

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
Schwerpunkt: Kardiologie und Kreislauferkrankungen

**Rekrutierung von Dendritischen Zellen an
die Gefäßwand – Bedeutung der Interaktion
von GPIIb/IIIa mit Mac-1**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Niethammer, Joel

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. F. Langer

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. K. Aicher

Tag der Disputation: 30.08.2018

S.D.G.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung.....	8
1.1 Atherosklerose	8
1.1.1 Pathogenese der Atherosklerose	9
1.2 Thrombozyten	12
1.2.1 Das Glykoprotein Iba als thrombozytärer Oberflächenrezeptor	13
1.2.2 Die Rolle von Thrombozyten in der Pathogenese der Atherosklerose	15
1.3 Dendritische Zellen.....	19
1.3.1 Das Integrin Mac-1	21
1.3.2 Die Rolle von Dendritischen Zellen in der Pathogenese der Atherosklerose	23
1.4 Interaktion von Thrombozyten und Dendritischen Zellen in der Atherosklerose	27
1.5 Zielsetzung der Arbeit	31
2 Material und Methoden	32
2.1 Material.....	32
2.1.1 Geräte und Software	32
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	34
2.1.3 Lösungen, Medien, Reagenzien, Proteine	36
2.1.4 Versuchstiere.....	38
2.1.5 Antikörper	39
2.2 Methoden	40
2.2.1 Thrombozytenisolation aus murinem Vollblut.....	40
2.2.2 Gewinnung von Dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark.	40
2.2.3 Statischer Adhäsions-Assay	42
2.2.4 In vivo Darstellung von Rekrutierung und Adhäsion der DCs in der Intravitalmikroskopie mit temporärer Karotisligatur	44
2.2.5 Zellzählung	49

2.2.6	Auswertung und Statistik	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Analyse des Adhäsionsverhalten von DCs an Thrombozyten in vitro	50
3.1.1	Inhibition von Mac-1 mittels Anti CD11b Antikörper vermindert die Adhäsion von DCs an Thrombozyten in vitro.....	51
3.1.2	Inhibition von GPIIb α mittels eines Anti PopB Antikörpers vermindert die Adhäsion von DCs an Thrombozyten in vitro.....	53
3.1.3	Die Adhäsion von DCs an GPIIb α knockout Thrombozyten in vitro ist vermindert	55
3.2	Analyse des Adhäsionsverhaltens von DCs an Thrombozyten in vivo	56
3.2.1	Analyse des Effekts einer Inhibition des Oberflächenrezeptors Mac-1 auf DCs in vivo.....	56
3.2.2	Analyse des Effekts des Thrombozytenrezeptors GPIIb α auf das Adhäsionsverhalten von DCs an Thrombozyten in vivo	60
3.3	Analyse einer spezifischen Inhibition der Mac-1 Bindungsstelle für GPIIbα mittels eines Anti M2-Antikörpers	64
3.3.1	Spezifische Inhibition der Mac-1 Bindungsstelle für GPIIb α mittels des Anti M2 Antikörpers vermindert die Adhäsion von DCs an Thrombozyten in vitro	65
3.3.2	Spezifische Inhibition der Mac-1 Bindungsstelle für GPIIb α mittels eines Anti M2 Antikörpers vermindert die Adhäsion von DCs an Thrombozyten in vivo.....	66
4	Diskussion	68
5	Zusammenfassung.....	74
6	Literaturverzeichnis	76
7	Erklärung zum Eigenanteil	88
	Danksagung	89

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw	beziehungsweise
CCL5	CC chemokine ligand 5
CCR7	C-C chemokine rezeptor type 7
CXC4	C-X-C chemokine rezeptor type 4
DC	Dendritische Zelle
DCs	Dendritische Zellen
dt.	deutsch
EGF	Epidermal growth factor
ggfs.	gegebenenfalls
GPIb/IX/V	Glykoprotein Ib/IX/V
GPIb α	Glykoprotein I b alpha
HDL	High density lipoprotein
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
ICAM2	Intercellular adhesion molecule 2
IL-12	Interleukin 12
IL1 β	Interleukin 1 beta
IRAK1	Interleucine 1 receptor associated Kinase
JAM-3	Junctional adhesion molecule 3=C
JAM-C	Junctional adhesion molecule C=3
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low density lipoprotein
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
Mac-1	Macrophage-1 antigen

mGMCSF..... Murine granulocyte-macrophage colony-stimulation factor
MHC Major histocompatibility complex
NFκB..... nuclear factor kappa-light-chain-enhancer
PF-4..... Platelet factor 4
PSGL-1..... P-selectin glycoprotein ligand 1
sCD40Lsoluble CD40 ligand
TAK1..... TGF beta activated kinase
TGF-α Transforming growth factor alpha
TLR..... Toll-like-Rezeptor
TNFα Tumor necrose factor α
TRAF6 TNF receptor associated factor 6
VCAM1Vascular cell-adhesion molecule 1
vWF Von-Willebrandt-Faktor
z.B. zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist als Ursache für kardiovaskuläre Erkrankungen mit Folgen wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall einer der führenden Todesgründe in entwickelten Ländern.[1, 2] Unter dem Begriff der Arteriosklerose sind verschiedene Gefäßerkrankungen zusammengefasst. Häufig wird dieser Begriff synonym zu Atherosklerose verwandt, jedoch summieren sich unter die Arteriosklerose, neben der Atherosklerose an sich, weitere Erkrankungen, wie z.B. die Mönckeberg-Mediasklerose. Die Atherosklerose wird als eine chronisch inflammatorische Erkrankung der großen und mittleren Arterien beschrieben.[3] Diese Reaktion folgt auf einen mechanischen Endothelstress und Dyslipidämie. Eine Rekrutierung von Leukozyten folgt und die Plaquebildung stellt die sichtbare Folge dieses Prozesses dar.[4] Die Mehrzahl dieser Plaques bleibt klinisch inapparent. Jedoch sind die Folgen der Atherosklerose wie Gefäßstenosen, -thrombosen und -embolien sehr ernst zu nehmen, da sie in Koronarer Herzkrankheit (KHK), Myokardinfarkten, Schlaganfällen, oder in der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit enden können.

Einige Studien konnten verschiedene Risikofaktoren der Atherosklerose aufdecken. Zu nennen sind hier unter anderem die Framingham-, Procamb-, Rotterdam- oder die Tromsø-Studie. Als Hauptrisikofaktoren gelten Tabakkonsum[5], Diabetes mellitus[6], Arterielle Hypertonie[7], Dyslipidämie[8], Adipositas[9] und ein fortgeschrittenes Lebensalter[10]. Es gibt jedoch noch weitere Risikofaktoren, die mit der Atherosklerose in Verbindung gebracht werden, wie z.B. psychosomatische Faktoren, ein hoher Fibrinogenspiegel, Hyperphosphatämie und andere.

Die Mortalitätsrate für vaskuläre Erkrankungen beträgt aktuell für 35 bis 60-jährige Männer <200 pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Die Wahrscheinlichkeit für 35-jährige Menschen bis zum Alter von 70 Jahren an den Folgen einer vaskulären Erkrankung zu sterben beträgt aktuell 4%. Interessanterweise waren diese Zahlen früher deutlich höher. Die Mortalitätsrate betrug im Jahre 1950 noch über

700 Fälle/100.000 Einwohner pro Jahr. Auch das Risiko für 35-Jährige in den folgenden 35 Jahren an vaskulären Erkrankungen zu sterben betrug 1980 noch 16%. Diese Daten wurden im Vereinigten Königreich erhoben, lassen sich jedoch weitgehend auf die gesamte westliche Welt übertragen.[1]

1.1.1 Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose wird als eine chronisch inflammatorische Erkrankung der großen und mittelgroßen Arterien beschrieben.[3] Ihren Beginn nimmt diese Erkrankung schon im Kindesalter. In einer großen Untersuchung von verstorbenen jungen Menschen konnten in allen Aorten der Individuen sogenannte Fettstreifen („fatty streaks“) gefunden werden.[11] Mit zunehmendem Alter zeigt sich dann eine sich immer schneller ausbildende Veränderung der Gefäßabschnitte.[12] Ab der 4. Lebensdekade kann man eine pathologische Intimadicke, Ausbildung von Plaques, Plaquerupturen und deren vital bedrohenden Folgen wie Myokardinfarkte und Schlaganfälle feststellen.[13]

Multiple Faktoren spielen in der Pathogenese der Atherosklerose zusammen. Hierbei handelt es sich vor allem um Endotheliale Dysfunktion, Dyslipidämie, entzündliche Prozesse und Plaque Ruptur. Das Endothel ist eine einschichtige Auskleidung des inneren Lumens der Blutgefäße. Dies bildet eine aktive Schicht zwischen Blutzellen und dem Gewebe unterhalb des Endothels. Diese Schicht moduliert viele Prozesse, die mit der Interaktion zwischen Blutzellen und tiefer liegendem Gewebe einhergehen. Aber auch eine direkte Interaktion zwischen Endothel und Blutbestandteilen kann stattfinden. Das Endothelium moduliert den Gefäßtonus, das Wachstum, die Hämostase und auch die entzündlichen Prozesse. Die Dysfunktion dieser Prozesse im Endothelium stellt einen anfänglichen Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose dar.[14] Der Verlust der vasodilatatorischen Funktion des Endothels führt zu einem Abfall des vom Endothel produzierten Stickstoffmonoxid, was ein Hauptmechanismus in der Pathogenese sein könnte.[15] Eine chronische Belastung des Endothels durch z.B. Verwirbelungen des Blutstroms an für die Atherosklerose prädisponierten Stellen, wie der Aortenbogen oder Gefäßabgänge, führt zu einer adaptiven Intimaverdickung mit

einer erhöhten endothelialen Permeabilität und möglicher Einwanderung von Leukozyten.[16, 17] Die anderen klassischen Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose wie Diabetes, Dyslipidämie, Hypertonie und Nikotinabusus haben einen pathogenen Einfluss auf die Funktion des Endothels. Bei vorliegender Hypercholesterinämie findet man im Mausmodell schon nach 1-2 Wochen eine erhöhte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen und ein stärkeres Vorkommen von chemotaktischen Zytokinen.[18] Auch die Rekrutierung von Monozyten und die Proliferation von myeloiden Zellen in der Intima kann in diesem sehr frühen Stadium festgestellt werden.[18] Vor allem eine gleichzeitig vorhandene Hypercholesterinämie mit erhöhtem low density lipoprotein (LDL) und erniedrigtem high density lipoprotein (HDL) kann die endotheliale Dysfunktion induzieren.[19] Bei vorliegender Hypercholesterinämie mit erhöhtem LDL wird das LDL in die Gefäßwand eingelagert. Dieses wird dann durch freie Radikale oxidiert.[19] In diese Prozesse wird bereits klinisch und pharmazeutisch eingegriffen. Die Hyperlipidämie kann durch eine Diät[20] oder medikamentös mittels Statinen, welche zu einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit des vom Endothel produzierten Stickstoffmonoxid führen[21], modifiziert werden. Auch durch ACE-Hemmer oder Antioxidanzien wie Vitamin C oder Flavonoide, die z.B. in Rotwein vorkommen, lässt sich die endotheliale Dysfunktion positiv beeinflussen.[22, 23]

Als chronisch inflammatorische Erkrankung spielt das Immunsystem in der Entstehung und der Progression der Atherosklerose eine entscheidende Rolle.[3] Beide Teile des Immunsystems, der angeborene, sowie auch der erworbene Teil, sind involviert.[24] Die Entdeckung von T-Zellen in einer menschlichen atherosklerotischen Plaque im Jahre 1985 gab Hinweise, dass das Immunsystem eine bis dahin noch unbekannt Funktion in der Pathogenese der Atherosklerose innehaben muss.[25] Nach der Einlagerung und Oxidation von LDL in der Gefäßwand induziert dieser Prozess die Expressierung von VCAM1 (vascular cell-adhesion molecule 1). Hierdurch können Monozyten an die Gefäßwand adhären und diese infiltrieren.[26] Die Monozyten differenzieren sich zu Makrophagen, welche dann das oxidierte LDL phagozytieren. Hierbei entstehen die sogenannten Schaumzellen (engl.: „foam cells“).[17] Die Makrophagen initiieren den ent-

zündlichen Prozess, in dem sie T-Lymphozyten aktivieren, welche dann Chemokine, wie z.B. TNF α produzieren und somit die chronische Entzündung initiieren und unterhalten.[27] Aufgrund dieser Veränderungen wandern auch glatte Muskelzellen in den atherosklerotischen Gefäßbereich ein. Diese differenzieren sich wahrscheinlich aus Hämatopoetischen Stammzellen.[28] Dort bilden sie dann vermehrt Kollagen, was zur Bildung einer stenosierenden Plaque und der sogenannten „Fibrinösen Kappe“ beiträgt. Glatte Muskelzellen unterlaufen häufig der Apoptose, was dann wiederum zur Akkumulation von Makrophagen führt.[29]

Die Atherosklerose, im Speziellen das Plaquewachstum, bleibt asymptomatisch bis ein Stenosegrad von 70-80% des Lumens erreicht wird. Darüber hinaus kommt es dann z.B. zu typischen anginopektinösen Beschwerden, sollten Koronargefäße betroffen sein. Solch höhergradige Stenosen sind oft mit einer stabilen Plaque vergesellschaftet. Plaquerupturen mit der Folge einer Gefäßverlegung, was z.B. zu einem Myokardinfarkt führen kann, entstammen typischerweise aus instabilen atherosklerotischen Bereichen, die eine Stenose von <50% des Gefäßes aufweisen.[30] Dies zeigt, dass die Atherosklerose einerseits direkte Symptome als Folge einer Stenose des Gefäßes bewirken und andererseits auch gravierende Folgen nach einer Plaqueruptur mit arterieller Embolie auslösen kann.

