde der Adhäsionsprozess sichtbar gemacht. Es zeigte sich, dass Thrombozyten über pseudopodienartige Fortsätze an dendritische Zellen binden, was auf das Vorhandensein eines spezifischen Adhäsionsrezeptors hindeutet (Abb. 3C).

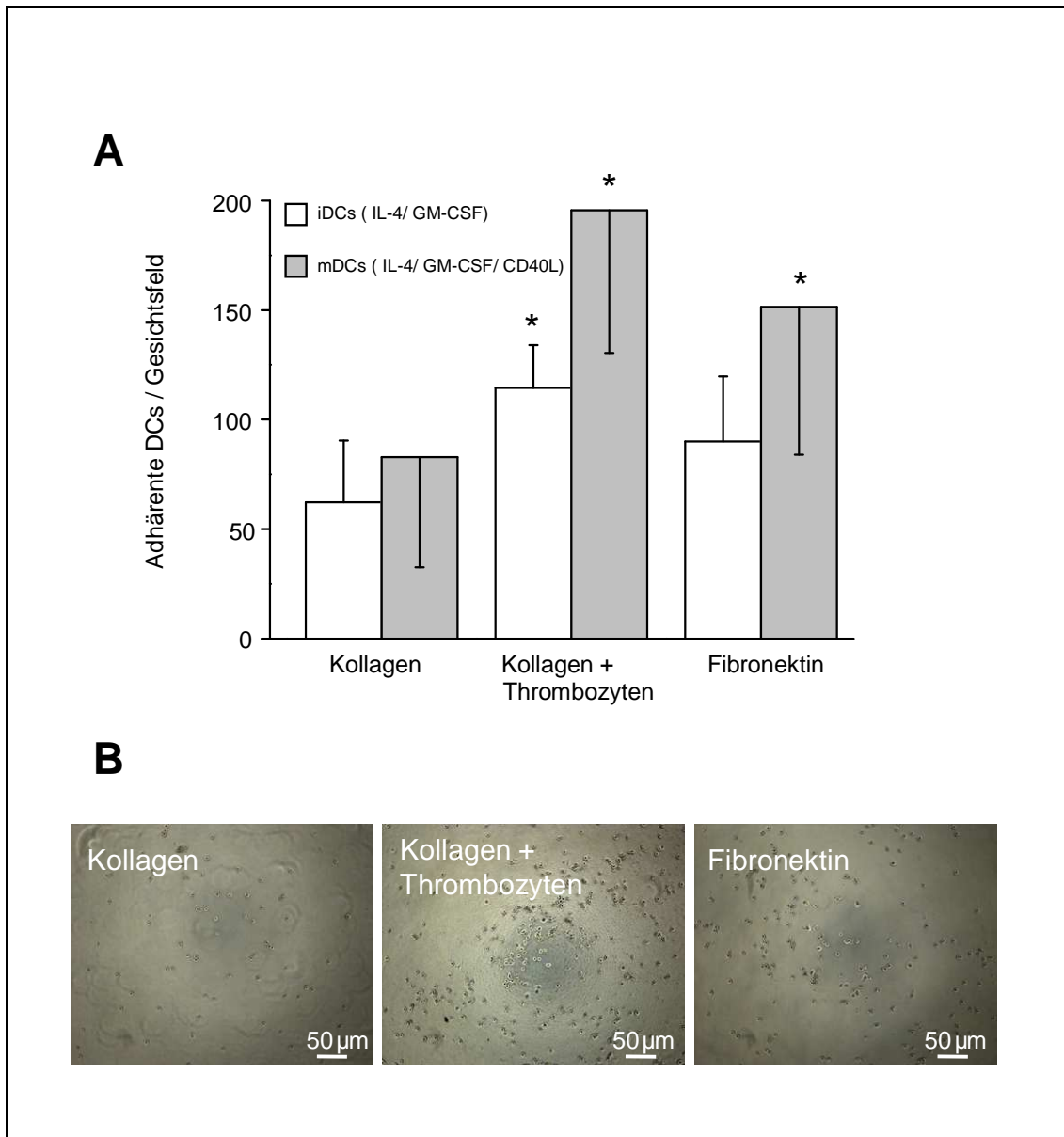


Abb. 3A: Statische Adhäsion von unreifen (iDCs) und reifen (mDCs) dendritischen Zellen an Kollagen, Thrombozyten + Kollagen oder Fibronektin; Mittelwerte der Anzahl der adhärenen Zellen pro Gesichtsfeld ($n=6$, * $p<0,05$).

3B: Statische Adhäsion von dendritischen Zellen auf mit Kollagen, Thrombozyten + Kollagen oder Fibronektin beschichteten Mikrotiterplatten. Phasenkontrastmikroskopie, repräsentative Bildausschnitte.

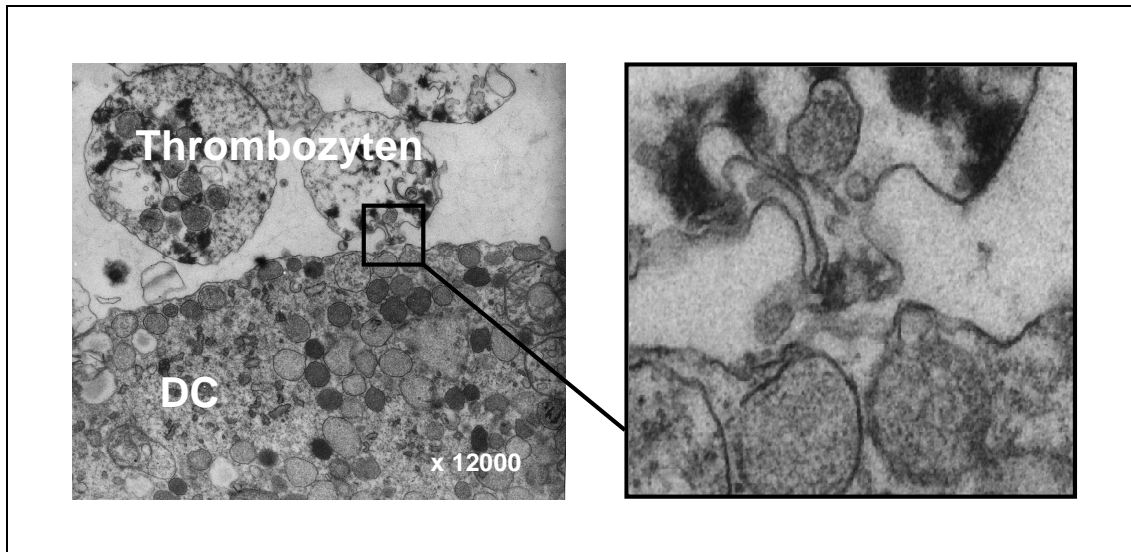


Abb. 3C: Einzelner Thrombozyt bindet über ein Pseudopodium an eine dendritische Zelle (DC), Elektronenmikroskopie, Vergrößerung 12000-fach, rechtes Bild: Ausschnittsvergrößerung.

3.3. Expression von Adhäsionsrezeptoren

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression von Adhäsionsrezeptoren bestimmt, die potentiell an der Interaktion von dendritischen Zellen mit Thrombozyten beteiligt sind.

Es zeigte sich, dass beide Untereinheiten des β_2 -Integrins MAC-1 (CD18 (α_M) / CD11b (β_2)) auf dendritischen Zellen stark exprimiert werden (Abb. 4).

Außerdem werden CD29 (Untereinheit des β_1 -Integrins), CD49d (α_4 -Untereinheit) und CD162 (PSGL-1) in deutlichem Maße auf dendritischen Zellen exprimiert (Abb. 4).

Auf reifen dendritischen Zellen, die in Gegenwart von GM-CSF/ IL-4/ CD40L kultiviert wurden, wird die β_2 -Kette (CD11b) von MAC-1 auf der Zelloberfläche in stärkerem Maße exprimiert als auf unreifen dendritischen Zellen (Abb. 4).

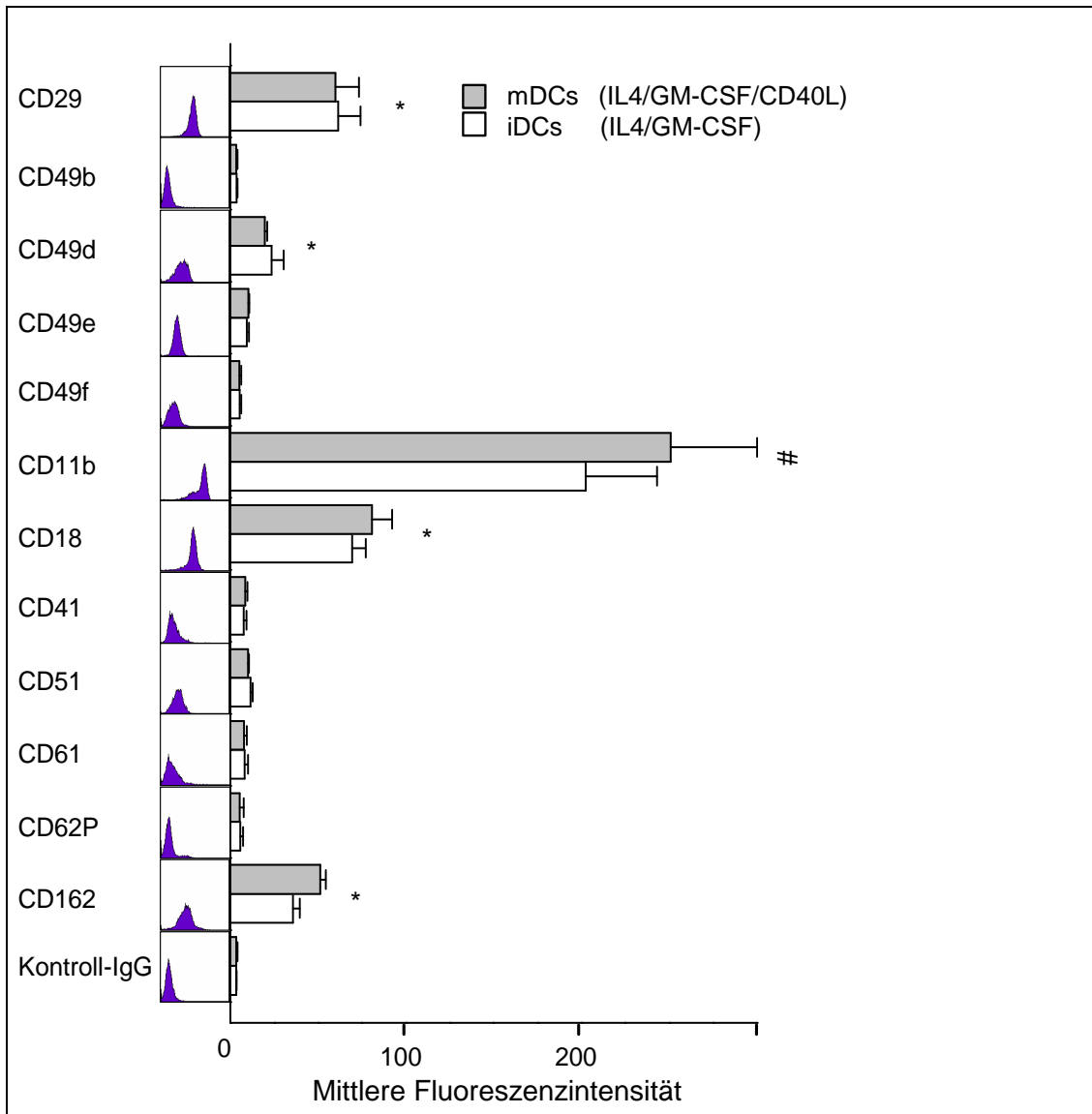


Abb. 4: Expression von Adhäsionsrezeptoren auf unreifen (iDCs) und reifen (mDCs) dendritischen Zellen; Durchflusszytometrie. Angegeben sind die Mittelwerte der Stärke der Immunfluoreszenz (n=4, # p<0,05, * p<0,05 gegen IgG-Kontrolle).