1.2 Thrombozyten

Die Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, sind zelluläre Blutbestandteile. Sie wurden erstmals von Max Schultze 1865 beschrieben.[31] Giulio Bizzozero konnte diese Entdeckung im Jahre 1882 in vivo bestätigen.[32] Thrombozyten sind anukleäre, scheibenartige Blutpartikel welche aus Megakaryozyten im Knochenmark abgeschnürt werden. Jeder Megakaryozyt ist in der Lage 5000 – 10.000 Thrombozyten zu bilden. Ein gesunder Mensch bildet ca. 10^{11} Thrombozyten pro Tag. Der Durchmesser von reifen Thrombozyten beträgt 2-3 μ m. Ungefähr 2/3 der im menschlichen Körper vorhandenen Thrombozyten zirkulieren im Blutkreislauf, 1/3 wird in der Milz gespeichert. Die physiologische Konzentration der Thrombozyten beträgt 150-400 x 10^3 pro Mikroliter Blut. Nach einer Lebensdauer zwischen 5 und 9 Tagen werden die Thrombozyten durch Phagozytose in Milz und Leber abgebaut.[33]

Die Hauptaufgabe der Thrombozyten besteht in der Aufrechthaltung der Integrität des Blutgefäßsystems. Schon Bizzozero stellte 1882 fest, dass Thrombozyten die ersten sind, die nach einer Gefäßverletzung an diesem Bereich adhären.[31] Thrombozyten sollen Blutungen nach einer Verletzung stillen und die Blutgerinnung an dieser Stelle aktivieren. Sobald es im Blutgefäßssystem eine Verletzung gibt, adhären Thrombozyten an diese Stelle und werden aktiviert. Dies führt unter anderem zur weiteren Rekrutierung von Thrombozyten, die dann einen Thrombus ausbilden. Sie legen sich an die freiliegende Extrazellulärmatrix des Subendotheliums an und kontrollieren somit die Verletzung und initiieren den Heilungsprozess. [34, 35] Dieser Prozess muss immer in einem Gleichgewicht stehen. Eine unkontrollierte Thrombusformation kann mit dramatischen Folgen wie z.B. einem Akuten Koronarsyndrom oder Thrombosen einhergehen.[34, 35]

Die Aktivierung der Thrombozyten kann über verschiedene Mechanismen geschehen. Hierzu zählen Bestandteile der subendothelialen Matrix, Faktoren des Gerinnungssystems, Immunkomplexe und andere. Durch das freiliegende Subendothelium bei einer Gefäßverletzung können Thrombozyten mittels des Glykoproteins (GP) Ib/IX/V an den von-Willebrandfaktor (vWF) und über GPIV an Kollagen binden. Durch diese Aktivierung wird die Konformation von Integrinen verändert. Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ kann als Fibrinogenrezeptor an Fibrinogen binden,

$\alpha_{IIb}\beta_1$ als Kollagenrezeptor an Kollagen. Es kommt zu einer festen Bindung zwischen Thrombozyten und dem freiliegenden Gewebe. Dies hat zur Folge, dass die Thrombozyten sich über dem Bereich der Gefäßverletzung ausbreiten und sich die Thrombozyten untereinander mittels des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ fest verbinden können. Diese sogenannte Aggregation kann reversibel sein, wenn die Stimulation nur schwach ist und kurz andauert oder irreversibel, sollte diese stark sein und über einen längeren Zeitraum bestehen.[36]

Obwohl Thrombozyten keine Kerne besitzen haben sie zahlreiche Möglichkeiten durch Sekretion von verschiedenen Stoffen oder Interaktion mit anderen Zellen auf ihre Umstände zu reagieren. Diese beeinflussen dann komplexe biologische Mechanismen. Hierzu gehören die Hämostase, Thrombusbildung, Zelladhäsion, Chemotaxis, Proliferation von Zellen, Aktivierung von entzündlichen Prozessen oder Zell-Rekrutierung.[36] Da eine Verletzung auch immer das Risiko einer Infektion birgt werden auch Leukozyten von Thrombozyten rekrutiert. Dies geschieht einerseits über einen direkten Zell-Zell Kontakt oder indirekt über die Ausschüttung von Zytokinen.[37]

1.2.1 Das Glykoprotein Iba als thrombozytärer Oberflächenrezeptor

Das thrombozytäre Glykoprotein Iba ist unter den Namen GPIba oder CD42b bekannt. In Menschen wird es vom GPIBA Gen kodiert.

GPIba ist ein Teil des von-Willebrand-Faktor-Rezeptorkomplexes (GP Ib-IX-V). Der von-Willebrand-Faktor-Rezeptor (vWF-Rezeptor) besteht aus vier verschiedenen Polypeptiden und kommt ausschließlich auf Megakaryozyten und Thrombozyten als Oberflächenrezeptor vor. Auf menschlichen Thrombozyten ist der GP Ib-IX-V Rezeptorkomplex der am zweithäufigsten exprimierte Rezeptor.[38] Er besteht aus den Glykoproteinen GPIba, GPIb β , GPIX und GPV. Alle Polypeptide gehören zu der Familie der Leucin-reichen Proteinen. GPIb ist ein Heterodimer bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit. Verbunden sind diese durch Disulfidbrücken. Über nonkovalente Bindungen sind beide Untereinheiten auch mit GPIX und GPV verbunden. Nur für GPIba ist bekannt, dass dieses Liganden binden kann.[39, 40]

Die klinische Bedeutung des vWF-Rezeptorkomplexes zeigt sich im Bernard-Soulier Syndrom. Dies ist eine sehr seltene hereditäre Thrombozytopathie mit autosomal-rezessivem Erbgang. Es wurde festgestellt, dass die Ursache ein Fehlen des GPIb Proteins ist, woraus eine Makrothrombozytopenie mit Funktionsstörung der Thrombozytenadhäsion folgt. Symptomatisch zeigt sich dies in einer hämorrhagischen Diathese mit Purpura und erhöhter Hämatomneigung.[38, 41]

GPIb α bindet den vWF nach dessen Immobilisation im Subendothelium und bei gleichzeitig vorhandener erhöhter Scherrate des Blutflusses.[42, 43] Diese Bindung aktiviert die Thrombozyten und führt zu deren Aggregation.[44] Die bindende Domäne von GPIb α weist am 300 Aminosäuren großen NH₂ Ende 7 Leucin-reiche Wiederholungen auf. Diese Region wird durch eine Mucin-reiche Region, genannt Makroglykopeptid, mit dem Thrombozyten verbunden. Darunter befindet sich eine Transmembran-Domäne, innerhalb der Zellmembran dann eine ca. 100 Aminosäuren große zytoplasmatische Region. Diese vermittelt die Verbindung zum Zytoskelett und zu den Signalproteinen.[45]

GPIb α bindet neben dem vWF auch weitere Proteine, wie Thrombin, P-Selectin, die Faktoren XI und XII, sowie Hochmolekulares Kininogen.[38, 46-48] Die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten wird unter anderem von GPIb α und dem auf Leukozyten vorkommenden β_2 Integrin Mac-1 vermittelt.[149] Dies ist für Neutrophile Granulozyten und Monozyten bekannt und im Kapitel 1.4 ausführlich beschrieben.[56]

1.2.2 Die Rolle von Thrombozyten in der Pathogenese der Atherosklerose

Die Rolle von Thrombozyten in der Atherosklerose wird schon seit den 1960er Jahren beforscht und ist durch viele Belege bestätigt.[49] Die Thrombozyten nehmen hier eine Schlüsselrolle nicht nur in späten Komplikationen der Atherosklerose, sondern auch in der Initialphase der Erkrankung ein. Sie interagieren hierbei mit anderen Thrombozyten, dem Endothel und Leukozyten.[49]

Im Fall einer Gefäßverletzung werden extrazelluläre Proteine, wie z.B. der vWF oder Kollagen freigelegt. Thrombozyten adhären anschließend mit dem Glykoprotein Ib/IX/V (GPIb/IX/V) an den vWF.[34, 36] Dies führt zur Aktivierung der Thrombozyten und zu einer festen Verbindung mit der Extrazellulärmatrix.[50] Die Integrine erfahren eine Konformationsveränderung und so kann der Fibrinogenrezeptor $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ an Fibrinogen binden und der Kollagenrezeptor $\alpha_{II}\beta_1$ an Kollagen. Es kommt zu einer festen Bindung zwischen Thrombozyten und dem freiliegenden Gewebe. Dies hat zur Folge, dass die Thrombozyten sich über dem Bereich der Gefäßverletzung ausbreiten können und sich die Thrombozyten untereinander mittels des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ fest verbinden können. Somit kann eine mögliche Blutung durch eine Verlegung des Defektes und eine Thrombusbildung gestillt werden.[36]

Eine Gefäßverletzung ist nicht die einzige Bedingung unter der Thrombozyten an das Endothel adhären. Es konnte gezeigt werden, dass auch schon die alleinige Aktivierung des intakten Endothels ausreicht, damit Thrombozyten dort adhären können.[51-53] Hierbei sind der GPIIb/IIIa-Rezeptor, Fibrinogen, Fibronectin, der vWF, aber auch der Rezeptor ICAM-1, das Integrin $\alpha_V\beta_3$ und der GPIb/IX/V Rezeptorkomplex beteiligt.[52] Die meisten Studien zeigten in vitro, dass diese Prozesse von statten gehen. Jedoch gibt es auch in vivo Studien, in welchen die Methode der Intravitalmikroskopie verwendet wurde, die bestätigten, dass Thrombozyten nicht nur in vitro, sondern auch unter arteriellen Flussbedingungen an das Endothel adhären.[54, 55]

Die Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel, oder an die freiliegende extrazelluläre Matrix, ist ein Prozess aus mehreren Schritten. Zuerst kommt es zu einer lockeren Anlagerung der Thrombozyten, danach zu einem Entlang-„Rollen“

und schließlich zur festen Adhäsion. Das Rollen wird von P-Selektin oder E-Selektin, welche auf den Endothelzellen exprimiert werden, vermittelt.[54] Als Ligand auf den Thrombozyten dient hier einerseits der GPIb/IX/V Rezeptorkomplex. Im Speziellen vermittelt der GPIIb α -Rezeptor die Adhäsion von Thrombozyten an aktivierte Endothelzellen und an das Subendothelium.[56] Unter hohen Scherkräften konnte andererseits das Glykoprotein PSGL-1 als Ligand für P-Selektin identifiziert werden.[57] Diese Interaktionen zwischen Thrombozyten und Endothelzellen sind jedoch nur von kurzer Dauer und reversibel. Für eine feste Adhäsion benötigt es auch hier andere Mechanismen, welche unter dynamischen, arteriellen Flussbedingungen noch nicht eindeutig aufgeklärt sind. Hinweise mehrten sich, dass die thrombozytenständigen β_3 -Integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_V\beta_3$ für die feste Adhäsion zwischen Thrombozyten und dem intakten, aber aktivierten Endothel zuständig sind.[58]

Während dieser Prozesse werden die Thrombozyten aktiviert. Sie sezernieren dann Adhäsionsproteine, wie z.B. Fibrinogen, Fibronectin, vWF, P-Selectin, GPIIb/IIIa, Wachstumsfaktoren, wie z.B. Transformierender Wachstumsfaktor α (TGF- α), Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Chemokine wie z.B. Platelet factor 4 (PF-4, CXC4), Gerinnungsfaktoren, wie z.B. Protein S, Faktor V/XI, aber auch pro-inflammatorischen Zytokine wie IL1 β , sCD40L und CCL5. Hiermit wirken Thrombozyten auf die Endothelzellen, aber auch auf Leukozyten und andere Thrombozyten.[36, 59] Beispielsweise bewirkt IL-1 β eine Aktivierung der Endothelzellen, aber auch die erhöhte Expression von Adhäsionsproteinen, wie z.B. ICAM-1 oder $\alpha_V\beta_3$ auf den Endothelzellen.[60, 61] Auch die Ausschüttung des Monocyte-chemoattractant-Protein-1 wird IL1 β abhängig verstärkt, worauf dann eine erhöhte Monozytenrekrutierung folgt.[60, 62] Die Ausschüttung von CXCL4 (PF4) und CCL5 führt ebenfalls zu einer verstärkten Adhäsion und Infiltration von Monozyten.[59, 63]

Die Atherosklerose ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung. Die Rekrutierung von Leukozyten an die Stelle einer Gefäßverletzung und die Vermittlung der Adhäsion ist eine entscheidende Verbindung zwischen der Atherosklerose und dem stattfindenden entzündlichen Prozess.

Diese Rekrutierung von Leukozyten ist eine der wichtigsten Aufgaben der Thrombozyten in Bereichen von Verletzungen und Entzündungen.[36, 64, 65] Sobald Thrombozyten z.B. nach einer Gefäßverletzung an der Gefäßwand adhären bieten sie eine „klebrige Oberfläche“ um Leukozyten an die Gefäßwand zu rekrutieren. Dies konnte in vitro, aber auch unter Strömungsbedingungen in vivo gezeigt werden.[36, 51, 52, 54] Ähnlich wie die Rekrutierung von Thrombozyten an die Gefäßwand erfolgt die Rekrutierung von Leukozyten an die Gefäßwand in mehreren Schritten. Der erste Schritt ist die lockere Anhaftung der Leukozyten an die Thrombozyten. Dies geschieht mittels einer Verbindung aus P-Selektin (auf Thrombozyten) und PSGL-1 (auf Leukozyten).[36, 66] Anschließend kommt es zu einer festen Adhäsion durch die Bindung des Leukozytenrezeptors Mac-1 (CD11b/CD18, $\alpha_M\beta_2$). Liganden für Mac-1 auf den Thrombozyten sind der GPIIb/IIIa Rezeptor[39], JAM-3/C[35, 67], ICAM1[68], oder ICAM2[69]. Die Verbindung zwischen Thrombozyten und Leukozyt initiiert dann eine Kaskade der Inflammation.[36, 70]

Für verschiedene Leukozyten ist die Interaktion mit Thrombozyten bekannt. Thrombozyten kommunizieren mit neutrophilen Granulozyten über Mac-1 und GPIIb/IIIa [39], über die P-Selektin/PSGL-1-Bindung oder über ICAM1/2[67, 68]. Mit Monozyten treten sie ebenfalls über die genannten Rezeptorpaare in Verbindung. Thrombozyten interagieren auch mit Dendritischen Zellen (DCs), dies wird im Kapitel 1.4 in Ausführlichkeit behandelt. Die Interaktion von Thrombozyten mit T-Zellen, B-Zellen und Natürliche-Killer-Zellen bewirkt auch deren Rekrutierung und Aktivierung.[71]

Die Interaktion zwischen Monozyten und Thrombozyten führt zu Prozessen, die die Inflammation verstärken. In einem ersten Schritt kommt es zu einer erhöhten Anzahl an zirkulierenden Monozyten mit einem veränderten Phänotyp, welcher die Entzündung verstärkt. Diese Monozyten besitzen eine erhöhte Affinität an das aktivierte Endothel zu adhären.[72, 73] Aber es gibt auch Belege, dass Thrombozyten eine antiinflammatorische Wirkung auf Monozyten haben. Dies zeigt, dass der Effekt von Thrombozyten auf Monozyten kontextabhängig ist.[72, 74]

Auch die Progression der Atherosklerose wird von Thrombozyten beeinflusst. So beschleunigen Thrombozyten die Lipidaufnahme, sowie die Schwammzellformation, indem sie die Cholesterinaufnahme in Monozyten verstärken.[75] Eine systemische Thrombozytenaktivierung steht in Menschen mit der Koronaren Herzkrankheit[76] und auch mit der Karotisstenose[77] in Verbindung.[49] Weiter wurde beschrieben, dass die Aktivierung von Thrombozyten mit einer Verdickung der menschlichen Karotis einhergeht. [49, 77]

In fortgeschrittenen Stadien der Atherogenese bilden sich auf einen hypoxischen Reiz hin Vasa vasorum aus. Diese ziehen von der Adventitia in Richtung Intima. Hierbei ist bekannt, dass Thrombozyten die Angiogenese fördern.[78] Erythrozyten, welche Hämoglobin und Eisen abgeben, Leukozyten, die Tissue factor produzieren und aktivierte Thrombozyten können Mechanismen initiieren, die in einer Ruptur der Plaque enden. Die Ruptur einer Plaque bei gleichzeitiger dünner fibröser Kappe ist die Ursache von Komplikationen wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall. [78-80]

1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) wurden erstmals von Paul Langerhans im Jahre 1868 beschrieben. Dies verleiht den in der Haut befindlichen DCs auch den Namen „Langerhans-Zellen“. Steinman und Cohn konnten die DCs 1973 als antigenpräsentierende Zellen identifizieren, wofür Steinman im Jahre 2011 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin erhielt.[81, 82] DCs stellen in allen Geweben eine kleine Population dar, jedoch sind sie die potentesten antigenpräsentierenden Zellen im menschlichen Körper.[83, 84] Sie sind das Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem.[81, 85]

DCs vermitteln auf der einen Seite Immunität, in dem sie als antigenpräsentierende Zellen fungieren und nach ihrer Aktivierung auch als stimulierende Zellen T- und B-Zellen aktivieren. Andererseits sind DCs auch für die Vermeidung von Autoimmunreaktionen im Körper zuständig, indem sie autoreaktive T-Zellen eliminieren und somit dem Immunsystem die nötige Toleranz für Autoantigene verleihen.[86]

DCs gehören, genauso wie Makrophagen, zur myeloischen Zellreihe.[87] Sie entstehen aus einer gemeinsamen $CD34^+$ Stammzelle im Knochenmark. Des Weiteren können sich DCs auch aus zirkulierenden oder ortsständigen Monozyten proliferieren. In ihrer Entwicklung durchlaufen sie drei Stadien: Vorläufer-DCs, unreife DCs und reife DCs. Vorläufer-DCs zirkulieren mit dem Blutstrom und werden dann gewebsständig. Dort warten sie auf potentielle Antigene, welche sie dann aufnehmen können. Hauptsächlich kommen die DCs in diesem Stadium entlang von Epithelien oder Körperhöhlen vor.[84, 88-93] Auf verschiedene Art und Weisen können sie hier Informationen über mögliche pathogene Antigene sammeln: Sie nutzen Phagozytose, Rezeptor-vermittelte Endozytose, direkten Kontakt zu nekrotischen oder apoptotischen Zellen, viral infizierte Zellen oder andere. Nach der Internalisierung dieser Fragmente werden diese über MHC I oder II auf der Zelloberfläche präsentiert. Unreife DCs haben eine typische sternförmige Gestalt mit bis zu $10\mu\text{m}$ langen Zytoplasma-Fortsätzen (Dendriten), welche die Oberfläche der Zelle vergrößern, beweglich sind und somit Antigene aufnehmen können.[84, 88-93]

DCs gehören zu beiden Teilen des Immunsystems. Als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem können sie mit Zytokinen auf bedrohliche Eindringlinge reagieren. Sie besitzen die Fähigkeit das angeborene Immunsystem auf eine spezielle Gefahr hin auszurichten. Nach der Aufnahme des Antigenes und mit Hinzukommen eines sekundären Signals, z.B. über Toll-like-Rezeptoren (TLR), regulieren DCs Chemokinrezeptoren wie CCR7 hoch und migrieren in lymphatische Gewebe wie z.B. Lymphknoten oder die Milz. Dort unterlaufen die bisher unreifen DCs einer vollständigen Reifung. DCs können jedoch auch im peripheren Gewebe reifen oder direkt mit T-Zellen kommunizieren. Während der Reifung wird die Endozytose von anderen Antigenen heruntergefahren und es werden Moleküle, die für die Adhäsion und die Präsentation von Antigenen zuständig sind, vermehrt auf der Oberfläche exprimiert. Im Zuge dieser Reifung werden auch Moleküle, die der T-Zell Stimulierung dienen, vermehrt exprimiert. Hierzu gehören CD80/B7-1, CD83 und CD86/B7-2 Moleküle, das sind die sogenannten B7-Moleküle. Mittels Signalen über Toll-like-Rezeptoren, C-Typ Lektin Rezeptoren oder Fc- und MHC-Rezeptoren werden die Antigene verarbeitet und schlussendlich T-Zellen präsentiert.[82, 84, 88-95]

DCs haben als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs) die enorme Fähigkeit native, Gedächtnis-, und Effektor-T-Zellen zu stimulieren. Sie können auch Natürliche-Killer-T-Zellen aktivieren. Sie präsentieren verschiedene exogene und endogene Antigene über den Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I und II (MHC I/II) an T-Lymphozyten um einen auf das Antigen passenden T-Lymphozyten zu finden. Dieser Prozess wurde in der Haut beschrieben, es wird aber angenommen, dass dies auch in anderen Geweben stattfindet.[82, 84, 88-93, 96] DCs und T-Zellen können auch einen direkten Zell-Zell Kontakt bilden. Diese Interaktion und die Anwesenheit von co-stimulatorischen Faktoren ist Voraussetzung für die T-Zell Aktivierung und die folgende Differenzierung zu Effektorzellen. Ohne Co-Stimulation unterliegen die T-Zellen, die im Kontakt mit DCs stehen, der Apoptose oder einer fehlerhaften Reaktion. Die Differenzierung von T-Helferzellen hin zu Effektorzellen wird nach dem DC/T-Zell Kontakt von Zytokinen, insbesondere IL-12, ausgelöst.[84, 88-93]

Dendritische Zellen sind an vielen Prozessen beteiligt. Sie verteidigen den Körper gegen Pathogene oder maligne Vorgänge und werden für eine adäquate Toleranz der körpereigenen Bestandteile und bei der Verhinderung einer Autoimmunreaktion benötigt.[97] Es wird immer deutlicher, dass DCs eine große Bedeutung in vielen Erkrankungen haben. Hierzu zählen virale oder bakterielle Infektionen, Autoimmun- und sogar Tumorerkrankungen. Die Erforschung der Physiologie und Pathophysiologie der DCs wurde in letzter Zeit immer wichtiger. Daraus folgte eine immer größer werdende klinische Bedeutung in der Therapie von Erkrankungen durch die Beeinflussung von DCs.[83, 88, 89, 98]

1.3.1 Das Integrin Mac-1

Das Makrophagen Integrin 1 (Mac-1) wurde erstmals 1990 von Arnaout et al. strukturell und funktionell beschrieben.[99] Dieser Oberflächenrezeptor ist unter verschiedenen Bezeichnungen bekannt: Complement receptor typ 3 (CR3), CD11b/CD18, Mo1, $\alpha_M\beta_2$ und Mac-1.

Mac-1 ist auf verschiedenen Leukozyten exprimiert. Hierzu zählen Monozyten, Makrophagen, Neutrophile Granulozyten, Natürliche Killerzellen oder Dendritische Zellen.

Mac-1 ist ein heterodimerisches Glykoprotein (GP165,95). Der Rezeptor gehört zu den Integrinen, welche als eine große Familie von Oberflächenrezeptoren für die Adhäsion und Migration von Zellen zuständig sind. Es gibt 3 β -Integrin Familien (β_1 , β_2 , β_3). Zu der β_2 -Integrin Familie gehören die Rezeptoren LFA-1 (CD11a/CD18), p150,95 ($\alpha_X\beta_2$, CD11c/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18). Als Heterodimere bestehen diese Integrine aus einer α -(CD11a,b,c) und einer β -Untereinheit (CD18).[100, 101]

Die Möglichkeit der Bindung des Proteins C war die erste Funktion, die Mac-1 zugeschrieben wurde. Deshalb wurde dem Integrin auch der Name „Complement receptor typ 3“ gegeben.[102] Mac-1 ist für die Aggregation von Leukozyten, die Adhäsion an andere Zellen oder Oberflächen oder für die Bindung von verschiedenen Proteinen zuständig.[39, 102-104]

Als Liganden von Mac-1 sind endotheliale Rezeptoren, wie z.B., ICAM-1, Oberflächenrezeptoren wie z.B. GPIIb[39], Jam-3/JAM-C[35, 67], Proteine der extrazellulären Matrix, wie z.B. Fibrinogen (an GPIIb-IIIa gebunden) oder Glycosaminoglykane bekannt.[39, 69, 104]

Für die Bindung von einigen Liganden von Mac-1 ist die sogenannte I-Domäne in der α_M Untereinheit von CD11b zuständig.[105, 106] Die α_M Untereinheit von CD11b enthält eine I-Domäne (inserted = dt. eingefügt). Diese besteht aus ungefähr 200 Aminosäuren und bindet Liganden.[105] Sie ist ähnlich der A1 Domäne des vWF, welche vom GPIb-IX-V Komplex gebunden wird.[107, 108] Für die Bindung von GPIIb konnten Simon et al. eine sogenannte M2 Sequenz innerhalb der I-Domäne von Mac-1 identifizieren.[109] Es konnte gezeigt werden, dass die M2 Sequenz ein spezifischer Rezeptor für GPIIb ist.[110] Ausführlich ist dies in Kapitel 1.4 beschrieben.

Mac-1 exprimiert neben der I-Domäne auch eine Lektin-ähnliche Domäne, die verschiedenen Liganden, wie z.B. komplexe Polysaccharide wie β -Glucan bindet. Diese Lektin-ähnliche Domäne ist für die Erkennung und Phagozytose verschiedener Antigene zuständig, jedoch sind auch verschiedene andere Funktionen, wie die Interaktion mit anderen Rezeptoren bekannt.[111] Auch gibt es Hinweise, dass eine Bindung eines Liganden über die Lektin-ähnliche Domäne zu einer Konformationsänderung und somit zu einer Vorbereitung oder Aktivierung der I-Domäne führen kann. Die Bindung von β_2 Integrinen führt nicht nur zur Aggregation oder Adhäsion von Leukozyten, sondern auch zu einem „Outside-in“ Signal innerhalb der gebundenen Zellen. Es kommt zur Aktivierung der Leukozyten, was ihre inflammatorische Funktion verstärkt. Weiter führt dieses Signal zur Induktion von Genen, die z.B. für IL-1 β , TNF- α oder für den Tissue factor codieren.[112, 113] Über die Assoziation von Mac-1 mit IRAK1 (IL-1 receptor-associated Kinase), TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) und TAK1 (TGF- β activated kinase) führt eine Bindung zur Verstärkung der NF κ B-Aktivität.[114] Die Differenzierung von Monozyten wird durch die Bindung von Mac-1 und die folgende Beeinflussung des Transkriptionsfaktors Foxp1 gesteuert.[115]

1.3.2 Die Rolle von Dendritischen Zellen in der Pathogenese der Atherosklerose

Die Funktion der DCs in der Atherosklerose ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt widersprüchliche Daten, ob DCs die Progression der Erkrankung verstärken oder diese verhindern.[116-118] Schon lange ist bekannt, dass Makrophagen und auch Monozyten eine essentielle Bedeutung in der Atherosklerose haben.[119] Dendritische Zellen sind eng mit diesen beiden Zellarten verwandt. Aktuelle Untersuchungen führen zu der Annahme, dass DCs eine ähnlich wichtige Stellung in der Pathogenese haben.[84]

Das Vorkommen von DCs in der gesunden Aorta wurde 1995 erstmals beschrieben.[82, 120] In gesunden Gefäßabschnitten findet man eine kleine Anzahl an DCs vor allem im subendothelialen Bereich des Gefäßes und in noch kleinerer Anzahl in der Adventitia.[84, 121] Es wird vermutet, dass DCs dort dem Gefäßassoziierten lymphatischen Gewebe (VALT) angehören. Dies ist eine Gruppe aus verschiedenen Immunzellen, die ihre Umgebung nach potentiellen pathogenen Antigenen scannen.[84, 122] An Stellen des Gefäßsystems, welche für die Atherosklerose prädisponiert sind, wie z.B. der Aortenbogen, Abzweigungen oder Gefäßwölbungen, findet man schon in der Frühphase der Atherosklerose DCs.[49, 123] Hier bilden sie sogenannte Zellcluster aus.[124] Vergleicht man dies mit Bereichen, die gegen die Atherosklerose eher resistent sind, ist die Anzahl in den anfälligen Bereichen deutlich erhöht.[84] Die Anzahl der DCs in der Aorta ist in der Anfangsphase der Atherosklerose eher gering. Jedoch steigt diese enorm an, sobald die Erkrankung fortschreitet.[82, 125] DCs wurden bereits bei Kindern im Alter von 8 Wochen bis zu 10 Jahren in der Intima der Karotiden entdeckt.[84, 126] Neben der Proliferation ortsständiger Zellen scheint auch die Rekrutierung dendritischer Zellen in der Atherosklerose bedeutsam zu sein.[49, 127] Bei einer Gefäßverletzung werden die Endothelzellen, die die Gefäßwand auskleiden, in Mitleidenschaft gezogen. Thrombozyten und Fibrin lagern sich dort an, um die Blutung zu unterbinden und den Heilungsprozess zu initiieren. Auch die Immunabwehr ist in solch einem Fall sehr wichtig, deshalb kommt es anschließend es zu einer Rekrutierung von Leukozyten auf welche die Infiltration der Gefäßwand folgt.[39]

Leukozyten zirkulieren unter normalen Bedingungen durch Blutgefäße und lymphatische Gewebe. Bei Verletzungen oder Entzündungen infiltrieren sie diese Gewebe. Dieser Prozess wird von der Interaktion von Integrinen mit den jeweiligen Liganden vermittelt. Beeinflusst wird dieser Prozess von verschiedenen Zytokinen. Die DCs binden über Oberflächenrezeptoren an E- und P-Selektin, welches sich an der Oberfläche von Endothelzellen befindet.[128] Nach der Interaktion mit dem Endothel beginnen DCs sich unter atherosklerotischen Bedingungen vermehrt in der Gefäßwand anzusammeln.[82] Verschiedene vom Endothel ausgehende, proatherogene Stimuli verstärken diesen Prozess, sodass sich im Laufe der Erkrankung mehr DCs in der Gefäßwand akkumulieren.[129] Auch die Rekrutierung der DCs über sich anlagernde Thrombozyten stellt einen wichtigen Weg der DCs in den Bereich der Atherosklerose dar. Dies ist in Kapitel 1.4 ausführlich beschrieben. Bei Versuchen, in denen das Integrin Mac-1 blockiert oder deletiert wurde, fiel eine stark gehemmte Infiltration der Immunzellen in entzündete Gewebe auf, was zu einer gestörten Funktion in der Bekämpfung des pathogenen Vorgangs führte. Dies lässt auf die Wichtigkeit von Mac-1 im angeborenen Immunsystem schließen.[100, 130]

Die Verantwortung von Lipidaufnahme, die Schwammzellformation und auch das Plaqueswachstum wurde bisher hauptsächlich den Makrophagen zugeschrieben. Jedoch zeigen neuere Studien immer deutlicher, dass DCs ebenfalls Lipide aufnehmen und zur Initiation und Progression der Atherosklerose beitragen.[82, 131] Vermutet wird sogar, dass zuerst die DCs und erst dann lipidspeichernde Makrophagen am Initiierungsprozess der Atherosklerose beteiligt sind.[84] DCs beeinflussen höchstwahrscheinlich nicht nur die Anfangsphase der Atherosklerose sondern auch die vulnerable Plaque.[35, 132]