3.4. Adhäsionsverhalten unter arteriellen Flussbedingungen

Um das Adhäsionsverhalten von dendritischen Zellen unter Bedingungen zu untersuchen, die denen in arteriellen Gefäßen nahe kommen, wurden Versuche in einer planparallelen Flusskammer durchgeführt. Es wurden durch GM-CSF/IL-4/CD40L stimulierte dendritische Zellen bei einer Wandscherrate von

2000/s über auf Kollagen Typ I immobilisierte Thrombozyten perfundiert und videomikroskopisch die Zahl der rollenden und haftenden Zellen bestimmt.

Die Auswertung der Videoaufzeichnung ergab, dass das Rollen von dendritischen Zellen in deutlich größerem Maße auf Thrombozyten als auf Kollagen Typ I stattfand ($n=4$, $p<0,05$, Abb. 5). Durch Vorinkubation mit einem blockierenden monoklonalen Antikörper gegen PSGL-1, nicht aber durch einen Kontrollantikörper (2D1), wurde das Rollen auf immobilisierten Thrombozyten signifikant reduziert ($n=4$, $p<0,05$, Abb. 5).

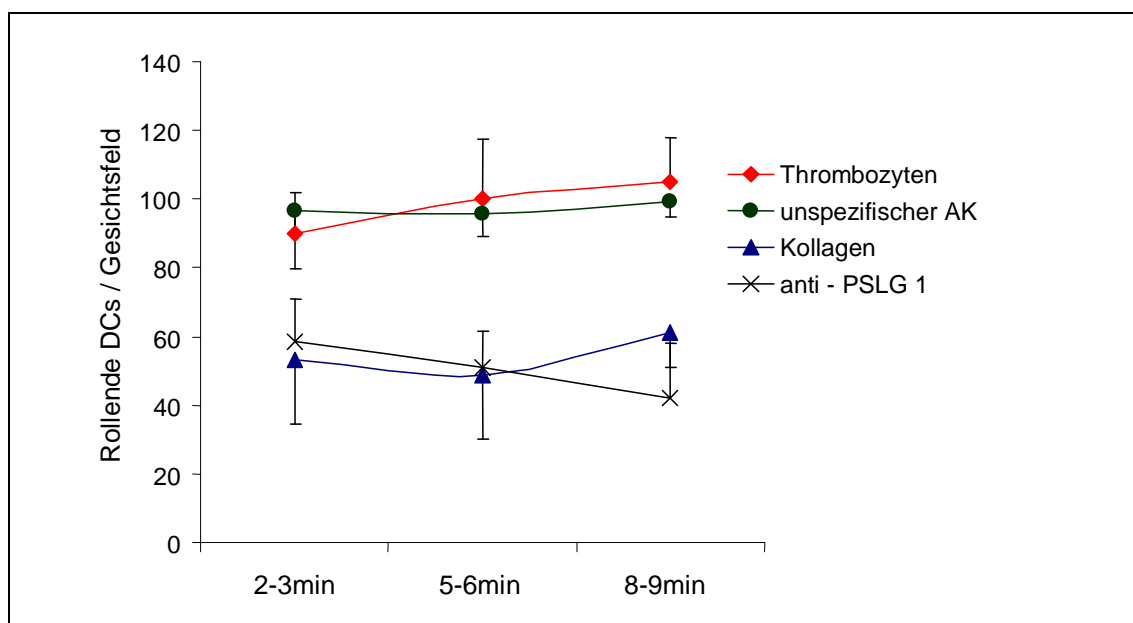


Abb. 5: Rollen von dendritischen Zellen auf Kollagen und Thrombozyten; Rollen auf Thrombozyten nach Inkubation mit blockierendem mAk gegen PSGL 1 und unspezifisch bindendem Antikörper ($n=4$).

Darüber hinaus zeigte sich, dass dendritische Zellen unter arteriellen Flussbedingungen stark an immobilisierten Thrombozyten haften, nahezu nicht jedoch an Kollagen Typ I. ($n=4$, $p<0,05$, Abb. 6A). Wurden dendritische Zellen mit einem blockierenden anti-CD18 mAk (5 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert, so war die feste Adhäsion auf Thrombozyten, verglichen mit einem unspezifischen Kontrollantikörper, signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu hatte ein blockierender mAk gegen CD49d kaum einen Effekt auf die Adhäsion von dendritischen Zellen an Thrombozyten ($n=4$, $p<0,05$, Abb. 6A & B).

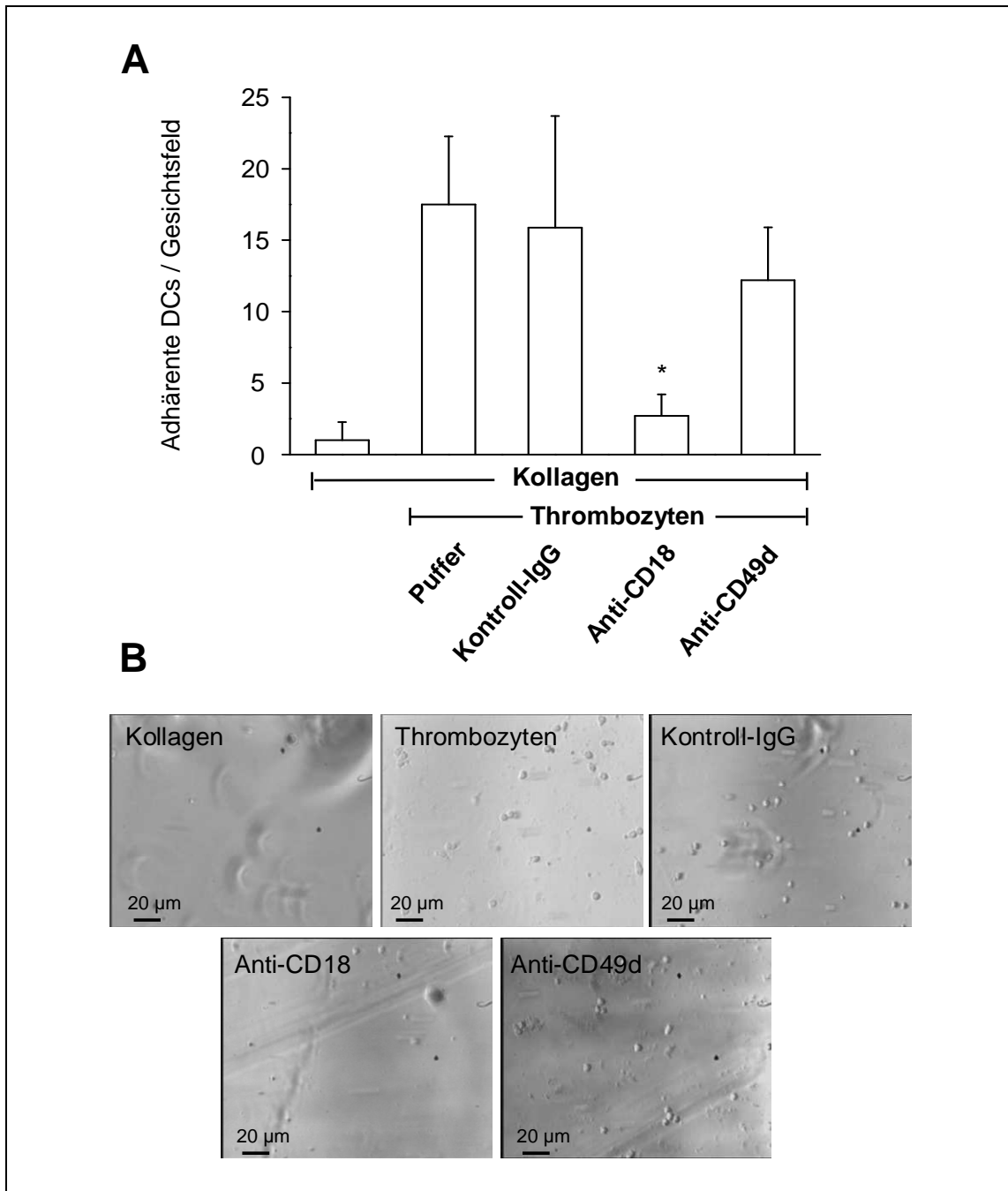


Abb. 6A: Adhäsion von dendritischen Zellen auf Kollagen Typ I und Thrombozyten bei arteriellen Scherraten. Zur Charakterisierung des Adhäsionsrezeptors wurden dendritische Zellen mit blockierenden mAk gegen CD18 und CD49d inkubiert ($n=4$, * $p<0,05$ gegen IgG-Kontrolle).

B: Standbilder der Videoaufzeichnung, repräsentative Bildausschnitte.

CD18 kann als β -Untereinheit zusammen mit α -Untereinheiten wie z.B. CD11a, CD11b oder CD11c verschiedene Heterodimere bilden. Nur im Zusammenspiel mit einer α -Untereinheit entsteht ein funktionsfähiges Integrin. In dynamischen Adhäsionsversuchen mit blockierenden mAk gegen CD11a, CD11b, CD11c, CD11d und gegen CD42 wurde die Bedeutung der zweiten Untereinheit des Rezeptors für die Adhäsion bestimmt. Dabei zeigte sich, dass nur blockierende mAk gegen CD11b die Adhäsion von dendritischen Zellen auf Thrombozyten signifikant hemmen können (Abb. 7). Daraus ergibt sich, dass eine feste Adhäsion von dendritischen Zellen auf Thrombozyten im Wesentlichen über das heterodimere Integrin CD11b/CD18 (= Mac-1/ Integrin $\alpha_M\beta_2$) entsteht.

Zusammengefasst zeigen diese Versuchsreihen, dass CD162 (PSGL-1) den initialen Kontakt zwischen dendritischen Zellen und Thrombozyten vermittelt. Darauf folgt eine feste Bindung, die von Seiten der dendritischen Zellen über CD11b/CD18 vermittelt wird.

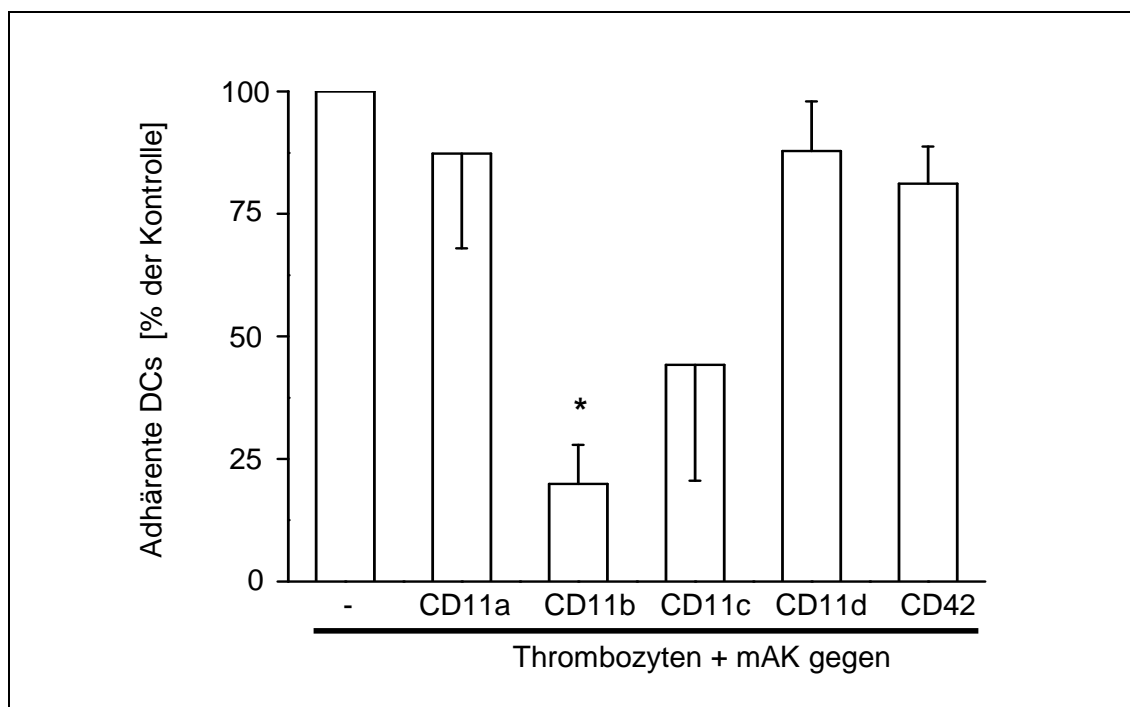


Abb. 7: Adhäsion von dendritischen Zellen auf immobilisierten Thrombozyten in Gegenwart von blockierenden mAk gegen CD11a, CD11b, CD11c, CD11d und CD42. Als Kontrolle dienten dendritische Zellen auf Thrombozyten in Gegenwart eines unspezifischen Antikörpers. Die angegebene Werte beziehen sich auf die Kontrolle (n=4, * p<0,05).

3.5. Einfluss von Thrombozyten auf die Differenzierung von dendritischen Zellen

Dendritische Zellen und Thrombozyten wurden für bis zu drei Tage gemeinsam kultiviert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Expression der Reifemarker CD1a, CD83 und des Monozytenmarkers CD14 gemessen. Abbildung 8A zeigt die Expression dieser Oberflächenmarker nach 24 Stunden.

Die Co-Expression von CD1a/CD83 auf dendritischen Zellen war nach 24 Stunden in Gegenwart von Thrombozyten um das 2,5-fache gegenüber unstimulierten Zellen erhöht (Abb. 8B). Nach zwei bis drei Tagen zeigte die Expression von CD1a/CD83 ein Maximum. Sowohl durch Thrombozyten stimulierte wie auch unstimulierte dendritische Zellen wiesen nahezu keine Expression von CD14 auf. Somit ergaben sich keine Hinweise auf eine Rückdifferenzierung der dendritischen Zellen zu Monozyten (Abb. 8A).

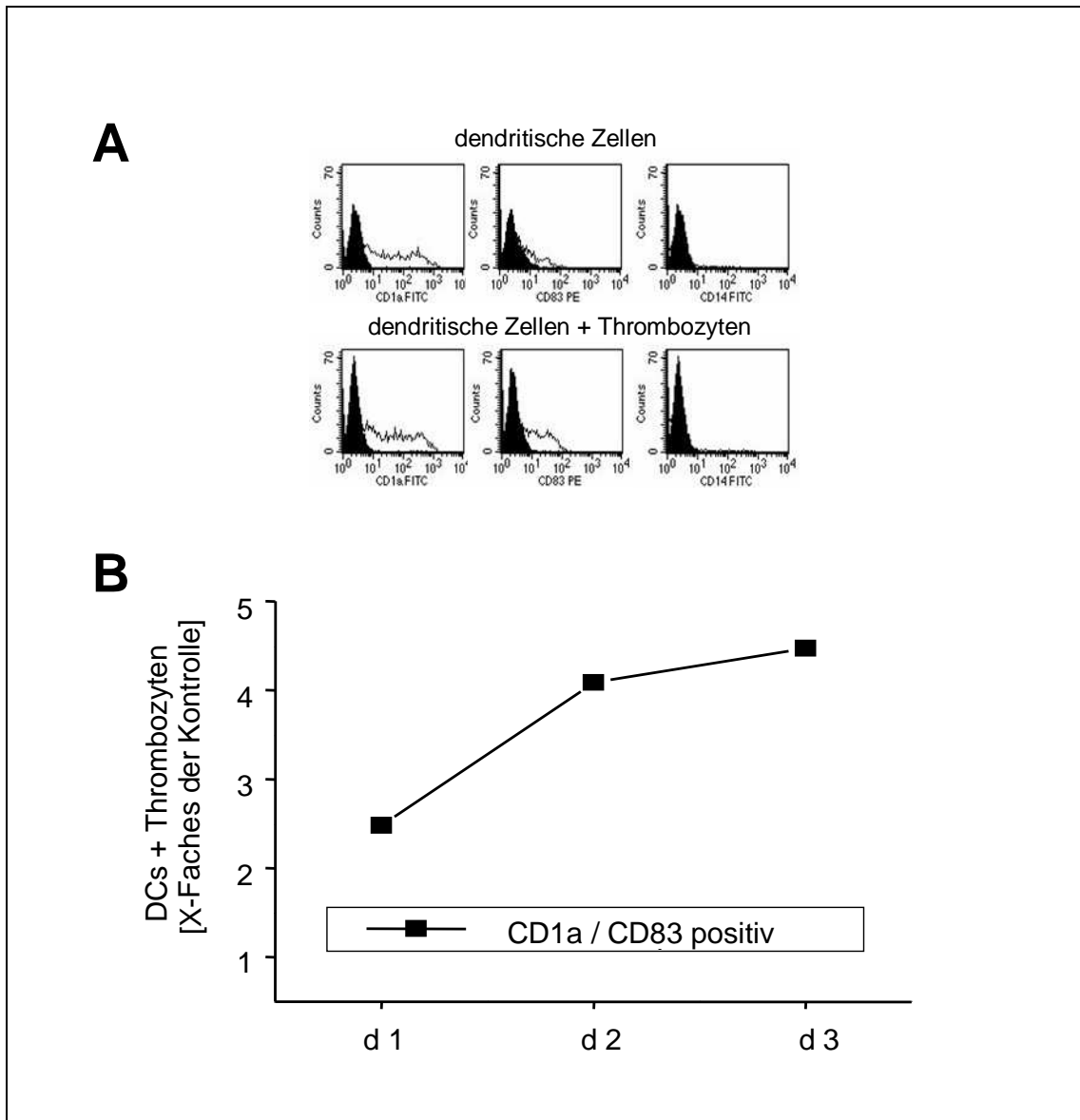


Abb. 8A: Histogramme der Expression von CD1a, CD83 und CD14 auf dendritischen Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Thrombozyten. Als Kontrolle diente die Expression auf unstimulierten dendritischen Zellen. Schwarz unterlegt sind die jeweiligen Isotypenkontrollen.

B: Kinetik der Expression von CD1a/CD83 auf dendritischen Zellen nach Stimulation durch Thrombozyten im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle (n=1).

3.6. Aktivierung von dendritischen Zellen durch Thrombozyten

In einer gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) wurde untersucht, in welchem Maße dendritische Zellen eine allogene T-Zell-Antwort induzieren, nachdem sie durch Thrombozyten stimuliert worden waren. Zunächst zeigte sich, dass reife dendritische Zellen (GM-CSF/IL-4/CD40L) eine größere T-Zell-Stimulationskapazität haben als unreife (IL-4/GM-CSF) (Abb. 9A).

Bei beiden Zelltypen konnten durch Inkubation mit Thrombozyten die lymphoproliferativen Fähigkeiten von dendritischen Zellen signifikant erhöht werden. Unreife, mit Thrombozyten inkubierte dendritische Zellen zeigten dabei eine ähnlich starke proliferationsfördernde Wirkung auf PBMNCs wie reife, zusätzlich durch CD40L stimulierte dendritische Zellen (Abb. 9A).

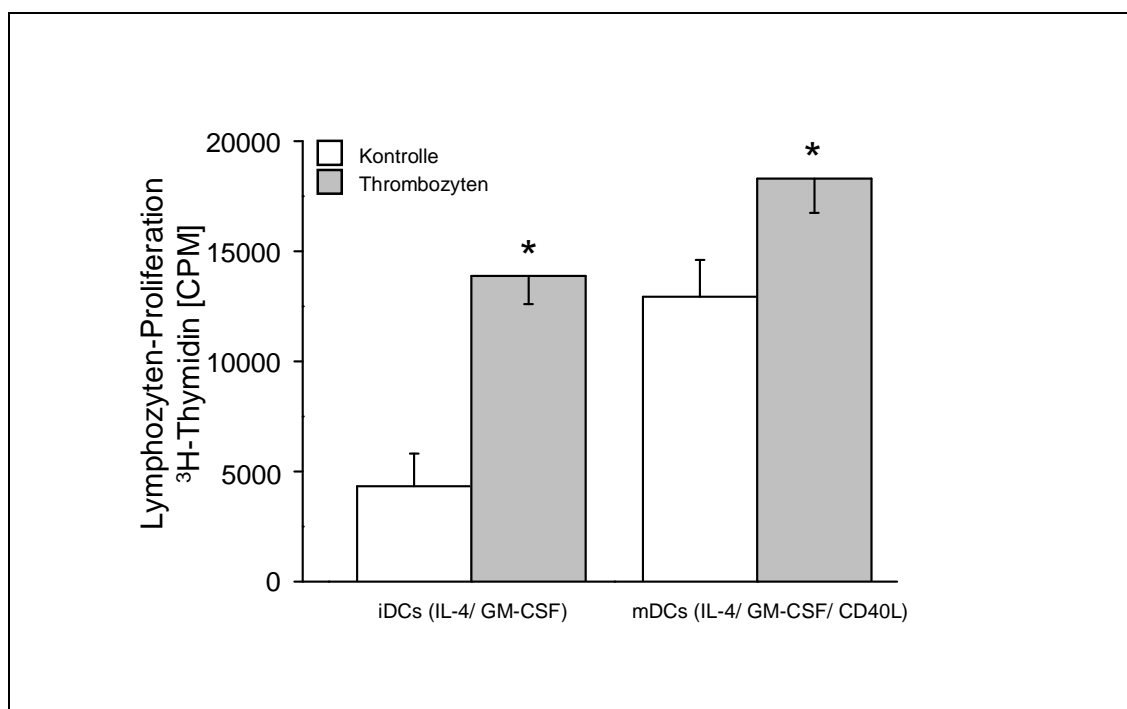


Abb. 9A: Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) mit unreifen (iDCs) und reifen (mDCs) dendritischen Zellen. Es wurde die Proliferation von PBMNCs in Gegenwart von thrombozytenstimulierten dendritischen Zellen bestimmt. Als Kontrolle dienten unstimulierte dendritische Zellen. Dargestellt ist die Stärke der Proliferation der PBMNC-Population gemessen am ^3H -Thymidin-Einbau ($n=3$, * $p<0,05$ im Vergleich zur Kontrolle).

In weiteren Versuchen wurde die Auswirkung von Thrombozyten auf die Lymphozytenstimulationsfähigkeit von dendritischen Zellen in Gegenwart von blockierenden mAk untersucht. Dazu wurden dendritische Zellen und Thrombozyten gemeinsam in Gegenwart von blockierenden mAk inkubiert und daraufhin eine gemischte Lymphozytenreaktion durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass anti-CD40L, nicht aber anti-CD18 die Stimulation von dendritischen Zellen durch Thrombozyten hemmt, was zu einer gegenüber der Kontrolle signifikant reduzierten lymphoproliferativen Wirkung von dendritischen Zellen führte (Abb. 9B).