Die Anzahl an im Blut zirkulierenden DCs in Patienten mit einer KHK, stabiler oder instabiler Angina pectoris, sowie in Patienten mit einem Myokardinfarkt ist verringert, da diese nach ihrer Aktivierung in die Lymphknoten oder in atherosklerotische Plaques migrieren. Dort ist die Anzahl der DCs erhöht.[49, 133-136] Auch innerhalb der klinischen Progression der Erkrankung ist das Vorkommen von DCs unterschiedlich. Patienten, die an den Symptomen der Atherosklerose

leiden, zeigen in einer Karotisplaque eine höhere Anzahl an DCs, als Patienten, die (noch) keine Symptome zeigen.[137]

In der für Atherosklerose prädislozierten Stelle des Aortenbogens oder Orte mit verwirbelter Blutströmung kommen DCs gehäuft vor schon bevor die Erkrankung sichtbar ist.[49, 123] Im Verlauf der Erkrankung akkumulieren sich DCs vor allem in der verletzbaren Plaqueschulter. Dort sind bis zu 90% der Dendritischen Zellen innerhalb der Plaque zu finden.[49, 82, 84, 127, 136, 137]

Die Anzahl der DCs nimmt im Verlauf der Atherosklerose weiter zu. Dies geschieht einerseits durch Proliferation ortsständiger DCs und andererseits durch weitere Rekrutierung der DCs in den Bereich der Läsion durch die Leukozyten selbst oder durch Thrombozyten. Weiter scheint es den DCs auch nicht möglich aus der Plaque wieder hinaus zu wandern.[49, 82, 84, 127, 136, 137]

Durch vielfache Weise sind DCs in der Lage die Atherosklerose zu beeinflussen. Studien zeigten, dass sie den Cholesterinhaushalt modulieren können. Die Depletion von CD11c-positiven DCs bewirkte eine erhöhte Cholesterinämie.[82, 117] Eine weitere Studie zeigt, dass nach einer kurzzeitigen Depletion von CD11c⁺ DCs die intimale Akkumulation von Lipiden und die Anzahl der Schaumzellen stark abnimmt und es zu einer großen subendothelialen, extrazellulären Akkumulation von Lipiden kommt.[131]

DCs können auch durch ihre Funktion als antigenpräsentierende Zellen zur Progression der Atherosklerose beitragen. Die Deletion von Molekülen, die bei der Antigenpräsentation und DC Migration beteiligt sind, führt zu einer Abnahme der Atherosklerose.[82, 138] Auch Mäusen, denen ein bestimmtes, mit MHC-II-Molekülen assoziiertes Protein fehlt (CD74) zeigen eine Reduktion der Atherosklerose.[82, 139] Weiter resultiert ein Verlust kostimulatorischer Moleküle wie CD80 oder CD86, die an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt sind, in einer Verringerung der Plaquesgröße.[82, 140] DCs induzieren an der Stelle der Gefäßverletzung die proinflammatorische Antwort des Immunsystems. Innerhalb der Progression der Atherosklerose kommen DCs in einer großen Variabilität innerhalb ihrer Subtypen vor. Dies könnte bedeuten, dass die DCs im Verlaufe der Pathogenese der Atherosklerose verschiedene Aufgaben innehaben.[141, 142]

DCs bilden Zytokine, wie IL-6, TNF α (Tumor Nekrose Faktor alpha) oder IL-12. Diese gelten als proatherogen.[82] Im Vergleich zu DCs im Ruhezustand schütten DCs von Patienten mit einer instabilen Angina pectoris höhere Level von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF α und Interleukin 1 β aus.[49, 143] DCs bilden auch Zytokine, die andere Leukozyten rekrutieren. Zum Beispiel wird CCL2 (Monozyten Chemokinligand 2) unter anderen von DCs gebildet und lockt dann Monozyten, Gedächtnis-T-Zellen und andere DCs in den Bereich der Entzündung an.[82, 144, 145]

Welche Aufgabe die DCs direkt innerhalb der atherosklerotischen Plaque erfüllen ist unklar, da es widersprüchliche Daten hierzu gibt.[117, 131, 146] Es wird beschrieben, dass DCs in der Adventitia aktiviert werden, was dann in einer Aktivierung von lokalen T-Zellen mündet. Hier kommt es dann zu einer lokalen Inflammation.[116] Dass DCs eine Autoimmunreaktion als Beginn der Atherosklerose induzieren, stellt eine weitere Möglichkeit dar.[147] Auf der anderen Seite wird aber auch ein atheroprotektiver Wirkmechanismus der DCs beschrieben. Sie exprimieren das antiapoptotische Gen hBCL2, sodass ihre Lebensspanne verlängert wird. In der Folge kommt es durch eine erhöhte T-Zell-Aktivierung und Ausschüttung von Zytokinen zu einer Läsionsprogression und einer Destabilisierung der Plaque.[117]

DCs tragen auch zu Mechanismen der Gefäßreparatur bei.[16, 35, 84] Hier gibt es widersprüchliche Studien, in denen DCs die Reparatur entweder fördern oder verhindern.[49, 148]

Auch die häufig mit der Atherosklerose einhergehenden Erkrankungen haben Einfluss auf das Verhalten der DCs. Atherosklerose und Diabetes sind eng miteinander verwandt. In Patienten mit Diabetes und gleichzeitigen atherosklerotischen Beschwerden konnten DCs gefunden werden, welche eine verschlechterte immunologische Antwort aufwiesen.[149] Zur Modifikation der Dyslipidämie sind Statine etablierte, pharmakologische Hauptsubstanzen in der Behandlung und Prävention von atherosklerotisch bedingten Erkrankungen. Sie führen zu einer Abnahme der Anzahl an DCs in atherosklerotischen Plaques. Dies weist weiter auf den proatherogenen Effekt der DCs hin.[49, 127]

1.4 Interaktion von Thrombozyten und Dendritischen Zellen in der Atherosklerose

In der Atherogenese stellen Thrombozyten und auch Dendritische Zellen(DCs) wichtige Zellpopulationen dar.[35, 36, 49, 82, 84, 123, 127, 132, 136, 137] Die Interaktion speziell dieser beiden Zellarten ist noch nicht abschließend untersucht.

Schon 1961 wurde vermutet, dass phagozytierte Thrombozyten der Ursprung der Lipide in atherosklerotischen Plaques und Thromben sein könnten.[150] Erst 40 Jahre später konnte gezeigt werden, dass die Phagozytose von Thrombozyten durch Makrophagen in einer atherosklerotischen Plaque stattfindet. Dies führt zur Aktivierung der Makrophagen und trägt zur Schwammzellbildung bei.[151] Weiter konnte gezeigt werden, dass nicht nur Makrophagen Thrombozyten internalisieren, sondern auch Dendritische Zellen. Voraussetzung hierfür ist, dass DCs im Bereich einer sich entwickelnden oder auch schon statthaften Atherosklerose mit Thrombozyten in Kontakt kommen.[35, 49]

Das Zusammenspiel vaskulärer Zellen spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung einer Entzündung und der immunologischen Antwort auf einen Reiz, wie ihn z.B. eine Gefäßverletzung oder ein Antigen darstellt.[39] Im Rahmen einer Gefäßverletzung adhären Thrombozyten an diese Stelle und werden aktiviert. Aktivierte Thrombozyten interagieren dann mit zirkulierenden Leukozyten.[36, 37] Sie unterstützen die Extravasation der Leukozyten und die Gewebsinfiltration im Bereich einer Entzündung. Unter arteriellen Flussbedingungen sind Thrombozyten in vitro und in vivo Voraussetzung für die Adhäsion von DCs an eine verletzte Gefäßwand oder das darunterliegende Kollagen der subendothelialen Matrix.[35] Langer et al. konnten in vivo zeigen, dass DCs nicht an eine intakte Gefäßwand adhären. Nach einer Gefäßverletzung adhären DCs jedoch sehr schnell an diesen Bereich.[35] Auch alleine hohe Scherraten im Blutstrom könnten ein Auslöser für die Thrombozytenaktivierung sein, sodass diese DCs rekrutieren.[49, 152]

Die Rekrutierung von zirkulierenden Leukozyten an die Gefäßwand erfordert eine Reihe von geordneten Abläufen, die über Zell-Zell Kontakte und Zytokine gesteuert werden. Allgemein für die Rekrutierung von Leukozyten ist bekannt, dass eine P-Selektin(CD62P)/PSGL-1 vermittelte Anheftung mit anschließendem Rollen der Leukozyten an der Gefäßwand stattfindet.[37, 153, 154] Durch die anschließende Aktivierung der Leukozyten, die Integrin vermittelte feste Adhäsion und Diapedese kommt es zur Infiltration der Gefäßwand.[39, 155] Neben dem P-Selektin vermittelten Rollen der Leukozyten auf den Thrombozyten wurde auch das Rollen der Leukozyten an den Thrombozyten mittels GPIb[156] und GPIIb/IIIa beschrieben.[157]

Im speziellen Fall der Interaktion zwischen DCs und Thrombozyten konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten Pseudopodia ausbilden, um mit DCs zu interagieren, was darauf schließen lässt, dass es spezifische Rezeptoren für die Adhäsion geben muss.[35] Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion von DCs an eine verletzte Gefäßwand von Thrombozyten vermittelt wird.[35] Mehrere Oberflächenrezeptoren, die Interaktionspartner für Thrombozyten sein könnten, wurden von Langer et al. identifiziert. Beide Untergruppen des β_2 -Integrins Mac 1, CD11b (α_M -Untergruppe) und CD18 (β_2 -Untereinheit) waren stark exprimiert. Des Weiteren waren CD29 und CD162(PSGL-1) exprimiert.[35] Unter arteriellen Flussbedingungen, simuliert in einer parallelen Flusskammer, stellte sich heraus, dass die Adhäsion signifikant verringert war, wenn die DCs mit einem blockierenden Antikörper gegen CD11b vorbehandelt wurden. Dies gab den Hinweis, dass Mac-1 auf DCs eine wichtige Rolle in der Interaktion von DCs und Thrombozyten spielt.[35] Jam-C auf Thrombozyten und das Integrin Mac-1 auf DCs wurden als ein Interaktionspartnerpaar identifiziert, welches eine feste Adhäsion vermittelt.[35]

Zago et al. beschrieben, dass die Rekrutierung von Leukozyten an die Stelle einer Gefäßverletzung über das Glykoprotein GPIb α auf Thrombozyten und das β_2 -Integrin Mac-1 auf Leukozyten geschieht.[158] Simon et. al zeigten, dass GPIb α und Mac-1 ein Rezeptor-Ligandenpaar in Neutrophilen Granulozyten darstellt.[39] Auch für Monozyten ist dies bekannt.[39] Manche Integrine enthalten eine α -Untergruppe, die eine I-Domäne (I=inserted) enthält. Diese besteht aus

ungefähr 200 Aminosäuren und ist in die Bindung von Liganden eingebunden. Es ist aufgefallen, dass diese I-Domäne der A-Domäne des von-Willebrand-Faktors (vWF) sehr ähnlich ist. Der Bindungspartner der A-Domäne des vWF ist der GPIb-IX-V Komplex, welcher GPIb α enthält. Beginnend mit diesem Gedankengang konnten Simon et al. zeigen, dass GPIb α in Neutrophilen ein Bindungspartner von Mac-1 ist. Spezieller noch, dass die I-Domäne von Mac-1 die Interaktion mit GPIb α eingeht.[39] Weiter konnte gezeigt werden, dass die Sequenz P²⁰¹-K²¹⁷ der I-Domäne der α_M -Einheit von Mac-1 für die Bindung von GPIb α in Neutrophilen Granulozyten zuständig ist. Gegen diese M2-Sequenz wurde ein Antikörper entwickelt, der auch in dieser Arbeit verwendet wurde (Anti M2 Antikörper).[109] Studien in vitro zeigten, dass die Adhäsion von murinen und auch humanen Leukozyten an Thrombozyten nach Blockierung mittels des Anti M2 Antikörpers unter laminaren Flussbedingungen abnimmt.[110] Auch in vivo konnte gezeigt werden, dass nach einer Gefäßverletzung und nach spezifischer Blockierung von $\alpha_M\beta_2$ mit dem Anti M2 Antikörper die Anzahl der akkumulierten Leukozyten reduziert, sowie die Proliferation der Neointima verringert war.[110] Die Spezifität dieser M2 Sequenz für die Bindung von GPIb α konnte gezeigt werden.[110] Eine Studie in Mäusen mit Fehlen von Mac-1 (knockout) zeigte eine abgeschwächte Migration und Akkumulation von Leukozyten in der Arterienwand, sowie eine verringerte Neubildung der Intima.[158, 159] In einer Studie, in der Mac-1 mittels eines Anti CD11b (M1/70) Antikörpers blockiert wurde, konnte eine verringerte Leukozytenrekrutierung und eine verringerte Proliferation der Neointima festgestellt werden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung von Leukozyten über GPIb α und Mac-1 vonstattengeht.[158, 160] So könnte das Rezeptorpaar GPIb α und Mac-1 auch ein mögliches Interaktionspartnerpaar zwischen Thrombozyten und DCs darstellen.