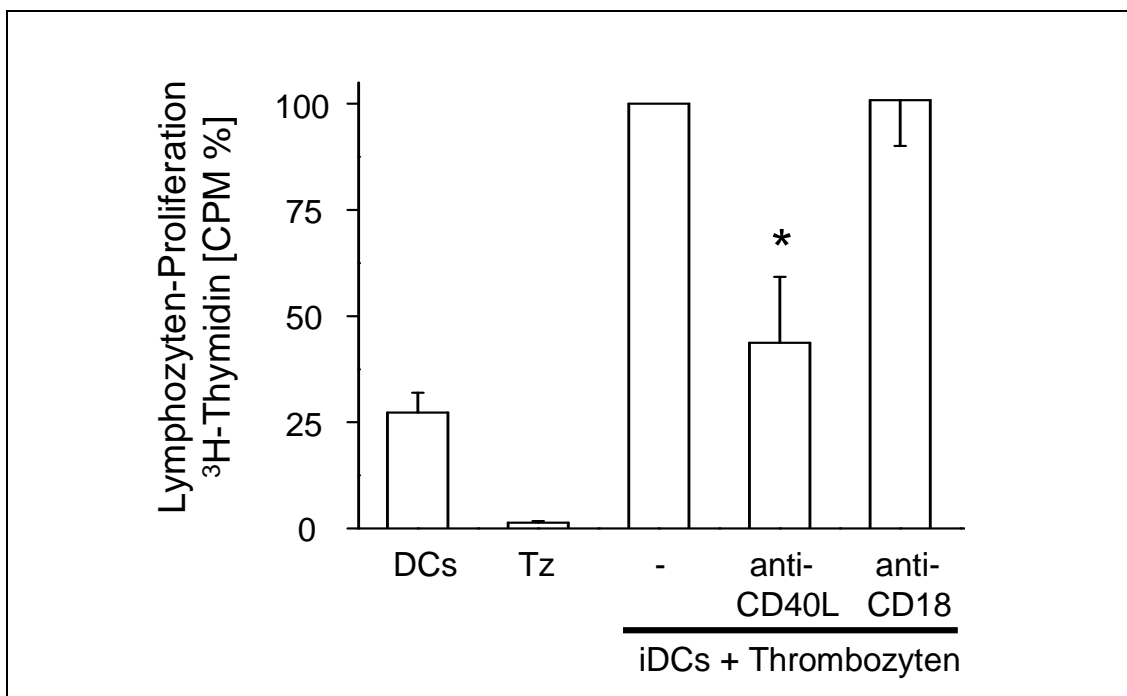


Abb. 9B: Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) von unreifen dendritischen Zellen (iDCs) nach Stimulation durch Thrombozyten in Gegenwart von blockierenden mAk gegen CD40L und CD18. Als Positivkontrolle sind durch Thrombozyten stimulierte dendritische Zellen ohne Inkubation mit blockierendem mAk abgebildet. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte dendritische Zellen (DCs) sowie Thrombozyten (Tz). Angegeben sind die Mittelwerte der 4 Versuche in Prozent der Positivkontrolle (n=4, * p<0,05 im Vergleich zur Positivkontrolle).

3.7. Phagozytose von Thrombozyten durch dendritische Zellen

Um die Interaktion von dendritischen Zellen und Thrombozyten morphologisch über einen längeren Zeitraum zu untersuchen, wurden beide Zellarten zusammen über zwölf Tage in 96-Well-Platten koinkubiert.

Dabei zeigte sich, dass nach fünf Tagen zunehmend weniger Thrombozyten in der Kultur sichtbar waren. Nach ungefähr zwei Wochen Koinkubation konnten mikroskopisch nahezu keine Thrombozyten mehr nachgewiesen werden (Abb. 10A), wohingegen eine Kontrolle aus Thrombozyten sich unverändert zeigte und morphologisch keine Hinweise auf autolytische Prozesse offenbarte (nicht abgebildet).

Innerhalb vieler, aber nicht aller dendritischer Zellen, zeigten sich braune intrazytoplasmatische Granula, die möglicherweise aus phagozytierten Thrombozyten bestanden (Abb. 10A).

Der beobachtete Phagozytoseprozess zeigte sich ebenfalls, wenn dendritische Zellen mit autologen Thrombozyten inkubiert wurden (nicht abgebildet).

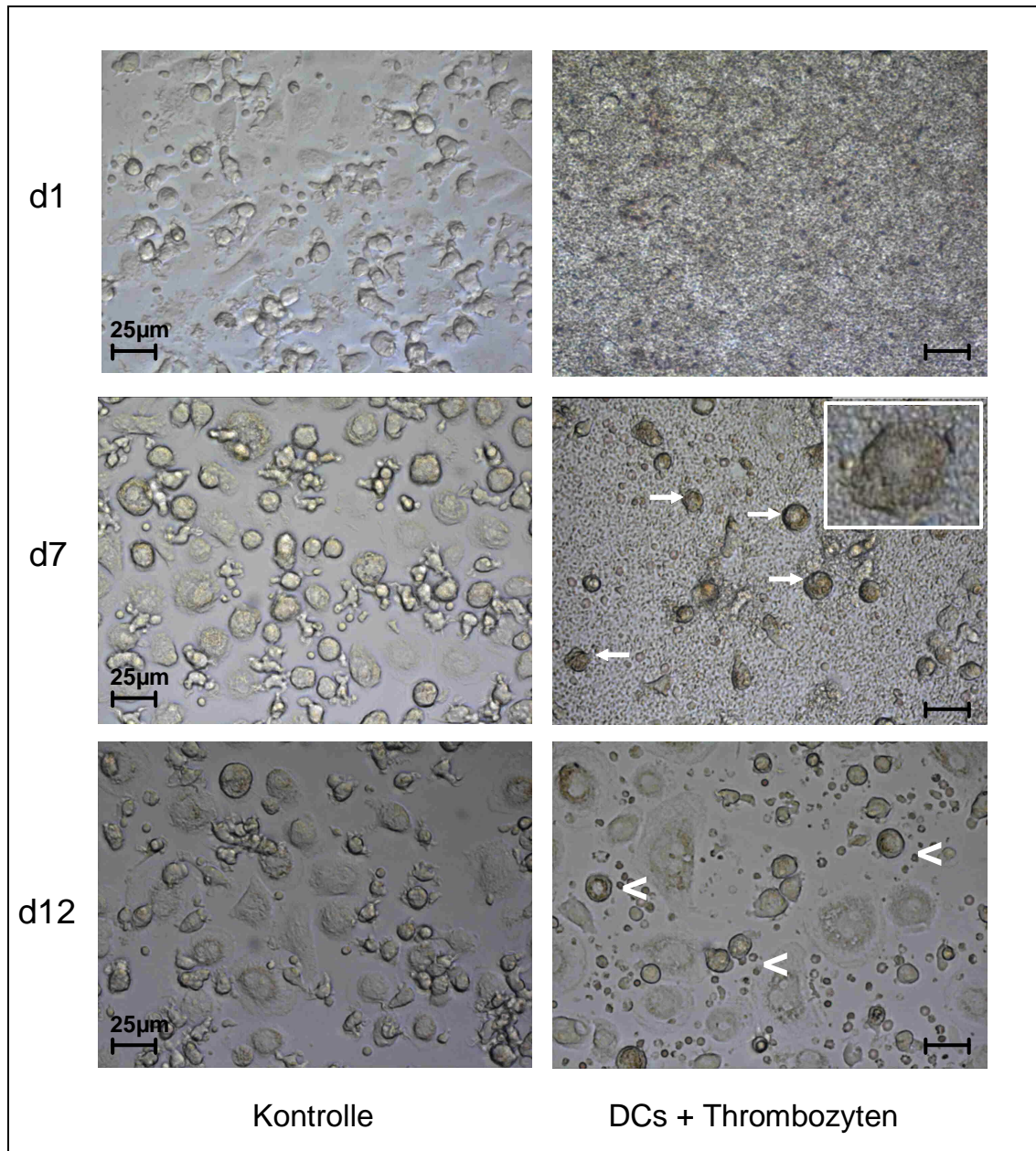


Abb. 10 A: Verlauf der Koinkubation von dendritischen Zellen (DCs) und Thrombozyten über zwölf Tage, Phasenkontrastmikroskopie, Vergrößerung 40-fach. Weiße Pfeile: Dendritische Zellen, die Thrombozyten phagozytiert haben und intrazellulär dunkle Granula aufweisen. An Tag 1 sind durch die dichte Thrombozytenschicht kaum Details in der Kultur zu erkennen (rechtes oberes Bild). Durch Abnahme der Thrombozytenzahl sind im Verlauf die dendritischen Zellen zunehmend besser sichtbar. Kontrolle: dendritische Zellen, keine morphologischen Veränderungen.

Um die Phagozytose von Thrombozyten genauer zu untersuchen und zu bestimmen, ob die intrazellulären Granula Reste von phagozytierten Thrombozyten enthalten, wurden Thrombozyten mit Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dazu wurden frisch isolierte Thrombozyten mit Fluorochrome Celltracker-orange-CMTMR, einem sich intrazellulär anreichernden Farbstoff, gefärbt und zu dendritischen Zellen in Kultur gegeben.

Innerhalb von sieben Tagen waren nahezu alle Thrombozyten von dendritischen Zellen aufgenommen worden. Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie waren im Inneren der dendritischen Zellen Granula nachzuweisen, die den Fluoreszenzfarbstoff der gefärbten Thrombozyten enthielten (Abb. 10B).

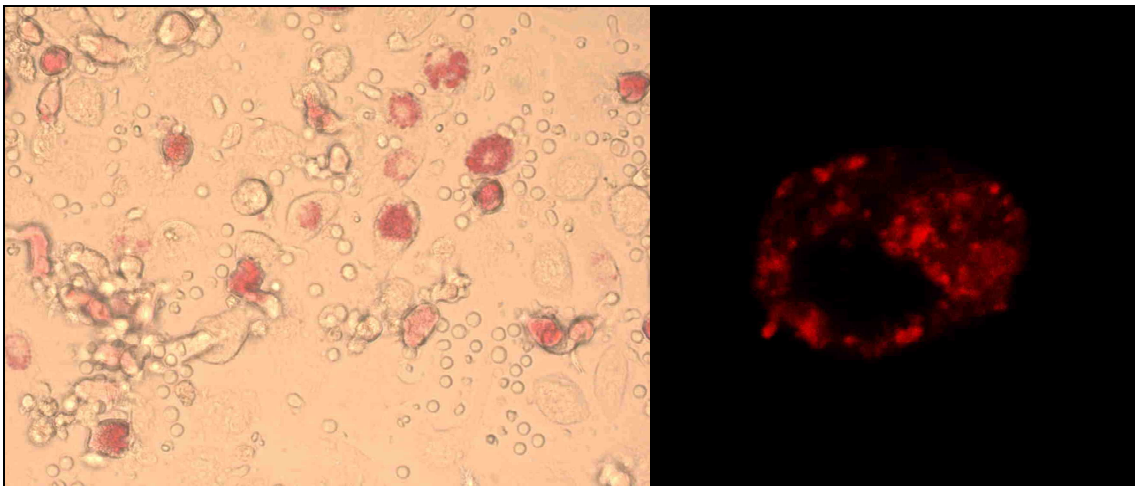


Abb. 10B: Dendritische Zellen nach siebentägiger gemeinsamer Kultur mit fluoreszenzmarkierten Thrombozyten.

Linkes Bild: Zahlreiche dendritische Zellen weisen nach Inkubation mit markierten Thrombozyten rot fluoreszierende intrazelluläre Granula auf. Phasenkontrastmikroskopie, Vergrößerung 400-fach.

Rechtes Bild: Einzelne dendritische Zelle, die mit Fluoreszenzfarbstoff gefärbte Granula enthält. Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie.

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie konnten Adhäsion und Phagozytose stärker vergrößert dargestellt werden. Dazu wurden dendritische Zellen und Thrombozyten für zwei Stunden koinkubiert und danach fixiert.

Abbildung 11A zeigt eine dendritische Zelle mit den typischen Membranausstülpungen, die der Antigenaufnahme und dem T-Zellkontakt dienen.

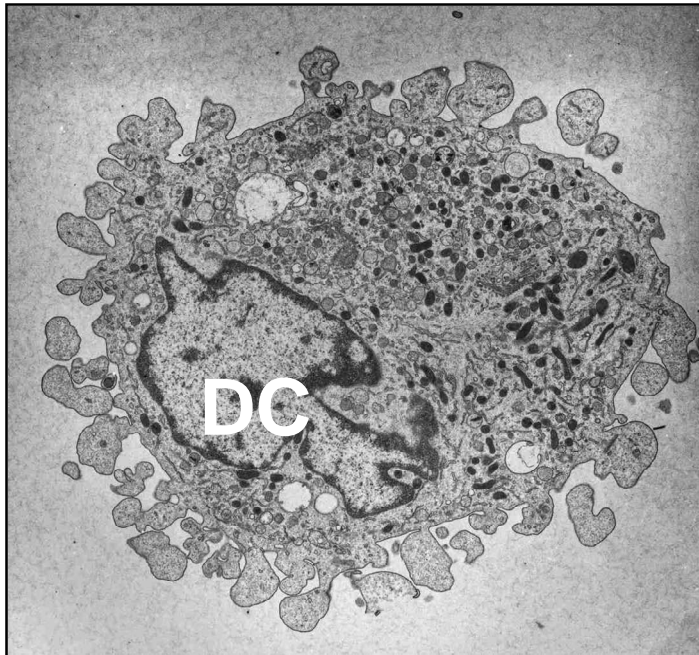


Abb. 11A: Dendritische Zelle (DC), Elektronenmikroskopie, Vergrößerung 3000-fach.

Nach Zugabe von Thrombozyten im Verhältnis 1:800 zeigte sich, dass diese durch dendritische Zellen gebunden und aufgenommen werden (Abb. 11B & C). In Phagosomen der dargestellten dendritischen Zelle sind intakte (Abb. 11C) und bereits im Abbau begriffene Thrombozyten erkennbar (Abb. 11D).

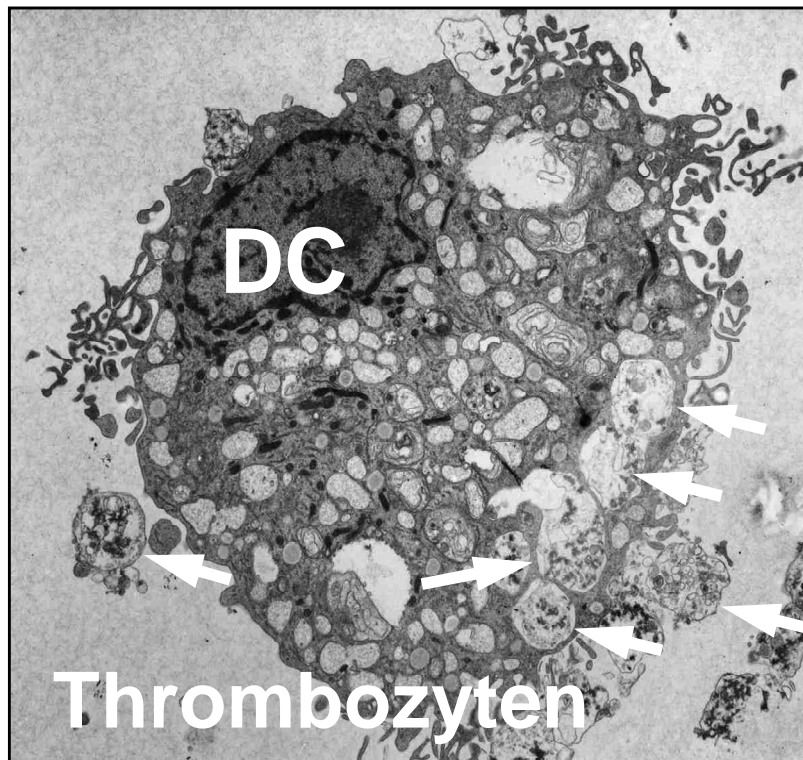


Abb. 11B: Dendritische Zelle mit gebundenen und phagozytierten Thrombozyten; weiße Pfeile: Thrombozyten
Elektronenmikroskopie, Vergrößerung 3000-fach.

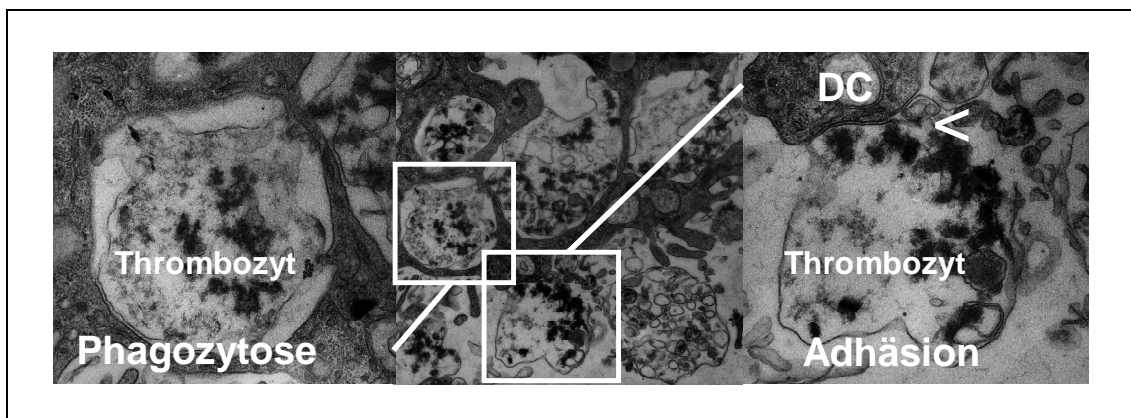


Abb. 11C: Phagozytose von Thrombozyten durch eine dendritische Zelle (DC).
Linkes Bild: phagozytierter Thrombozyt, Ausschnittsvergrößerung.
Mitte: Mehrere Thrombozyten, die an die dendritische Zelle binden oder bereits aufgenommen wurden, Vergrößerung 12000-fach.
Rechtes Bild: gebundener Thrombozyt, Ausschnittsvergrößerung.

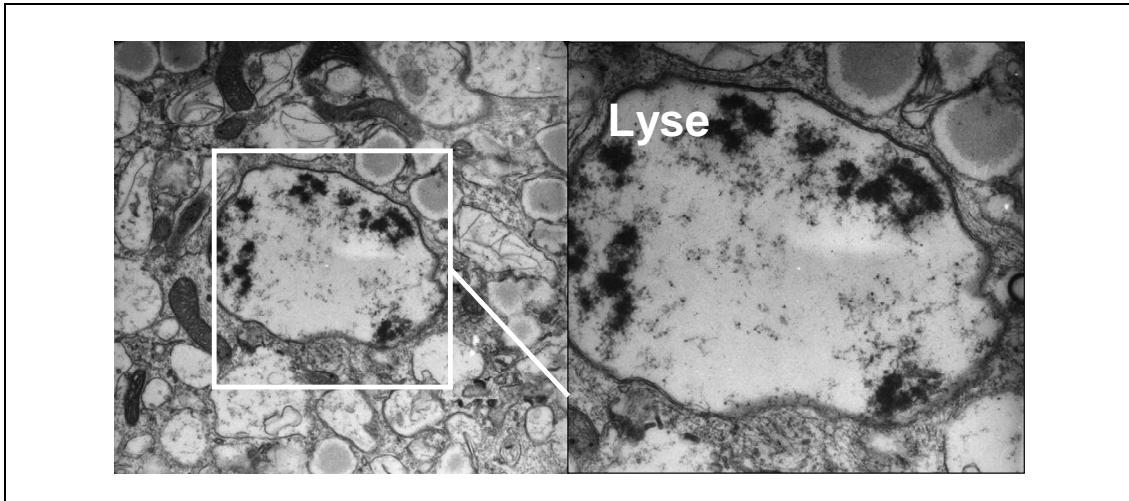


Abb. 11D: Phagolysosom einer dendritischen Zelle mit Resten von verdauten Thrombozyten, Elektronenmikroskopie, Vergrößerung 12000- und 20000-fach.

3.8. Thrombozyteninduzierte Apoptose von dendritischen Zellen

Im Verlauf der Koinkubation von dendritischen Zellen und Thrombozyten zeigte sich, dass die Zahl der dendritischen Zellen in der Kultur augenscheinlich abnahm und dabei im Umfeld der dendritischen Zellen zahlreiche Vesikel erschienen (Abb. 12).

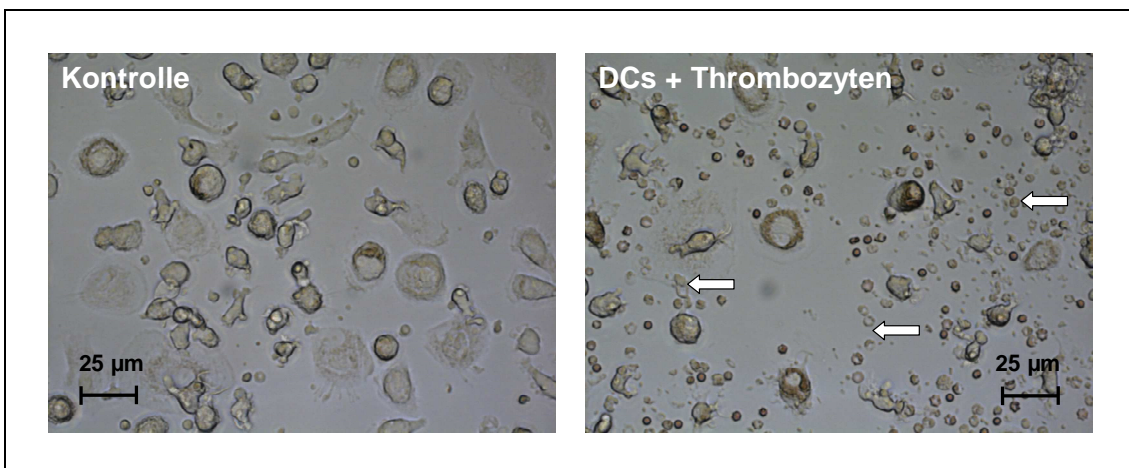


Abb. 12: Kultur dendritischer Zellen (DCs) mit Thrombozyten nach zwölf Tagen. In der Umgebung von dendritischen Zellen sind zahlreiche Vesikel zu erkennen. Phasenkontrastmikroskopie, Vergrößerung 400-fach. Weiße Pfeile: Vesikel, Kontrolle: dendritische Zellen.

Um zu untersuchen, ob Thrombozyten bei längerer Interaktion mit dendritischen Zellen deren Zelltod induzieren, wurden Propidiumjodid-Kernfärbungen und TUNEL-Assays durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten mit dem Zytostatikum Mitomycin C behandelte dendritische Zellen. Als Negativkontrolle dienten solche, die ohne Thrombozyten inkubiert worden waren.