Thrombozyten interagieren mit ihrer Umwelt durch direkten Zell-Zell-Kontakt, aber auch durch verschiedene Chemokine. Es gibt bereits einige Hinweise, dass Thrombozyten nicht nur in der Lage sind DCs zu rekrutieren, sondern auch diese in ihrer Funktion zu modulieren. Hagihara et al. zeigten, dass die von hohen Scherraten aktivierten Thrombozyten die Reifung der DCs durch sezerniertes IL-10 induzieren.[152] Auch durch Hitzeschockproteine könnten Thrombozyten DCs

aktivieren.[147] Sie sezernieren unter anderem den Plättchenfaktor 4, welcher die Fähigkeit besitzt den Reifegrad der DCs zu modulieren.[161] Das von Thrombozyten sezernierte CD40L wirkt auch auf DCs, die dann eine verstärkte Proliferation von Lymphozyten anregen.[35] Aber auch der direkte Kontakt zwischen Thrombozyten und DCs moduliert deren Funktionalität. Die Inhibition der Interaktion von Thrombozyten und DCs über Jam-C und Mac-1 führt zu einer verringerten Apoptose der DCs.[35] Dies lässt darauf schließen, dass der direkte Kontakt von Thrombozyten und DCs auch deren Zellfunktion modifiziert. Auch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen von DCs, wie IL-10, IL-12 und TNF α , wird von Thrombozyten beeinflusst.[49, 152, 162] Die Interaktion zwischen Thrombozyten und DCs über einen direkten Zell-Zell-Kontakt induziert andere Effekte, als eine Kommunikation über beispielsweise von Thrombozyten sezernierte, gelöste Zytokine. Dies ist ein Hinweis, dass Thrombozyten die Aktivität von DCs auch kontextabhängig unterschiedlich beeinflussen können.[72, 163]

Dendritische Zellen haben auch Anteil an den Reparaturmechanismen nach einer Gefäßverletzung. Eine Inhibition der Mac-1/GPIIb α -Interaktion führt zu einer abnehmenden Zellproliferation mit der Folge einer verringerten Bildung der Neointima des Gefäßes.[158]

Dendritische Zellen phagozytieren, nach deren Rekrutierung und Aktivierung, aktivierte Thrombozyten. Dies könnte die Immunantwort und die Atherogenese beeinflussen.[35, 82] Im Verlauf unterliegen die DCs der Apoptose, was Einfluss auf die Plaquestabilität haben kann.[35, 164] So gibt es Hinweise, dass die Interaktion zwischen Thrombozyten, Dendritischen Zellen und anderen Leukozyten zur Instabilität der Plaquestruktur mit gravierenden Folgen führen kann.[135]

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die große Bedeutung von Thrombozyten in der Pathogenese der Atherosklerose ist schon lange bekannt und unwidersprechlich. Es wird aber immer deutlicher, dass Dendritische Zellen auch eine große Rolle hierbei spielen. Um einen Beitrag zum Verständnis der Pathogenese der Atherosklerose und genauer der Rolle der Interaktion von Thrombozyten und Dendritischen Zellen zu leisten wurde diese Arbeit konzipiert. Wie in den Vorkapiteln, insbesondere unter 1.4, beschrieben bestehen bereits Hinweise und Belege wie Dendritische Zellen an den Ort der Atherosklerose rekrutiert werden. In vivo konnte gezeigt werden, dass Dendritische Zellen (DCs) mit Thrombozyten im Bereich einer Gefäßverletzung über Mac-1 und Jam-C interagieren. Jam-C ist jedoch nicht auf murinen Thrombozyten exprimiert, was auf einen alternativen Interaktionsmechanismus hinweist. Für andere Leukozyten ist eine Interaktion mit Thrombozyten über das Rezeptor-Liganden-Paar GPIIb/IIIa/Mac-1 bekannt. So wurde die Hypothese aufgestellt, dass DCs und Thrombozyten über das Integrin Mac-1 auf DCs und das Glykoprotein GPIIb/IIIa auf Thrombozyten als Rezeptor-Liganden-Paar eine feste Bindung eingehen. Dieser Fragestellung soll in dieser Arbeit in vitro und in vivo nachgegangen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Software

Tabelle 1. Geräte, Software

Geräte/Software	Hersteller
Bildschirm neovo X15A	AG Associated Industries, China
Brutschrank CO ₂ Inkubator MCO-18 AIC	Sanyo, Gunma-Ken, Japan
Endnote X7 Bld 8818	Thomson Reuters, New York, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäß-Ständer	Brand, Wertheim
Falconständer	Brand, Wertheim
Feinwaage ED6202S	Sartorius, Göttingen
Image J 1.47v	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Isofluranvernebler Isotec 4	Ohmeda, GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom
Lampe Fluo Arc	Carl Zeiss, Jena
Lichtmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Magnetrührer IKAMAG RCT basic	IKA Werke, Staufen
Mikroskop Apoptom Observer.Z1 (Software Axio Vision V4.8.2.0)	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Diaphot	Nikon, Tokio, Japan

Mikroskop Lampe HAL 100	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Lampe HBO 100	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Stemi 200-C	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Zeiss	Carl Zeiss, Jena
Objektiv Achroplan 10x	Carl Zeiss, Jena
Objektiv Achroplan 20x	Carl Zeiss, Jena
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl a.R.
Pipettierhilfe Accu Jet pro	Brand, Wertheim
Sterilbank HERAsafe	Heraeus, Hanau
Videorekorder Datavideo VDR 3000	Datavideo Technologies Co., Utrecht, Niederlande
Vortex Schüttler	IKA Werke, Staufen
Wärmeunterlage Thermolux	Witte+Sutor GmbH, Murrhardt
Zellzählautomat KX-21N	Sysmex, Kobe, Japan
Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Multifuge 3S+	Heraeus, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
6-well Platte Tissue Culture Plate	Becton Dickinson, Heidelberg
96-well Platte Tissue Culture Plate	Becton Dickinson, Heidelberg
Augen- und Nasensalbe Bepanthen®	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
CChip Neubauer improved Zählkammer	Biochrom, Merck Millipore, Darmstadt
CD-Rohlinge	Lyreco, Marly, Frankreich
Einmalhandschuhe steril Biogel Skinsense	Mölnycke Health Care, Düsseldorf
Einmalskalpell	Feather Safety Razor Co., Osaka
Einmalspritzen	B. Braun Melsungen AG
Enthaarungscreme	z.B. DM Balea Enthaarungscreme
Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2,0ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Becton Dickson, Heidelberg
Glaskapillare 100µl N-Heparin, einmal	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Glaspipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Costar, Bodenheim
Isofluran CP	CP Pharma, Burgdorf
Kanüle Sterican® Gr. 18 – G 26 x 1" / Ø 0,45 x 25 mm – braun	B. Braun Melsungen AG

Kanüle Sterican® Gr. 20 – G 27 x 3/4“ / Ø 0,40 x 20 mm – grau	B. Braun Melsungen AG
Leukoplast Pflaster	BSN medical GmbH, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Polystyrene Round-Bottom(PRB) Tubes 5ml	Becton Dickson, Heidelberg
Sauerstoff O ₂	Linde Group, Oberschleißheim
Softasept Desinfektionsmittel	B. Braun Melsungen AG
Sterilfilter für Falcon, Striflip-GP Filter 0,22µm	Merck Millipore, Darmstadt
Sterilfilter Millex-GP für Spritze Sy- ringe Driven Filter 0,22µm	Merck Millipore, Darmstadt

2.1.3 Lösungen, Medien, Reagenzien, Proteine

Tabelle 3. Lösungen, Medien, Reagenzien, Proteine

Material	Hersteller
Ammoniumchlorid	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
BSA Lösung, Bovine Serum Albumine	PAA Laboratories GmbH, Pasching
DCF (=Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fentanyl	CuraMed/Pharma GmbH
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
HEPES Buffer 1 M	Sigma Aldrich, St. Louis
Medetomidine (= Medetomidin)	Pfizer Inc., New York, USA
mGMCSF, Recombinant Murine GM-CSF	Peptotech, Rocky Hill, USA
Midazolam	Ratiopharm, Ulm
NaCl 0,9 % Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Penicillin/Streptomycin (100x) Pen/Strep	PAA Laboratories GmbH, Pasching
RPMI-Medium 1640 (1x)	Gibco, Grand Island
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München

2.1.3.1 DC-Medium

500ml RPMI-Medium wurden unter der Sterilbank 50ml FCS, 5ml HEPES, 5ml Pen/Strep und 18µl β-Mercaptoethanol zugesetzt. Das DC-Medium wurde bei 4°C aufbewahrt.

2.1.3.2 ACD Puffer

Es wurden 12,5g Na₃-Citrat, 6,82g Zitronensäure und 10g Glucose mit 500ml Aqua dest. gemischt. Der pH wurde anschließend mit 1N NaOH auf 4,69 eingestellt. Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

2.1.3.3 Tyrodes 10fach

Zur Herstellung wurden 80g NaCl mit 10,15g NaHCO₃, 195g KCL und 1000ml Aqua dest. gemischt. Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

2.1.3.4 Tyrodes pH 7.4 + 0,1% BSA/Glucose

Zur Herstellung wurden 0,2g BSA, 0,2g Glucose 20ml Tyrodes 10fach und 180ml Aqua dest. vermischt. Mit 1M HEPES wurde der pH auf 7.4 eingestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

2.1.3.5 Tyrodes pH 6.5

Zur Herstellung wurde die Lösung „Tyrodes pH 7.4 + 0,1% BSA/Glucose“ mit 1N HCL auf pH 6.5 eingestellt. Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

2.1.4 Versuchstiere

Tabelle 4. Versuchstiere

Stamm	Bezugsquelle
C57Bl/6J	Eigenzucht, Charles River Laboratories International Inc., USA
IL4-R α /GPIb α (C57Bl/6J Hintergrund)	Eigenzucht, Charles River Laboratories International Inc., USA

Die Versuchstiere C57Bl/6J wurden als Wildtyp, sowie als Kontrolltiere verwendet. Die IL4-R α /GPIb α (knockout) Mäuse besitzen den genetischen Hintergrund der C57Bl/6J Wildtyp-Versuchstiere. Bei diesen Mäusen wurde der extrazelluläre Anteil des GPIb α -Rezeptors genetisch durch einen humanen IL4-Rezeptoranteil ersetzt.[41]

Die Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (TVA M15/13).

Das versuchstierkundliche Privatissimum zur Erlangung tierschutz- und versuchstierkundlicher Fachkenntnisse nach §3 Abs. 2 und Anlage 1 Abschnitt 2 und 3 der TierschutzVersuchstierVerordnung wurde erfolgreich absolviert.

Die Versuchstiere wurden in Käfigen des Typs II lang zu maximal 5 Tieren auf Einstreu gehalten. Diese enthielten als „Enrichment“ Holzhäuschen, sowie Holzröhren. Als Nistmaterial wurde Zellstoff zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden mit ausreichend Trinkwasser und Standardtrockenfutter versorgt.

2.1.5 Antikörper

Tabelle 5. Antikörper

Antikörper	Name	Hersteller	Clone	Isotyp Ctrl
Anti CD 11 b M1/70	Leaf Purified anti-mouse/human CD 11b	Biologend	M1/70	Leaf Purified Rat IgG2b,k Isotype Ctrl, RTK 4530
Anti CD 11c	Purified Anti-mouse CD11c	Biologend	N418	Purified Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl, HTK888
Anti CD61	Leaf Purified anti-mouse/rat CD61	Biologend	2C9-G2 (HM	Leaf Purified Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl, HTK888
Anti CD209a	Biotin Rat Anti-mouse CD209a (CIRE, DC-Sign)	BD Pharmingen	5H10/CIRE	Biotin Rat IgG2a,k Isotype Ctrl, R35-05
Anti CD102	Purified Rat Anti-mouse CD 102	BD Pharmingen	3C4(m1C2/4)	Biotin Rat IgG2a,k Isotype Ctrl, R35-95
Anti M2		Daniel Simon, Boston		Normal Rabbit IgG Control, purified, R&D Systems, AB105C
Anti PopB	Anti-GPIIbalpha Ak Fab	Bernhard Nieswandt, Würzburg	stha_01 lot#SLBF6029L 57E12 Fab'	Rat IgG Control, Nieswandt, stha_03

Der Antikörper Anti M2 wurden uns freundlicherweise von Daniel I. Simon (Boston) zur Verfügung gestellt. Dieser bindet an die P²⁰¹-K²¹⁷ Sequenz der I-Domäne der α_M Einheit von Mac-1.[109]

Der Antikörper Anti PopB, sowie die dazugehörige Kontrolle wurde uns freundlicherweise von Bernhard Nieswandt (Würzburg) zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Thrombozytenisolation aus murinem Vollblut

Die Maus wurde zur Blutentnahme mit Isofluran narkotisiert und der retrobulbäre Venenplexus mit einer heparinisierten Glaskapillare punktiert. Das Blut wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 300µl ACD-Puffer getropft. Anschließend wurde das Blut mit einer Pipette in ein 5ml Polystyrene Round-Bottom (PRB) Tube gegeben. Hierbei musste vorsichtig vorgegangen werden, damit es nicht zur Aktivierung bzw. Zerstörung der Thrombozyten kommen konnte. Das Röhrchen wurde mit Tyrodes pH 6.5 auf 2ml aufgefüllt. Als nächster Schritt folgte die Zentrifugation ohne Bremse bei 120g für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Das PRP (platelet rich plasma) wurde danach vorsichtig und langsam mit verschiedenen Pipetten abgenommen. Zu beachten war, dass keine Erythrozyten aufgenommen, jedoch so viele Thrombozyten wie möglich gesammelt wurden. Das PRP wurde in ein neues PRB gegeben, welches danach mit Tyrodes pH 6,5 auf 4ml aufgefüllt wurde. Ein nächster Zentrifugationsschritt bei 2600g für 10 Minuten ohne Bremse bei Raumtemperatur folgte. Der Überstand wurde danach abgenommen. Das Pellet wurde mit 250µl Tyrodes pH 6.5 und mit 250µl Tyrodes pH 7.4 (zur Neutralisation) resuspendiert.

Für die Zählung im Sysmex wurden 5µl der Thrombozytenlösung und 45µl Tyrodes pH 7.4 gemischt, was einer Verdünnung von 1:10 entsprach. Im Sysmex wurden die Thrombozyten maschinell ausgezählt.

2.2.2 Gewinnung von Dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark

Zur Gewinnung von Dendritischen Zellen (DCs) wurden Wildtypmäuse nach einer starken Narkotisierung mit Isofluran artgerecht per Genickbruch euthanisiert. Femuren und Tibiae wurden von jeglichem Gewebe freipräpariert, gereinigt und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß, welches mit DC-Medium gefüllt wurde, auf Eis kurzzeitig aufbewahrt. Unter der Sterilbank wurden die Knochen in einer 6-well Platte mit Ethanol desinfiziert und anschließend in DC-Medium gespült. Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden die Epiphysen mit einem Skalpell abge-

trennt. Die Röhrenknochen wurden anschließend mit einer 10ml Spritze und einer 27G Kanüle mit DC-Medium durchspült, bis der Knochenschaft durchsichtig schimmerte. Das Knochenmark wurde in einem 50ml Falcon-Reaktionsgefäß aufgefangen. Anschließend erfolgte die Sterilfiltration mit einem 70µm Filter. Das DC-Medium mit den enthaltenen Zellen wurde im Filter filtriert und der Filter sorgfältig nachgespült, sodass alle Zellen im Filtrat enthalten waren. Es folgte die Zentrifugation bei 300g für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen. Zur Lysierung der enthaltenen Erythrozyten wurde 1ml kaltes Ammoniumchlorid für 5 Minuten hinzugegeben und regelmäßig vermengt. Die Neutralisation erfolgte mit 10ml DC-Medium. Zur Aufreinigung erfolgte die erneute Zentrifugation bei 300g für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen, sowie die Zellen erneut in 10ml DC-Medium resuspendiert. Es erfolgte die erneute Filtration mittels 70µm Filter. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (300g/5min/Raumtemperatur) wurden die Zellen in 18ml DC-Medium resuspendiert. Zur Anregung des Wachstums wurde 0,1µl murines Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (mGMCSF) pro ml DC-Medium hinzugefügt, d.h. 1,8µl mGMCSF auf 18ml DC-Medium. Die Zellen wurden in einer 6-well Platte ausgesät (3ml pro well). Im Brutschrank wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂- Gehalt für 7 Tage inkubiert.

2.2.2.1 DC-Mediumswechsel

Alle zwei Tage erfolgte der Wechsel des Mediums. Hierzu wurde das DC-Medium auf 37°C aufgewärmt. 20ml des DC-Mediums wurden mit 2µl mGMCSF vermengt. Die 6-well Platte mit den inkubierten Zellen wurde unter der Sterilbank geöffnet, der Überstand vorsichtig abgesaugt und verworfen. Zur Entfernung leicht adhärenter Zellreste wurde mit wenig DC Medium die Platte leicht geschwenkt. Es erfolgte das erneute Absaugen des Überstands. Nun wurden 3ml frisches Medium inklusive mGMCSF pro well hinzugegeben.