Es zeigte sich in der Propidiumjodidfärbung nach neun Tagen ein gegenüber der Negativkontrolle deutlich erhöhter Anteil an apoptotischen dendritischen Zellen nach Stimulation durch Thrombozyten ($n=4$, $p<0,05$, Abb. 13A). Nach neun Tagen zeigten sich 42,8 % der reifen dendritischen Zellen und 38,6 % der unreifen dendritischen Zellen in der PI-Kernfärbung apoptotisch (Abb. 13A). Somit war der Effekt von Thrombozyten auf dendritische Zellen unabhängig vom Reifungsgrad, denn sowohl unreife (GM-CSF/IL-4) als auch reife dendritische Zellen (GM-CSF/IL-4/CD40L) zeigten in ähnlichem Maße Apoptose.

Der Anteil apoptotischer Zellen war nahezu ebenso hoch wie in der mit Zytostatikum behandelten Positivkontrolle. Die Negativkontrolle ergab, dass 7,2 % der reiferen und 8,4 % der unreifen dendritischen Zellen ohne weitere Behandlung apoptotische Kerne aufwiesen (Abb. 13A).

Um die Entwicklung der Apoptose im Zeitverlauf zu beobachten, wurden Propidiumjodidfärbungen über elf Tage durchgeführt. Dabei zeigte sich ein Beginn der Apoptose am dritten Tag. Nach sieben Tagen wurde ein Maximum erreicht (Abb. 13B).

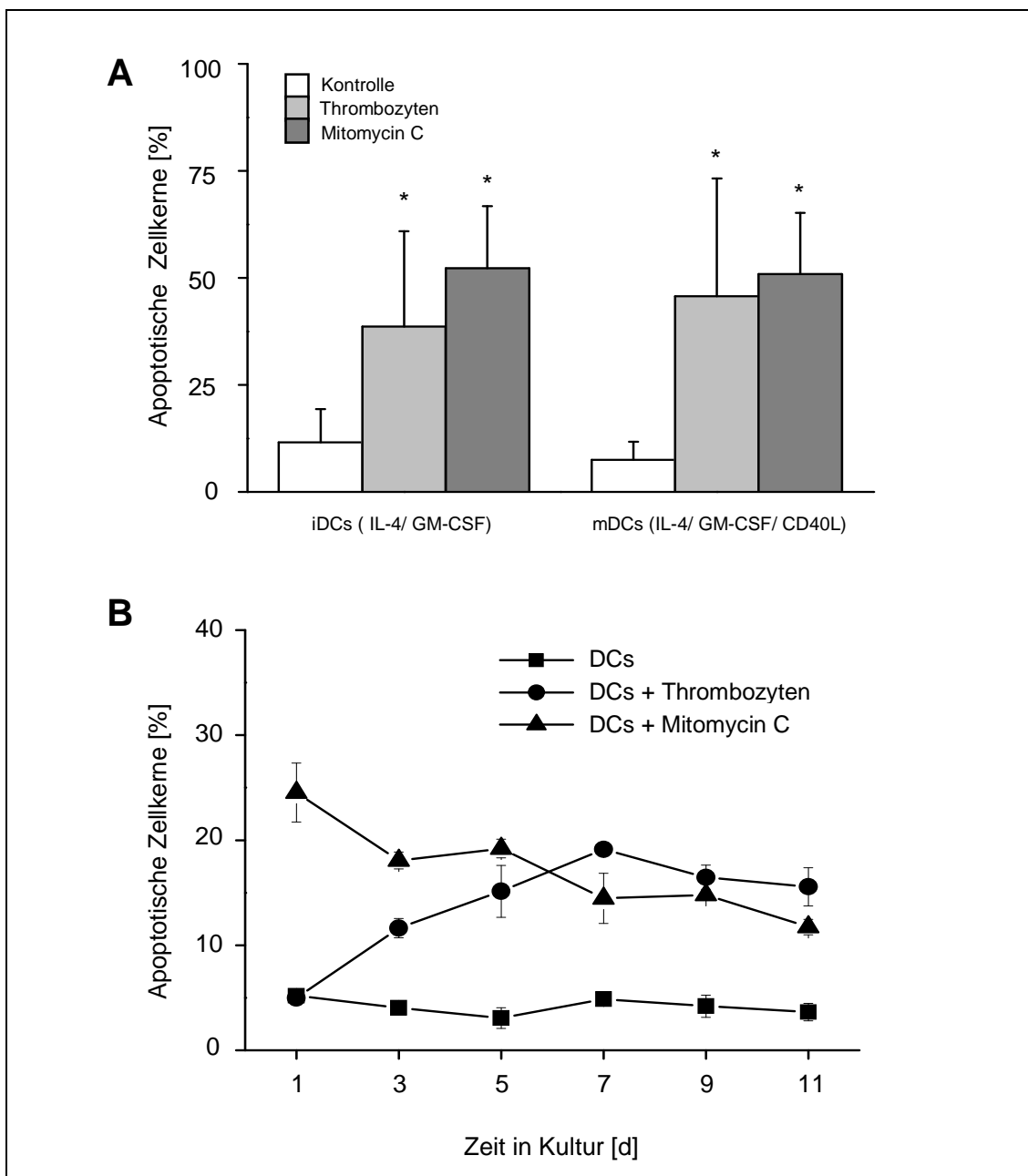


Abb. 13A: Anteil der Zellen mit hypodiploidem Zellkern an einer Population unreifer (iDCs) und reifer (mDCs) dendritischer Zellen nach neuntägiger Stimulation mit Thrombozyten. (n=4, *p<0,05 im Vergleich zur Negativkontrolle).

B: Kinetik der Apoptose von dendritischen Zellen während der Kokultivierung mit Thrombozyten über elf Tage.

Als Positivkontrolle dienten mit Mitomycin C (25 µg/ml) behandelte dendritische Zellen, als Negativkontrolle sind unstimulierte dendritische Zellen abgebildet.

Der Nachweis von Doppelstrangbrüchen mit Hilfe des TUNEL-Assays erbrachte ähnliche Apoptose-Raten wie die Propidiumjodidfärbungen, sowohl bei den durch Thrombozyten stimulierten, wie auch bei den mit Mitomycin C behandelten dendritischen Zellen. Im Mittel waren 27,4 % der mit Thrombozyten inkubierten dendritischen Zellen apoptotisch (Abb. 14). Die unstimulierte Kontrolle ergab 10,1 %, die mit Mitomycin C behandelte Positivkontrolle 54,2 % apoptotische Zellen (Abb. 14).

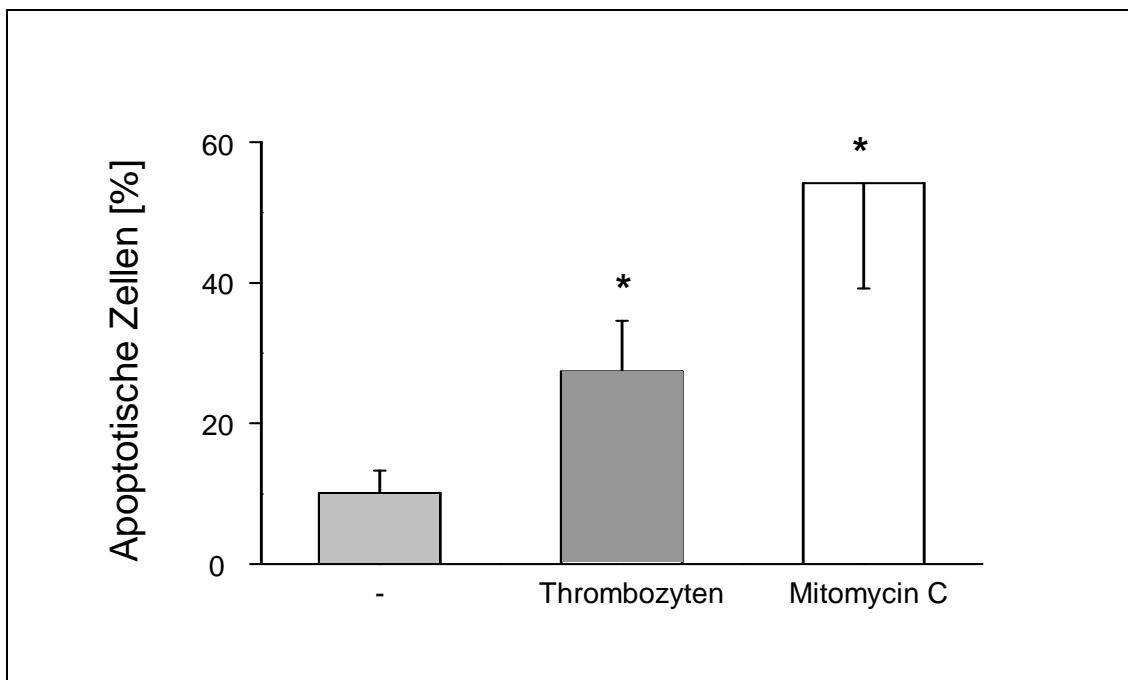


Abb. 14: Mit Hilfe des TUNEL-Assays wurden durchflusszytometrisch freie DNA-Enden nachgewiesen, wie sie in apoptotischen Zellen vorkommen. Dargestellt ist der Anteil von apoptotischen dendritischen Zellen an der Gesamtpopulation. Als Kontrolle sind dendritische Zellen ohne Thrombozytenstimulation und mit Mitomycin C behandelte dendritische Zellen abgebildet ($n=3$, * $p<0,05$ im Vergleich zur Negativkontrolle).

4. Diskussion

Nach neueren Erkenntnissen spielen dendritische Zellen in der Atherosklerose-entstehung eine bedeutende Rolle [9, 11, 14, 17-19]. Dendritische Zellen kommen physiologischerweise in arteriellen Gefäßen vor. Ihre Zahl nimmt in Wandabschnitten, die hämodynamischem Stress ausgesetzt sind, bereits beim jungen Menschen zu [14, 31]. Jongstra-Bilen und Kollegen konnten erst kürzlich zeigen, dass dendritische Zellen in für Atherosklerose gefährdeten Wandabschnitten 100-fach häufiger sind als in nicht gefährdeten Bereichen. Die Zahl der T-Zellen hingegen ist in den entsprechenden Abschnitten vergleichbar [17]. Dendritische Zellen sammeln sich dabei im Bereich der Intima, dem hauptsächlichsten Ort der atherosklerotischen Entzündungsprozesse. Jongstra-Bilen et al. vermuten daher, dass eine chronische Entzündungsreaktion, ausgelöst durch dendritische Zellen, den ersten Schritt im Prozess der Atherogenese darstellt und zur Aktivierung von Monozyten mit nachfolgender Schaumzellbildung beiträgt [17].

Im Verlauf des atherosklerotischen Remodelings steigt die Zahl der dendritischen Zellen [31] und auch deren Aktivierungsgrad weiter an [18]. Dendritische Zellen konzentrieren sich dabei besonders im Bereich der Plaqueschulter und sind in instabilen Plaques signifikant zahlreicher als in stabilen [19].

Dendritische Zellen scheinen somit ein wichtiger Baustein in der Entstehung von Atherosklerose zu sein. Bisher ungeklärt ist aber, auf welchem Weg dendritische Zellen Gefäßläsionen erreichen und welche Faktoren dort zu ihrer Reifung führen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass dendritische Zellen unter arteriellen Flussbedingungen an immobilisierte Thrombozyten binden. Der initiale Kontakt wird über PSGL-1 hergestellt; die feste Adhäsion wird von Seiten der dendritischen Zellen über die beiden Untereinheiten CD11b und CD18 des Integrins $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1) vermittelt. CD49d hingegen trägt nicht in nennenswerter Weise zur Adhäsion bei.