2.2.2.2 Ernten der DCs

Nach 7 tägiger Kultivierung wurden die 6-well Platten mit PBS und einer 10ml Pipette abgespült und in einem 50ml Falcon aufgefangen. Nach Zentrifugation bei 300g für 7 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Resuspendierung in 10ml PBS, die Zählung der Zellen, sowie die Einstellung der gewünschten Konzentration mittels PBS.

2.2.3 Statischer Adhäsions-Assay

Alle in dieser Arbeit durchgeführten statischen Adhäsions-Assays wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt. Ausschließlich die Antikörper wurden variiert. Abb. 1 beschreibt beispielhaft das Pipettierschema eines Adhäsionsassays auf einer 96-well Platte. Jeweils 3 wells wurden exakt gleichbehandelt.

	1	2	3
A	-Tz +DCs		
B	+Tz +PBS +DCs		
C	+Tz +DCs +Ak1		
D	+Tz +DCs +Ctrl1		

Abb. 1 Pipettierschema einer 96-Well Platte. Je 3 wells wurden mit den gleichen Reagenzien befüllt. +=mit, -=ohne, Tz= Thrombozyten, DCs= Dendritische Zellen, PBS siehe Material, Ak1= Antikörper 1, Ctrl1= Kontrolle 1

2.2.3.1 Beschichtung einer 96-well Platte mit Thrombozyten

Nach erfolgter Thrombozytenisolation aus murinem Vollblut sowie der Gewinnung der DCs wurden statische Adhäsions-Assays durchgeführt. Hierzu wurden die Thrombozyten mittels Tyrodes pH 7.4 auf die Konzentration von 1×10^8 Thrombozyten/ml eingestellt. In eine 96-well Platte wurden pro well 60µl, d.h. 1×10^8 Thrombozyten pipettiert. Diese wurden für 1h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt, zelluläre

Überreste vorsichtig mit 80µl Tyrodes pH 7.4 gewaschen und erneut abgesaugt. Der Monolayer der am Boden der 96-well Platte adhärierenden Thrombozyten wurde mikroskopisch überprüft.

2.2.3.2 Präinkubation der dendritischen Zellen mittels Antikörper

In der Zwischenzeit wurden die DCs nach der Zellzählung mittels PBS auf die gewünschte Konzentration eingestellt. In Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden 70.000 DCs für 30 Minuten mit verschiedenen Antikörpern, Kontrollantikörpern oder PBS in der Konzentration 10µg Antikörper/ml bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.3.3 Zugabe der (präinkubierten) DCs auf den Thrombozytenmonolayer

Nach 1 Stunde Inkubation der Thrombozyten, sowie 30 Minuten Inkubation der DCs mit ggfs. einem Antikörper wurden 20.000 DCs in 100µl PBS pro well zu den Thrombozyten hinzugefügt. Bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation für 1 Stunde. Anschließend wurden die Überstände abgesaugt. Mittels 80µl PBS wurden Zellreste, sowie nicht adhärenente Zellen vorsichtig abgewaschen und abgesaugt. Zur Vermeidung einer Austrocknung wurden 100µl PBS pro well hinzugefügt. Jeweils 3 wells wurden für eine genauere Aussage mit exakt den selben Reagenzien befüllt.

2.2.3.4 Fotodokumentation und Auswertung

Die Fotodokumentation des Adhäsionsassays erfolgte mittels eines Zeiss Lichtmikroskops in 200x Vergrößerung (Objektiv 20x, Okular 10x). Pro well wurden 5 Bilder erstellt. 4 randbildende Bilder, sowie ein zentrales Bild. Jeweils wurde ein anderer Ausschnitt gewählt. Dies ist beispielhaft in Abb. 2 dargestellt. Zur Auswertung wurden die adhärenenten DCs am Computer mittels des Programms Image J ausgezählt. Pro Well wurden 3 repräsentative Bilder aus den 5 erstellten Bilder ausgezählt. Es wurde der Mittelwert aus den drei Summen der adhärenenten Zellen gebildet. Da immer 3 wells mit den genau gleichen Reagenzien befüllt

wurden, wurde erneut der Mittelwert aus diesen Mittelwerten gebildet. Dieser Wert ergab den abschließenden Mittelwert der adhärenenten DCs.

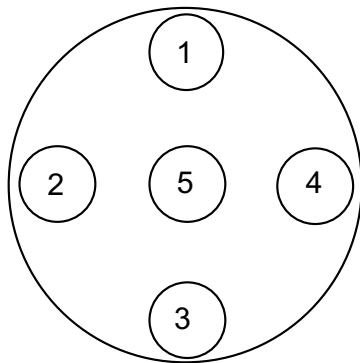


Abb. 2 Anordnung der Fotos bei der Auswertung der Adhäsionsassays in einem well.

2.2.4 In vivo Darstellung von Rekrutierung und Adhäsion der DCs in der Intravitalmikroskopie mit temporärer Karotisligatur

Um die Rekrutierung der DCs durch Thrombozyten in vivo zu untersuchen wurde die Methode der Karotisligatur und Intravitalmikroskopie mittels fluoreszierend markierten DCs genutzt. Diese Methode wurde schon zuvor beschrieben. [35, 118] Die Karotisligatur wurde verwendet um eine Gefäßverletzung am Endothel hervorzurufen ohne das Gefäß in seiner Gesamtheit zu verletzen. Hierbei kommt es zur Quetschung des Endothels. Eine makroskopische Blutung tritt nicht auf.

2.2.4.1 DCF Markierung der DCs

Um die DCs bei der Intravitalmikroskopie sichtbar zu machen wurden sie fluoreszierend markiert. Die DCs wurden nach 7-tägiger Kultivierung in 6-well Platten mit PBS abgespült und in einem 50ml Falcon aufgefangen. Nach Zentrifugation bei 300g für 7 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 10ml PBS aufgenommen. Die Zellen wurden mittels CChip gezählt. 600.000 Zellen wurden in ein 15ml Falcon aufgenommen. (Ab der Versuchsreihe Anti M2 wurden 1.000.000 Zellen aufgenommen.) Es erfolgte die erneute Zentrifugation (300g/7 Minuten/Raumtemperatur). Die Zellen wurden dann in 500µl PBS aufgenommen. Nun erfolgte die auf Fluorescein (FITC) basierende Markierung durch Zufügen von 50µl DCF. Lichtgeschützt wurde das Gemisch für 3-4

Minuten inkubiert. Um nun das DCF, welches nicht in die Zellen aufgenommen wurde, auszuwaschen wurde das Falcon auf 15ml mit PBS aufgefüllt und erneut abzentrifugiert (300g/7 Minuten/Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1ml PBS resuspendiert. Nun erfolgte ein erneutes Zählen der Zellen.

Die gewünschte Zellkonzentration betrug 100.000 DCs in 250 μ l PBS. Diese Konzentration wurde mit PBS eingestellt.

2.2.4.2 Intravenöse retrobulbäre Injektion der fluoreszierend markierten DCs sowie ggfs. eines blockierenden Antikörpers oder eines Kontrollantikörpers

Nach der Markierung der DCs mittels DCF wurden diese lichtgeschützt weiterverarbeitet. Abhängig von der jeweiligen Versuchsreihe wurde kurz vor der Injektion der Zellen ein Antikörper oder ein Kontrollantikörper in einem Eppendorf Reaktionsgefäß zu den DCs gemischt. Intravenös injiziert wurden 100.000 DCs und gegebenenfalls 100 μ g Antikörper in einem Volumen von 250 μ l PBS. In eine 1ml Spritze wurden 400 μ l dieses Gemisches aufgezogen und lichtgeschützt kurz gelagert. Da es sich um eine kurze Zeit handelte konnte davon ausgegangen werden, dass es keine relevante Reaktion zwischen DCs und Antikörper in der Spritze gab.

Die Maus wurde in eine Narkosebox mit Isofluran-Narkosegas gesetzt. Nachdem eine ausreichende Narkotisierung durch Ausfallen der Stellreflexe der Maus bei weiterhin suffizienter Atmung festgestellt wurde, konnte die Maus herausgenommen werden. Es erfolgte die fachgerechte, intravenöse Injektion von 250 μ l (= 100.000 DCF-markierte DCs + ggfs. 100 μ g Antikörper) des Gemischs mittels einer feinen 27G Kanüle. Die Injektion erfolgte in den retrobulbären Venenplexus der Maus. Hierbei wurde sorgfältig darauf geachtet, dass keine Luft injiziert wurde, was zu einer Luftembolie führen konnte. Des Weiteren wurde auf die genaue Injektionsmenge geachtet, um die Vergleichbarkeit der Versuche aufrecht zu erhalten. Nach erfolgreicher Injektion durfte die Maus in ihrem Käfig wieder

aufwachen. Bei eingeschränkter Atmung konnte die Oxygenierung mittels medizinischem Sauerstoff unterstützt werden bis die Maus wieder suffizient atmete. Es erfolgte die Überwachung der Maus. Hierbei konnte nach einer kurzen Aufwachphase wieder ein normales Verhalten der Maus festgestellt werden. Durch sorgfältige Beobachtung konnten keine Anzeichen für Schmerzen oder Bewusstseinsstörungen entdeckt werden. Die Zellen, sowie ggfs. der Antikörper zirkulierten für 1 Stunde in der wachen Maus um eine optimale Verteilung zu erhalten.

2.2.4.3 Präinkubation der Dendritischen Zellen

In einer Versuchsreihe erfolgte die Präinkubation der Dendritischen Zellen mit einem Antikörper oder des entsprechenden Kontrollantikörpers in einem Eppendorf Reaktionsgefäß. Dieser Ablauf erfolgte analog zu den unter 2.2.3.2 beschriebenen Versuchen.

2.2.4.4 Intraperitoneale Antikörperinjektion

In einer Versuchsreihe erfolgte die Applikation des Antikörpers in die Peritonealhöhle. Hierzu wurden 100µg des Antikörpers mit 250µl PBS in einem Eppendorf Reaktionsgefäß gemischt. Dieses Gemisch wurde anschließend mit einer 26G-Kanüle der Maus in Kurznarkose in Rückenlage injiziert. Hierbei wurde einer der beiden unteren Quadranten des Abdomens für die Injektion gewählt. Eine iv. Applikation wurde ausgeschlossen. Das Gemisch konnte im Anschluss für eine Stunde in der wachen Maus resorbiert werden und zirkulieren.

2.2.4.5 Karotisligatur

Nach einer einstündigen Zirkulationsphase der DCs wurde die Maus erneut in der Isoflurannarkosebox kurz narkotisiert. Anschließend erfolgte die intraperitoneale Injektion eines Narkosegemisches. Dieses Gemisch bestand aus Midazolam (5mg/kg KG), Medetomidin (0,5mg/kg KG) und Fentanyl (0,05mg/kg KG). Es wurden 80µl dieses Gemisches, sowie 400µl NaCl intraperitoneal injiziert. Die

Maus wurde erneut in ihren Käfig gesetzt. Sie erwachte kurzzeitig aus der Gasnarkose bis die intraperitoneale Narkose zu wirken begann. Nachdem die Maus im Käfig bei bestehender Atmung bewusstlos wurde konnte mit dem Versuch begonnen werden.

Zum Schutz der Kornea wurde auf beide Augen eine Augensalbe aufgetragen. Mittels Enthaarungscreme und Wattestäbchen wurde das Fell der Maus im ventralen Halsbereich entfernt. Zu beachten war, dass keine Haare oder Rückstände der Creme zurückblieben, welche dann zu schlechten Sichtbedingungen oder zu Artefakten führen konnten. Die Maus wurde in Rückenlage auf einer Heizmatte gelagert, die Extremitäten mittels Pflaster abduziert und fixiert. Eine Kanüle mit Hülle wurde ins Genick gelegt um den Hals ventralseitig zu überstrecken. Die Körpertemperatur wurde bei 36°C - 38°C gehalten. Um eine ausreichende Oxygenierung sicher zu stellen wurde die Schnauze in eine Kopfmaske gesteckt und Sauerstoff bei einem Fluss von 1l/min insuffliert. Hierüber wurde auch ab 30 Minuten nach der intraperitonealen Narkose das Narkosegas Isofluran in 0,5% Mischung hinzugemischt um die Narkose aufrecht zu erhalten. Vor Beginn der Operation wurde der Zwischenzehenreflex getestet um eine ausreichend tiefe Narkose zu bestätigen. Nach Desinfektion des Halses wurde mit einem medianen Längsschnitt der Hals unter einem Stereomikroskop bei 2,5-10x Vergrößerung eröffnet. Es erfolgte stumpfes Präparieren des Unterhautfettgewebes und zur Seite drängen der paarigen Speicheldrüsen. Unter Schonung eines Seitenastes des Nervus vagus wurden die Aa. carotides communes knapp unterhalb der Bifurkation präpariert. Eine Durchtrennung dieses Nerves konnte zu lebensbedrohlichen Bradykardie führen. Die Arterien wurden von Binde- und Fettgewebe befreit, sodass ein direkter Blick auf die Adventitia ohne sonstige Gewebereste möglich war. Zur Kontrastierung wurden nun beidseits kleine schwarze Kunststoffplättchen unter die Arterien geschoben. Anschließend erfolgte die lockere Vorlage einer 7-0 Prolene Ligatur beidseits.

Vor der Gefäßverletzung durch die Ligatur wurden unter dem Zeiss Axiotech Mikroskop in 100x Vergrößerung (10x Okular, 10x Objektiv) mit einer Fluo Arc Lampe (Carl Zeiss) und einem 495nm Filter Videoaufnahmen zur Bestimmung des Durchmessers erstellt. Anschließend folgten bei 200x Vergrößerung(10x Okular,

20x Wasser Immersions Objektiv) 4 Leeraufnahmen der Arterie über die ganze Länge.[35] Dies ist erforderlich um schon stattgehabte Gefäßverletzungen oder Adhäsionen der DCs auszuschließen. Nun erfolgte zuerst die linksseitige Ligatur der A. carotis knapp unterhalb der Bifurkation für 5 Minuten mittels eines Knotens, der wiedereröffnet werden konnte. Hierbei musste beachtet werden, dass es zu keinem Gefäßabriss der Arterie kam. Jedoch musste die Ligatur fest genug sein, um eine Verletzung bzw. Quetschung des Endothels zu bewirken. Nach 5 Minuten wurde die Ligatur vorsichtig entfernt. Nun konnte das Blut mit den Thrombozyten sowie den fluoreszierend markierten DCs ungehindert diesen Abschnitt des Gefäßes mit verletztem Endothel passieren. 5, 10, 30 und 60 Minuten nach Eröffnen der Ligatur wurden nun von dieser Stelle der Arterie Videoaufnahmen durch das oben genannte Mikroskop gemacht. Pro Zeitpunkt wurden 3 bzw. 4 33 Sekunden lange Videos erstellt und auf CD archiviert. Es wurde die hintere Gefäßwand fokussiert. Nach den Aufnahmen zum Zeitpunkt 5 Minuten der linken Seite wurde die A. carotis dextra für 5 Minuten ligiert. Die folgenden Videoaufnahmen erfolgten nach dem gleichen Schema.

Nach Beendigung des Versuches wurde die Maus mittels Genickbruch oder Ausbluten fachgerecht und unter Narkose euthanisiert. Zu keinem Zeitpunkt gab es Anzeichen oder Hinweise auf eine zu flache Narkose oder Schmerzen der Maus.

2.2.4.6 Auswertung der Video-Aufnahmen

Die Auswertung der aufgenommenen Videos erfolgte am gleichen Bildschirm, welcher auch während des Versuches verwendet wurde.

Zunächst wurde der Durchmesser der Arterie gemessen. Hierzu wurde eine Skalierung erstellt, die zur Messung des Durchmessers bei einer 100x Vergrößerung mittels 10x Objektiv geeignet war und am Bildschirm verwendet werden konnte. Die Messung erfolgte in einem Standbild. Es wurde der größtmögliche Innendurchmesser in der Systole gemessen.

Als nächstes wurden die Videoaufnahmen zu den Zeitpunkten vor Ligatur, 5, 10, 30 und 60 Minuten nach der Ligatur ausgezählt. Es wurde pro Zeitpunkt 3 bzw. 4 Videos à 33 Sekunden aufgenommen. Da die Aufnahmen in 200x Vergrößerung

aufgenommen wurde eine Schablone entsprechend erstellt, die dann einen Gefäßausschnitt von 150µm x 100µm (Breite x Höhe) zeigte. Diese wurde so angebracht, dass sie den Teil der Gefäßwand darstellte, der eine für diesen Versuch repräsentativen Ausschnitt an adhären DCs zeigte. Ausgewertet wurden 30 Sekunden in halber Abspielgeschwindigkeit. Pro Video wurde der Ort der Schablone auf der Gefäßwand variiert um einen entsprechenden Durchschnitt zu erhalten. Nun wurden adhären DCs, transient adhären DCs und rollende DCs gezählt. Als adhären DCs galten fluoreszierende große Zellen, die mindestens 10 Sekunden lang am gleichen Ort sichtbar waren. Transient adhären DCs mussten mindestens 2 Sekunden am gleichen Ort sein. Rollende DCs mussten entlang der Schablone in Stromrichtung über die ganze Bildschirmgröße gleiten.

2.2.5 Zellzählung

Die Bestimmung von Zellzahlen erfolgte in einer Einwegzählkammer CChip (Biochrom AG), die einer Neubauer Zählkammer improved entspricht. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension in die Zählkammer gegeben. Danach wurden unter dem Mikroskop alle vier Quadranten ausgezählt. Für die Berechnung der gesamten Zellanzahl wurde der Mittelwert mit 10^4 und dem Volumen, in dem die Zellsuspension gelöst war, multipliziert, was die Zellzahl ergab:

$$y = \frac{x}{4} \times 10^4 \times V$$

y: Zellanzahl

x: gezählte Zellen aus 4 Quadranten

V: Volumen

Abb. 3 Formel Zellzählung

2.2.6 Auswertung und Statistik

Die Auswertung der Versuche erfolgte mittels Microsoft Excel. Zur statistischen Auswertung wurden der t-test, sowie der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Als signifikant wurden Ergebnisse bezeichnet, deren p-Wert kleiner 0,05 war.

3 Ergebnisse

Zur Analyse einer möglichen Interaktion zwischen Dendritischen Zellen (DCs) und Thrombozyten mittels Mac-1 auf DCs und GPIIb α auf Thrombozyten wurden verschiedene Methoden angewandt. Mit statischen Adhäsionsassays wurde die Auswirkung verschiedener Einflussnahmen mit blockierenden Antikörpern oder genetisch veränderten Thrombozyten auf die Interaktion der zwei Zellarten in vitro untersucht. In der Intravitalmikroskopie mit temporärer Carotisligatur als Modell einer Gefäßverletzung wurden diese Ergebnisse in vivo unter arteriellen Flussbedingungen überprüft.

3.1 Analyse des Adhäsionsverhalten von DCs an Thrombozyten in vitro

Um das Adhäsionsverhalten zwischen DCs und Thrombozyten zu untersuchen wurden in einem ersten Schritt statische Adhäsionsassays in vitro durchgeführt. Verschiedene Oberflächenrezeptoren auf den DCs als mögliche Interaktionspartner wurden in vitro mittels Antikörper blockiert und anschließend das Adhäsionsverhalten zwischen DCs und Thrombozyten untersucht. Das gleiche Vorgehen wurde auf der Seite der Thrombozyten angewandt. Ergänzend wurde die Adhäsion von DCs an GPIIb α knockout Thrombozyten in vitro analysiert.

Wie im Abschnitt „Material und Methoden“ ausführlich beschrieben wurde in den Adhäsionsassays eine 96-well Platte mit 1×10^8 murinen Thrombozyten pro well beschichtet. Die aus murinem Knochenmark differenzierten DCs wurden geerntet und je nach Versuch mit verschiedenen Antikörpern oder Kontrollantikörpern behandelt. Nach Zugabe von 20.000 DCs pro well, welche mit einem dieser Antikörper vorinkubiert wurden, zu den immobilisierten Thrombozyten erfolgte erneut eine Inkubation von einer Stunde. Anschließend wurden nicht adhärenzte DCs sorgfältig zweimal mit PBS gewaschen. Mit jeweils 3 wells wurden zur Stärkung der Aussagekraft identisch verfahren. Zur Auswertung wurden pro well 5 verschiedene Fotos mikroskopisch aufgenommen und am Computer ausgezählt.

3.1.1 Inhibition von Mac-1 mittels Anti CD11b Antikörper vermindert die Adhäsion von DCs an Thrombozyten in vitro

Zur Bestätigung einer möglichen Interaktion zwischen DCs und Thrombozyten mittels Mac-1 und GPIIb/IIIa wurden verschiedene Oberflächenrezeptoren auf Dendritischen Zellen mittels eines blockierenden Antikörpers oder Kontrollantikörpers behandelt. Anschließend wurde das Adhäsionsverhalten von DCs an Thrombozyten in Adhäsionsassays analysiert.

Abb. 4 Analyse des Effekts einer Inhibition verschiedener Oberflächenrezeptoren auf DCs auf das Adhäsionsverhalten von DCs an Thrombozyten unter statischen Bedingungen in vitro beschreibt das Ergebnis dieser Analysen. In diesen Versuchen wurden die DCs mit den folgenden Antikörpern oder dem jeweilig korrespondierenden Kontroll-Antikörper für 30 Minuten behandelt: Anti CD11c Antikörper, Anti CD209a Antikörper (=DC Sign) und Anti CD11b Antikörper.

Hier zeigte sich bei Blockierung der auf DCs vorkommenden Oberflächenrezeptoren CD11c und CD209a keine signifikante Veränderung des Adhäsionsverhaltens zwischen Thrombozyten und DCs. Nach Blockierung der CD11b Untereinheit von Mac-1 auf DCs mit einem Anti CD11b (M1/70) Antikörper in 9 unabhängigen Versuchen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Adhäsion zwischen DCs und Thrombozyten in vitro.

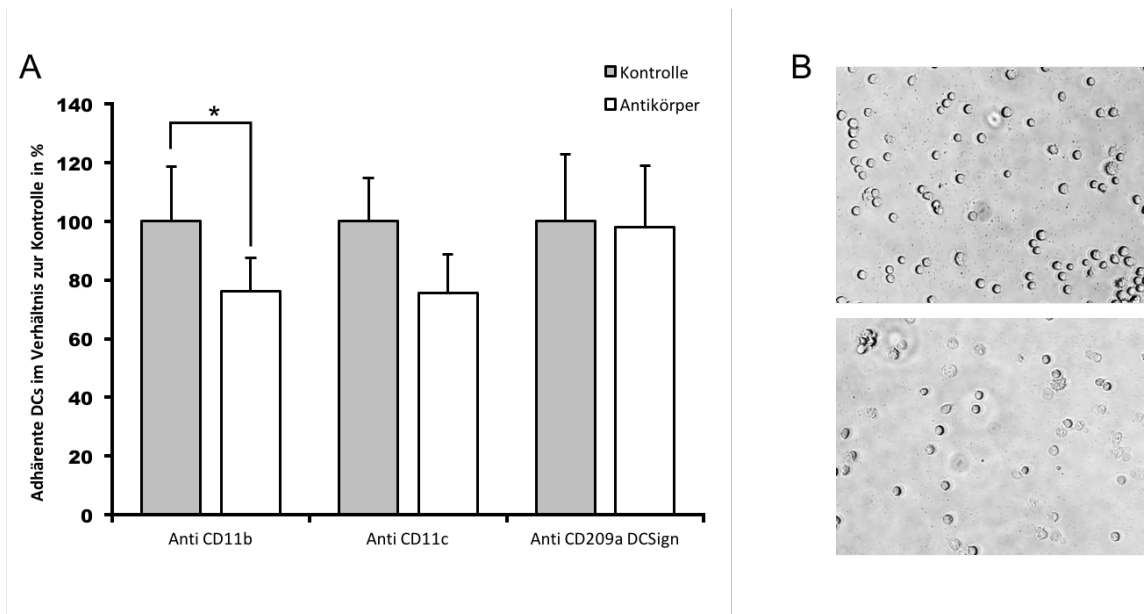


Abb. 4 Analyse des Effekts einer Inhibition verschiedener Oberflächenrezeptoren auf DCs auf das Adhäsionsverhalten von DCs an Thrombozyten unter statischen Bedingungen in vitro

A Interaktion von DCs mit immobilisierten Thrombozyten unter statischen Bedingungen im Adhäsionsassay. Die Adhäsion von DCs an Thrombozyten nimmt nach der Blockierung mittels eines Anti CD11b Antikörpers signifikant ab. * $p < 0,05$. Mittelwert und Standard Error of the mean (SEM) sind gezeigt. $n(\text{AntiCD11b})=9$, $n(\text{AntiCD11c})=9$, $n(\text{AntiCD209a})=7$.

B Beispielbilder eines Adhäsionsassays in 200x Vergrößerung. Oben: DCs adhären an Thrombozyten nach Behandlung mit einem Isotyp Kontrollantikörper. Unten: DCs adhären an Thrombozyten nach Blockierung mit einem Anti CD11b Antikörper. Eine Abnahme der adhären DCs im unteren Bild ist sichtbar.

3.1.2 Inhibition von GPIIb/IIIa mittels eines Anti PopB Antikörpers vermindert die Adhäsion von DCs an Thrombozyten in vitro

Analog zu den vorhergehenden Ergebnissen erfolgte die Analyse der Adhäsion von Dendritischen Zellen an Thrombozyten, nachdem Einfluss auf verschiedene Oberflächenrezeptoren auf Thrombozyten in vitro genommen wurde. Abb. 5 zeigt das Ergebnis von diesen Adhäsionsassays. Die Thrombozyten wurden mit einem Anti GPIIb/IIIa Antikörper oder Anti PopB Antikörper bzw. mit dem jeweiligen Isotypkontrollantikörper behandelt und anschließend mit DCs inkubiert. Die Adhäsion von DCs an den Thrombozyten wurde untersucht und verglichen.

Die Blockierung des GPIIb/IIIa Rezeptors mittels eines Antikörpers führte zu keiner signifikanten Abnahme der Adhäsion zwischen diesen beiden Zellarten.

Eine Blockierung des GPIIb/IIIa Oberflächenrezeptors auf Thrombozyten mittels eines Anti PopB Antikörpers führte jedoch zu einer signifikanten Abnahme der Adhäsion von Dendritischen Zellen an Thrombozyten.

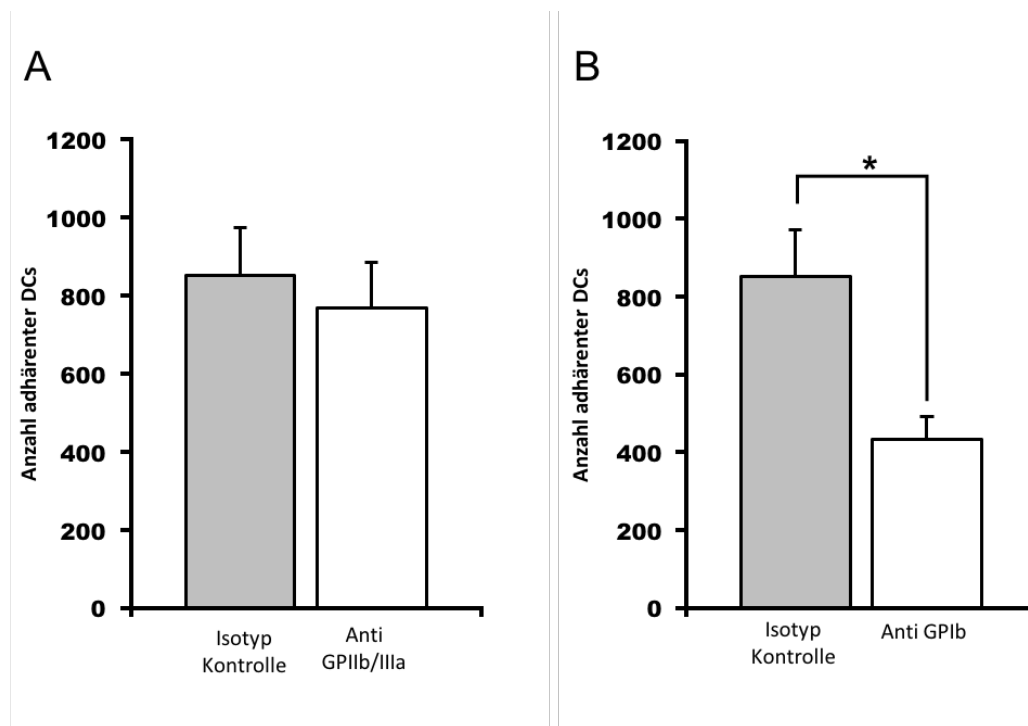


Abb. 5 Analyse des Effekts einer Inhibition von Thrombozyten-Oberflächenrezeptoren auf das Adhäsionsverhalten von DCs an Thrombozyten in vitro

- A Interaktion von DCs mit immobilisierten Thrombozyten unter statischen Bedingungen im Adhäsionsassay. Nach Blockierung des GPIIb/IIIa Rezeptors auf Thrombozyten zeigt sich keine Reduktion der Adhäsion von DCs an Thrombozyten in vitro. Mittelwert und Standard Error of the mean (SEM) sind gezeigt. n=3-4
- B Interaktion von DCs mit immobilisierten Thrombozyten unter statischen Bedingungen im Adhäsionsassay. Nach Blockierung des GPIbα Rezeptors mittels des Anti PopB Antikörpers zeigt sich eine signifikante Reduktion der Adhäsion von DCs an Thrombozyten in vitro. *p<0,05 Mittelwert und Standard Error of the mean (SEM) sind gezeigt. n=3-4

3.1.3 Die Adhäsion von DCs an GPIIb/IIIa knockout Thrombozyten in vitro ist vermindert

In den vorhergehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion von DCs an Thrombozyten abnimmt, wenn entweder Mac-1 durch den Anti CD11b Antikörper oder die Thrombozyten mit einem Anti GPIIb/IIIa Antikörper blockiert wurden.