Diese Adhäsionsversuche zeigen auch, dass dendritische Zellen nur schwach an Kollagen binden, welches den Hauptteil der Extrazellulärmatrix von atherosklerotischen Plaques darstellt. Es bedarf somit eines anderen Adhäsionsmechanismus, um die Migration in Gefäßläsionen zu ermöglichen.

Über Thrombozyten ist bekannt, dass sie sich in kürzester Zeit an Gefäßverletzungen anlagern und dabei eine Vielzahl von potenten, chemotaktisch wirkenden Faktoren freisetzen sowie Adhäsionsrezeptoren an ihre Zelloberfläche translozieren [32]. Es konnte gezeigt werden, dass die durch Thrombozyten vermittelte Rekrutierung von Blutzellen entscheidende Bedeutung für die Entstehung von Atherosklerose hat [5]. Eine weitere Arbeit kommt zu dem Ergebnis, dass wahrscheinlich auch die Migration von endothelialen Progenitorzellen in vaskuläre Läsionen durch Thrombozyten vermittelt wird [6]. Die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen bewirkt deren Aktivierung und könnte daher im Weiteren die Bindung von dendritischen Zellen an die Gefäßwand über β_2 -Integrine (CD11b/CD18) vermitteln.

Eine wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass Thrombozyten die Funktion von dendritischen Zellen beeinflussen. In den durchgeführten Koinkubationsexperimenten zeigte sich eine durch Thrombozyten ausgelöste vermehrte Expression der Differenzierungsmarker CD1a und CD83. Auch wurden die lymphoproliferativen Fähigkeiten von dendritischen Zellen durch Thrombozyten gefördert, was zusammengenommen auf eine Reifung der dendritischen Zellen in Gegenwart von Thrombozyten hindeutet.

Eine Interaktion von dendritischen Zellen mit Thrombozyten wurde bereits beschrieben, die Ergebnisse verschiedener Arbeiten zeichnen allerdings ein uneinheitliches Bild, welche Auswirkungen diese Interaktion auf dendritische Zellen haben soll [20-23, 33].

Kissel et al. beobachteten, dass aktivierte Thrombozyten die Differenzierung von dendritischen Zellen hemmen und die Produktion der proinflammatorischen Mediatoren TNF α und IL-12 drosseln [22].

Entgegen dieser Beobachtung stellten Martinson et al. bei der Koinkubation von dendritischen Zellen mit thrombinaktivierten autologen Thrombozyten eine gesteigerte Expression von Reife- und Aktivierungsmarkern wie CD80, CD83 und CD86 fest [23].

Hagihara et al. beobachteten ebenfalls, dass aktivierte Thrombozyten die Reifung von unreifen dendritischen Zellen fördern und darüber hinaus unter Einwirkung von LPS und IFN- γ in Kultur die Produktion von Interleukin-10 induzieren können [33].

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Koinkubationsexperimente deuten auf eine Induktion der Reifung von dendritischen Zellen in Gegenwart von Thrombozyten hin, ähnlich den Ergebnissen von Martinson et al. und Hagihara et al.. Die von Kissel et al. beobachtete Hemmung der Differenzierung von dendritischen Zellen konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass in der vorliegenden Arbeit die Interaktion von bereits differenzierten dendritischen Zellen mit Thrombozyten beobachtet wurde. Kissel et al. hingegen untersuchten den Differenzierungsprozess von CD14⁺ Zellen hin zu dendritischen Zellen in Gegenwart von Thrombozyten. Auch wurden in dieser Arbeit in allen Experimenten isolierte Thrombozyten und nicht plättchenreiches Plasma verwendet. Plättchenreiches Plasma enthält eine Vielzahl an Faktoren welche potenziell die Versuche beeinflussen können.

Neben der beobachteten Expression von Differenzierungsmarkern wurden auch die lymphozytenstimulierenden Fähigkeiten von dendritischen Zellen durch Thrombozyten gefördert. Es ist bekannt, dass aktivierte Thrombozyten eine Reihe von entzündungsfördernden Substanzen wie IL-1, CD40L und Wachstumsfaktoren freisetzen [8], die möglicherweise die Reifung und Funktion von dendritischen Zellen beeinflussen. Insbesondere von CD40L ist bekannt, dass es für die Reifung von dendritischen Zellen von großer Bedeutung ist und die lymphoproliferativen Fähigkeiten von dendritischen Zellen steigert [13]. An Langerhans-Zellen, einer Subgruppe von dendritischen Zellen der Epidermis, wurde beobachtet, dass sie in Gegenwart von aktivierten und fixierten

Thrombozyten selbst aktiviert werden [34]. Kaneider et al. beobachteten, dass von aktivierten Thrombozyten freigesetzter CD40-Ligand die Reifung von dendritischen Zellen, gemessen an der HLA-DR-Expression, induzieren kann [21].

Diese Erkenntnisse decken sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die mit Hilfe der MLR belegen, dass CD40L für die Steigerung der lymphoproliferativen Fähigkeiten von dendritischen Zellen durch Thrombozyten wichtig ist. Es ist daher vorstellbar, dass in vaskulären Läsionen, in der Umgebung von adhären-ten Thrombozyten, unreife dendritische Zellen oder deren Vorläufer durch CD40L und andere noch nicht bekannte Faktoren aus Thrombozyten zur Reifung und Differenzierung angeregt werden und dadurch die Fähigkeit erlangen Lymphozyten zu stimulieren. Lymphozyten, insbesondere T-Zellen, sind durch Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und durch Stimulation von Makrophagen entscheidend an der Plaquestabilisierung beteiligt [2-4].

Wenn dendritische Zellen ihr Zielgewebe erreicht haben, beginnen sie durch Phagozytose und andere Mechanismen den Bestand an Antigenen ihrer nahen Umgebung aufzunehmen und zu präsentieren [12]. Die Beobachtung von dendritischen Zellen und Thrombozyten in gemeinsamer Kultur zeigte, dass Thrombozyten durch dendritische Zellen in großer Zahl aufgenommen werden. Über einen Zeitraum von zwölf Tagen konnte die Phagozytose praktisch aller Thrombozyten beobachtet werden, was rein statistisch die Aufnahme von 800 Thrombozyten durch eine einzelne dendritische Zelle bedeutet und die ausgeprägten Phagozytosefähigkeiten von dendritischen Zellen unterstreicht. Die Phagozytose von Thrombozyten durch dendritische Zellen scheint keine Reaktion auf fremdes antigenes Material zu sein, da sie auch bei Inkubation mit autologen Thrombozyten auftrat. Der beobachtete Phagozytoseprozess von Thrombozyten durch dendritische Zellen ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

Während der Inkubation veränderten die mit Thrombozyten beladenen dendritischen Zellen deutlich ihre Morphologie, so zeigten sich intrazellulär braune Granula. Ebenso ging ihre Zahl im Verlauf der Kultivierungszeit deutlich zurück. Um die Bedeutung von apoptotischen Mechanismen in diesem Prozess

zu untersuchen, wurden dendritische Zellen nach Inkubation mit Thrombozyten auf Kernfragmentierungen und DNA-Strangbrüche hin untersucht.

Beide Nachweisverfahren ergaben eine durch Thrombozyten induzierte Apoptose von dendritischen Zellen. Auch die Induktion der Apoptose von dendritischen Zellen durch Thrombozyten ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Über die Beteiligung dieses Prozesses an der Atheroskleroseentstehung kann nur spekuliert werden. Denkbar wäre eine Reduktion der Zahl proinflammatorischer dendritischer Zellen durch Apoptose und damit langfristig eine Drosselung der Entzündungsaktivität. Es ist auffallend, dass die Apoptose zeitlich einhergeht mit der Phagozytose von Thrombozyten, was auf eine Verbindung beider Prozesse hinweisen könnte.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Thrombozyten *in vitro* die Adhäsion von dendritischen Zellen vermitteln und zudem die Fähigkeit dendritischer Zellen T-Zellen zu stimulieren in bedeutsamer Weise modulieren. Diese Erkenntnisse geben Hinweise darauf, dass Thrombozyten auch *in vivo* eine Rolle bei der Migration von dendritischen Zellen in atherosklerotische Läsionen spielen. Ebenso scheinen Thrombozyten die Differenzierung und Reifung von dendritischen Zellen zu fördern und so zur Entzündungsreaktion innerhalb der Plaque beizutragen. Es ist aber auch denkbar, dass es durch den Einfluss von Thrombozyten über apoptotische Mechanismen zu einem Rückgang der dendritischen Zellpopulation und damit zu einer Verringerung der entzündlichen Aktivität kommt.

Die Bedeutung der beobachteten Zusammenhänge für den Prozess der Atherosklerose muss im Tiermodell und am lebenden Menschen erst noch erforscht werden. Das Zusammenspiel von dendritischen Zellen und Thrombozyten ist aber möglicherweise eine entscheidende Verbindung zwischen thrombotischen und immunologischen Mechanismen der Atherosklerose.

5. Zusammenfassung

Die Ursache der Atherosklerose ist ein chronischer Entzündungsprozess der arteriellen Gefäßwand. Unter den kleineren Leukozytenpopulationen in atherosklerotischen Läsionen sind dendritische Zellen (DCs) von besonderer Bedeutung. Sie konzentrieren sich in atherosklerotischen Wandabschnitten, und ihre Zahl steigt mit Fortschreiten des atherosklerotischen Remodelings stark an. Arbeiten aus jüngster Zeit lassen auch ihre Beteiligung an der Plaquestabilisierung vermuten.

Thrombozyten tragen zur Leukozyteninvasion bei, triggern die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und sezernieren inflammatorische Zytokine. Bisher unbekannt ist, auf welchem Weg DCs in atherosklerotische Läsionen gelangen und welche Bedingungen dort zu ihrer Reifung beitragen. Das Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss von Thrombozyten auf die Adhäsion und Funktion von DCs zu untersuchen.

Es zeigte sich, dass DCs im statischen Modell wie auch unter dynamischen Flussbedingungen an Thrombozyten binden. Das initiale „Rolling“ wird über PSGL-1 vermittelt. Die feste Bindung auf Thrombozyten vermittelt das Integrin $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18; Mac-1) der DCs. Nach Inkubation mit Thrombozyten zeigten DCs eine gesteigerte Expression des Reifemarkers CD83, aber nahezu keine Expression von CD14. Die lymphozytenstimulierenden Fähigkeiten von DCs, gemessen in der MLR, wurden durch Thrombozyten signifikant gesteigert. Darüber hinaus phagozytierten DCs Thrombozyten nach gemeinsamer Inkubation über mehrere Tage, wie mittels Elektronenmikroskopie und Fluoreszenzmarkierung der Thrombozyten dargestellt werden konnte. Schließlich induzierte die Interaktion von DCs mit Thrombozyten nach mehreren Tagen die Apoptose der DCs.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Thrombozyten die Migration von DCs in die Plaque fördern und dort deren Reifung und Differenzierung induzieren. Die vermehrte Einwanderung von DCs und die Stimulation von T-Zellen durch DCs in der Plaque könnten zur Plaquestabilisierung beitragen. Über längere Zeiträume hinweg könnten allerdings Thrombozyten die Zahl der DCs durch apoptotische Mechanismen verringern.

Die Bedeutung der Interaktion von DCs und Thrombozyten in vivo muss noch untersucht werden, es scheint aber wahrscheinlich, dass Thrombozyten sowohl für die Rekrutierung von DCs wie auch für deren Aktivierung von Bedeutung sind. Diese Interaktion trägt möglicherweise zur Entstehung von Atherosklerose bei.

6. Abkürzungsverzeichnis

bFGF	basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
BSA	bovines Serumalbumin
C-KIT	CD117; Rezeptor für zytokinen Stammzellfaktor
FLT-3	CD135; fms-artiger Tyrosinkinase Rezeptor
CD40L	CD40-Ligand
DCs	dendritische Zellen
EGF	epidermal growth factor
FCS	fötales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
ICAM	intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
iDCs	unreife dendritische Zellen
LPS	Lipopolysaccharide
LDL	low density lipoproteins
Mac-1	Macrophagen-1-Antigen, Rezeptorkomplex aus CD11b / CD18
MHC	Major histocompatibility complex
HLA-DR	MHC-II Rezeptor
MLR	mixed lymphocyte reaction
mAk	monoklonaler Antikörper
mDCs	reife dendritische Zellen
PBMNCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDGF	platelet-derived growth factor
PF-4	Plättchenfaktor-4
PI	Propidiumjodid
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1
TdT	terminal desoxynucleotidyl transferase
TUNEL	terminal-uridine-nick-end-labeling
TGF	transforming growth factor
TNF α	Tumornekrose Faktor α

7. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt (2006)
Todesursachenstatistik 2005
2. Hansson, G.K. (2005)
Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease
N Engl J Med, 352, 1685-95
3. Ross, R. (1999)
Atherosclerosis--an inflammatory disease
N Engl J Med, 340, 115-26
4. Lusis, A.J. (2000)
Atherosclerosis
Nature, 407, 233-41
5. Massberg, S., Brand, K., Gruner, S., Page, S., Muller, E., Muller, I., Bergmeier, W., Richter, T., Lorenz, M., Konrad, I., Nieswandt, B., Gawaz, M. (2002)
A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation
J Exp Med, 196, 887-96
6. Langer, H., May, A.E., Daub, K., Heinzmann, U., Lang, P., Schumm, M., Vestweber, D., Massberg, S., Schonberger, T., Pfisterer, I., Hatzopoulos, A.K., Gawaz, M. (2006)
Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro
Circ Res, 98, e2-10
7. Henn, V., Slupsky, J.R., Grafe, M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller-Berghaus, G., Kroczeck, R.A. (1998)
CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells
Nature, 391, 591-4
8. Gawaz, M., Langer, H., May, A.E. (2005)
Platelets in inflammation and atherogenesis
J Clin Invest, 115, 3378-84
9. Bobryshev, Y.V. (2000)
Dendritic cells and their involvement in atherosclerosis
Curr Opin Lipidol, 11, 511-7

10. Steinman, R.M., Kaplan, G., Witmer, M.D., Cohn, Z.A. (1979)
Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro
J Exp Med, 149, 1-16
11. Bobryshev, Y.V., Lord, R.S. (1995)
Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of Vascular Dendritic Cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta
Arch Histol Cytol, 58, 307-22
12. Banchereau, J., Steinman, R.M. (1998)
Dendritic cells and the control of immunity
Nature, 392, 245-52
13. Brossart, P., Grunebach, F., Stuhler, G., Reichardt, V.L., Mohle, R., Kanz, L., Brugger, W. (1998)
Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Blood, 92, 4238-47
14. Bobryshev, Y.V. (2005)
Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance
Eur Heart J, 26, 1700-4
15. Bobryshev, Y.V., Lord, R.S. (1998)
Mapping of vascular dendritic cells in atherosclerotic arteries suggests their involvement in local immune-inflammatory reactions
Cardiovasc Res, 37, 799-810
16. Wick, G., Romen, M., Amberger, A., Metzler, B., Mayr, M., Falkensammer, G., Xu, Q. (1997)
Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue
Faseb J, 11, 1199-207
17. Jongstra-Bilen, J., Haidari, M., Zhu, S.N., Chen, M., Guha, D., Cybulsky, M.I. (2006)
Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis
J Exp Med, 203, 2073-83
18. Lord, R.S., Bobryshev, Y.V. (1999)
Clustering of dendritic cells in athero-prone areas of the aorta
Atherosclerosis, 146, 197-8

19. Yilmaz, A., Lochno, M., Traeg, F., Cicha, I., Reiss, C., Stumpf, C., Raaz, D., Anger, T., Amann, K., Probst, T., Ludwig, J., Daniel, W.G., Garlichs, C.D. (2004)
Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques
Atherosclerosis, 176, 101-10
20. Hilf, N., Singh-Jasuja, H., Schwarzmaier, P., Gouttefangeas, C., Rammensee, H.G., Schild, H. (2002)
Human platelets express heat shock protein receptors and regulate dendritic cell maturation
Blood, 99, 3676-82
21. Kaneider, N.C., Kaser, A., Tilg, H., Ricevuti, G., Wiedermann, C.J. (2003)
CD40 ligand-dependent maturation of human monocyte-derived dendritic cells by activated platelets
Int J Immunopathol Pharmacol, 16, 225-31
22. Kissel, K., Berber, S., Nockher, A., Santoso, S., Bein, G., Hackstein, H. (2006)
Human platelets target dendritic cell differentiation and production of proinflammatory cytokines
Transfusion, 46, 818-27
23. Martinson, J., Bae, J., Klingemann, H.G., Tam, Y. (2004)
Activated platelets rapidly up-regulate CD40L expression and can effectively mature and activate autologous ex vivo differentiated DC
Cytotherapy, 6, 487-97
24. Massberg, S., Gawaz, M., Gruner, S., Schulte, V., Konrad, I., Zohlnhofer, D., Heinzmann, U., Nieswandt, B. (2003)
A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo
J Exp Med, 197, 41-9
25. Kohl, K., Schnautz, S., Pesch, M., Klein, E., Aumailley, M., Bieber, T., Koch, S. (2007)
Subpopulations of human dendritic cells display a distinct phenotype and bind differentially to proteins of the extracellular matrix
Eur J Cell Biol,
26. Reinhardt, P.H., Kubes, P. (1998)
Differential leukocyte recruitment from whole blood via endothelial adhesion molecules under shear conditions
Blood, 92, 4691-9

27. Nencioni, A., Lauber, K., Grunebach, F., Van Parijs, L., Denzlinger, C., Wesselborg, S., Brossart, P. (2003)
Cyclopentenone prostaglandins induce lymphocyte apoptosis by activating the mitochondrial apoptosis pathway independent of external death receptor signaling
J Immunol, 171, 5148-56
28. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., Riccardi, C. (1991)
A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry
J Immunol Methods, 139, 271-9
29. Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A. (1992)
Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation
J Cell Biol, 119, 493-501
30. Gold, R., Schmied, M., Giegerich, G., Breitschopf, H., Hartung, H.P., Toyka, K.V., Lassmann, H. (1994)
Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques
Lab Invest, 71, 219-25
31. Bobryshev, Y.V., Lord, R.S. (1995)
S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions
Cardiovasc Res, 29, 689-96
32. Ruggeri, Z.M. (2002)
Platelets in atherothrombosis
Nat Med, 8, 1227-34
33. Hagihara, M., Higuchi, A., Tamura, N., Ueda, Y., Hirabayashi, K., Ikeda, Y., Kato, S., Sakamoto, S., Hotta, T., Handa, S., Goto, S. (2004)
Platelets, after exposure to a high shear stress, induce IL-10-producing, mature dendritic cells in vitro
J Immunol, 172, 5297-303
34. Gatti, E., Velleca, M.A., Biedermann, B.C., Ma, W., Unternaehrer, J., Ebersold, M.W., Medzhitov, R., Pober, J.S., Mellman, I. (2000)
Large-scale culture and selective maturation of human Langerhans cells from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized CD34+ progenitors
J Immunol, 164, 3600-7

8. Veröffentlichungen

Teile diese Arbeit wurden in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

Langer, H., Daub K., Braun, G., Schönberger, T., May, A. E., Schaller, M., Stein, G., Stellos, K., Bueltmann, A., Siegel-Axel, D., Wendel, H. P., Aebert, H., Roecken, M., Seizer, P., Santoso, S., Wesselborg, S., Brossart, P., Gawaz, M. (2007)

Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function in vitro.

Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 27, 1463-70

Braun, G., Langer, H., Stein, G., Brossart, P. (2007)

Einfluss von Thrombozyten auf die Adhäsion und Funktion dendritischer Zellen.

In: Heinle, H., Schulte, H., von Eckardstein, A. (Hrsg.): Neue Konzepte, Risikofaktoren und Targets bei Arteriosklerose

Deutsche Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2007, 170-75

Braun, G., Langer, H., Stein, G., Brossart, P., Gawaz, M.

Adhärenz Thrombozyten rekrutieren dendritische Zellen und modulieren die Funktion dendritischer Zellen in vitro.

Jahrestagung der DGIM, Wiesbaden, 24. April 2006

Langer, H., Braun, G., May, A. E., Brossart, P., Schaller, M., Stein, G., Wesselborg, S., Gawaz, M. (2006)

Einfluss von Thrombozyten auf die Adhäsion und Funktion dendritischer Zellen.

Perfusion (Suppl. II) 78

Stellos, K., Langer, H., Daub, K., May, A.E., Braun, G., Schaller, P., Wesselborg, S., Brossart, P., Gawaz, M.

Dendritic cells interact with platelets – potential role for immunomodulatory processes in vascular remodelling.

Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie, München, 12.-14. Oktober 2006

Braun, G., Langer, H., Daub, K., May, A.E., Stein, G., Brossart, P., Gawaz, M.

Adhärenz Thrombozyten rekrutieren dendritische Zellen und modulieren die Funktion dendritischer Zellen in vitro.

Biostar Kongress, Stuttgart, 11. Oktober 2006

Langer H., Braun G., Stellos K., Daub K., Gauß A., Schönberger T., May A.E., Bigalke B., Schaller M., Stein G.M., Buelmann A., Siegel-Axel D., Wendel H.P., Santoso S., Wesselborg S., Brossart P., Gawaz M. (2007)

Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and induce maturation, activation, phagocytosis and apoptosis of dendritic cells.

Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V.
Dresden, 21.-24. Februar 2007

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz danke ich für die Betreuung als Doktorvater und die vielen wertvollen Ratschläge, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt besonders Herrn Dr. med. Harald Langer, dessen Einsatz und unermüdliches Engagement mir stets Hilfe und Ansporn zugleich waren.

Ich danke auch Herrn PD Dr. med. Peter Brossart und seiner gesamten Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und die wertvolle Unterstützung während der gesamten Zeit dieser Arbeit.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau PD Dr. rer. nat. Gerburg Stein, deren Wissen und Inspiration viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich auch Iris Schäfer, Christina Neff und Birgit Fehrenbacher für die gute Zusammenarbeit und praktische Mithilfe.

Mein ganz besonderer Dank gilt Heike Runge, deren praktischer Rat und moralischer Beistand mich während der ganzen Zeit sehr unterstützt haben.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Gregor Braun

Geboren: 02. Oktober 1981 in Stuttgart

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1986 – 1990 Grundschule Schwieberdingen

1990 – 2000 Hans Grüninger Gymnasium, Markgröningen

2000 Abitur

Zivildienst:

2000 – 2001 Orthopädische Klinik Markgröningen

Hochschulstudium:

Seit WS 2001/2002 Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen

09/2003 Physikum

08/2006 – 07/2007 Praktisches Jahr am Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart: Anästhesie, Innere Medizin und Chirurgie

27. Mai 2008 Ärztliche Prüfung