Zur Verifizierung des Einflusses des Thrombozytenrezeptors GPIIb/IIIa auf das Adhäsionsverhalten von DCs an Thrombozyten wurden statische Adhäsionsassays durchgeführt, in welchen DCs an GPIIb/IIIa knockout Thrombozyten adhären konnten. In 4 bzw. 5 unabhängigen Versuchen zeigte sich eine deutliche Abnahme der Adhäsion von Dendritischen Zellen an GPIIb/IIIa-knockout-Thrombozyten im Vergleich zur Adhäsion an Wildtyp-Thrombozyten.

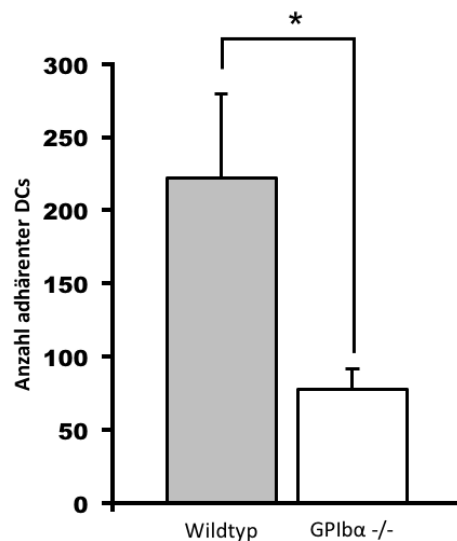


Abb. 6 Analyse der Adhäsion von DCs an GPIIb/IIIa-knockout-Thrombozyten in vitro

Interaktion von DCs mit immobilisierten Thrombozyten unter statischen Bedingungen im Adhäsionsassay. Nach der Interaktion von DCs mit GPIIb/IIIa Knockout Thrombozyten zeigt sich eine signifikante Reduktion der Adhäsion von DCs an Thrombozyten im Vergleich zu Wildtyp Thrombozyten in vitro. Mittelwert und Standard Error of the mean (SEM) sind gezeigt. * $p < 0,05$. $n(\text{GPIIb/IIIa -/-})=4$, $n(\text{Wildtyp})=5$

3.2 Analyse des Adhäsionsverhaltens von DCs an Thrombozyten in vivo

Nachdem die Interaktion von DCs und Thrombozyten in vitro in verschiedenen Adhäsionsassays untersucht worden war, wurden diese Ergebnisse in vivo verifiziert. Hierzu wurde die temporäre Carotisligatur als Modell einer Gefäßverletzung in der Intravitalmikroskopie gewählt. An narkotisierten Mäusen wurden nach Injektion von fluoreszierend markierten Dendritischen Zellen und je nach Versuch eines Antikörpers die A. carotis freigelegt und für 5 Minuten temporär ligiert. Die Ligatur löste eine Verletzung des Endothels bei gleichzeitig erhaltener Kontinuität des Gefäßes aus. Vorbekannt ist, dass sich nun am Endothel Thrombozyten anlagern und es anschließend zu einer Rekrutierung von Leukozyten kommt. Ob hiervon auch DCs betroffen sind und ob dies auf dem möglichen Interaktionspartnerpaar GPIIb/IIIa und Mac-1 basiert, wurde hier unter arteriellen Flussbedingungen untersucht.

3.2.1 Analyse des Effekts einer Inhibition des Oberflächenrezeptors Mac-1 auf DCs in vivo

In vitro zeigte sich bereits eine Abnahme der Adhäsion zwischen DCs und Thrombozyten nach der Blockierung des Mac-1 Rezeptors auf DCs. Dies wurde nun im Lebenden und unter arteriellen Flussbedingungen überprüft.

3.2.1.1 Präinkubation von DCs mit einem Anti CD11b Antikörper verändert nicht das Adhäsionsverhalten von DCs an Thrombozyten in vivo

Analog zur Präinkubation der DCs in den in vitro Adhäsionsassays wurden die DCs mit einem Anti CD11b Antikörper oder dem korrespondierenden Isotyp-Kontrollantikörper für 30 Minuten in einem Eppendorf Reaktionsgefäß inkubiert. Anschließend wurden die fluoreszierend markierten DCs der Maus intravenös gespritzt und der operative Teil des Versuchs wurde begonnen. Abb. 7 zeigt das Ergebnis von 8 Versuchen, bei denen die DCs mit dem Anti CD11b Antikörper und 9 Versuchen, bei denen die DCs mit dem Kontrollantikörper inkubiert wurden. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Adhäsion der DCs an den Bereich der Gefäßverletzung.

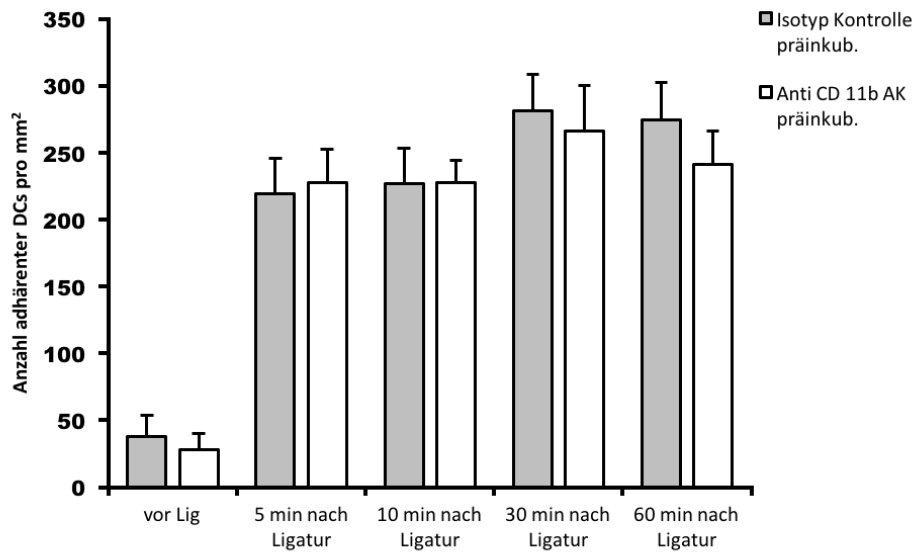


Abb. 7 Analyse des Effekts der Adhäsion von DCs an die verletzte Gefäßwand nach Präinkubation der DCs mit einem Anti CD11b Antikörper unter arteriellen Flussbedingungen in vivo

Intravitalmikroskopie mit temporärer Carotisligatur: Adhäsion von mit einem Anti CD11b Antikörper vorinkubierten DCs an eine durch temporäre Ligatur verursachte Gefäßverletzung der A. carotis unter arteriellen Flussbedingungen in vivo. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der Adhäsion von DCs an Thrombozyten. Mittelwert und SEM (Standard Error of the mean) von 8(Anti CD11b) bzw. 9 (Isotyp Kontrolle) unabhängigen Versuchen sind dargestellt.

3.2.1.2 Inhibition von Mac-1 mittels eines Anti CD11b Antikörper (intravenös) vermindert die Adhäsion von DCs an die verletzte Gefäßwand in vivo

In einem nächsten Schritt erfolgte die Applikation des Anti CD11b Antikörpers bzw. des Isotyp Kontrollantikörpers gleichzeitig mit der Applikation der fluoreszierend markierten DCs. Beides wurde der Maus intravenös injiziert und konnte bei einer Wartezeit von einer Stunde in der Maus zirkulieren. Anschließend erfolgte in Narkose die Operation mit temporärer Carotisligatur. In der Intravitalmikroskopie zeigte sich eine signifikante Abnahme der Adhäsion von DCs an den Bereich der Gefäßverletzung zu allen Zeitpunkten nach der Ligatur. In Abb. 8 ist das Ergebnis von 6 unabhängigen Versuchen dargestellt.

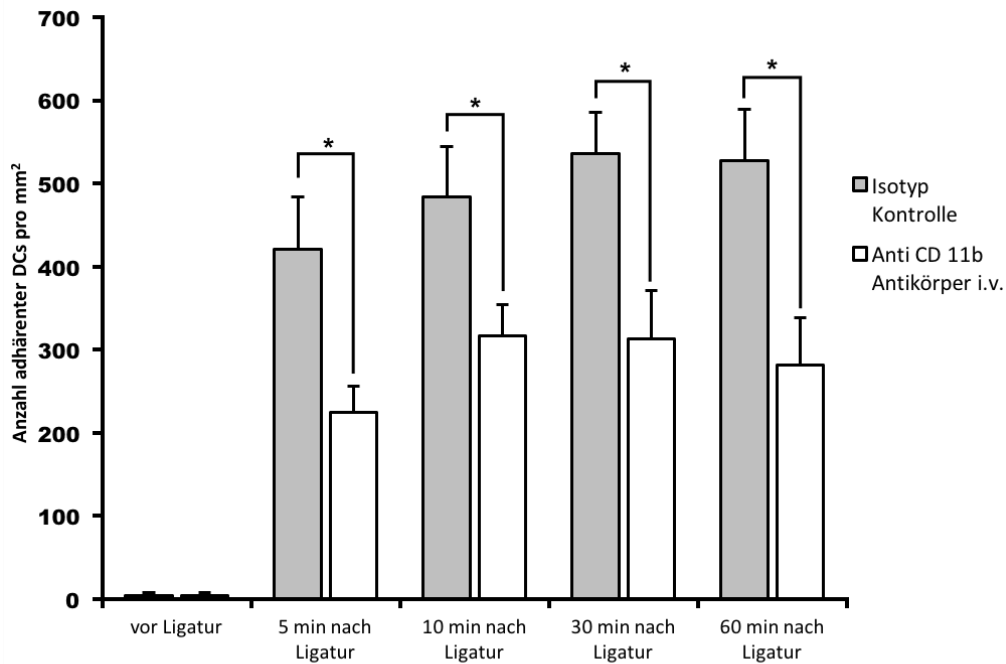


Abb. 8 Analyse des Effekts einer Mac-1 Inhibition mittels eines Anti CD11b Antikörpers auf das Adhäsionsverhalten von DCs an die verletzte Gefäßwand unter arteriellen Flussbedingungen in vivo

Intravitalmikroskopie mit temporärer Carotisligatur: Adhäsion von DCs an eine durch temporäre Ligatur verursachte Gefäßverletzung der A. carotis bei gleichzeitiger intravenöser Gabe eines Anti CD11b Antikörpers unter arteriellen Flussbedingungen in vivo. * $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle. Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der beschriebenen Adhäsion der DCs zu allen Zeitpunkten nach Eröffnen der Ligatur. Mittelwert und SEM (Standard Error of the mean) von 6 unabhängigen Versuchen sind gezeigt.

3.2.2 Analyse des Effekts des Thrombozytenrezeptors GPIIb/IIIa auf das Adhäsionsverhalten von DCs an Thrombozyten in vivo

Im Adhäsionsassay konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des Oberflächenrezeptors GPIIb/IIIa auf Thrombozyten mittels eines Anti PopB Antikörpers zu einer Abnahme der Adhäsion zwischen DCs und Thrombozyten geführt hat. Auch die Adhäsion der DCs an GPIIb/IIIa knockout Thrombozyten war verringert. Die Folge der Beeinflussung des Rezeptors auf diese verschiedene Art und Weise wurde auch in vivo überprüft.

3.2.2.1 Inhibition von GPIIb/IIIa mittels eines Anti PopB Antikörpers vermindert die Adhäsion von DCs an die verletzte Gefäßwand in vivo

In dieser Versuchsreihe erfolgte die Applikation der fluoreszierend markierten DCs, sowie des Anti PopB Antikörpers, welcher GPIIb/IIIa blockiert, oder eines Kontrollantikörpers intravenös. Nach einstündiger Zirkulationszeit im wachen Tier wurde die Präparation der Carotiden in Narkose begonnen. Anschließend erfolgte die Ligatur der Gefäße für 5 Minuten als Modell der Gefäßverletzung. Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie wurde danach die Adhäsion der Dendritischen Zellen an die Thrombozyten an der Stelle der Gefäßverletzung analysiert. In Abb. 9 ist das Ergebnis von 6 unabhängigen Versuchen dargestellt. Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der Adhäsion von Dendritischen Zellen an die verletzte Gefäßwand bei gleichzeitiger Gabe eines Anti PopB Antikörpers im Vergleich zur Gabe eines Kontrollantikörpers. Diese signifikante Reduktion der Adhäsion zeigt sich zu den Zeitpunkten 5, 10, 30 und 60 Minuten nach Eröffnen der Ligatur.

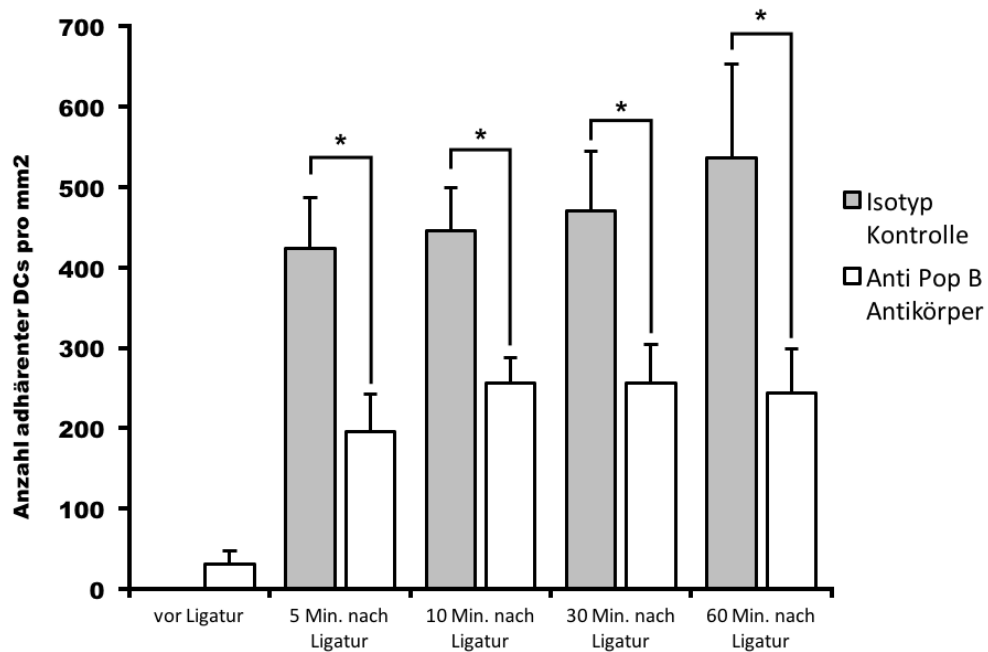


Abb. 9 Analyse des Effekts einer Inhibition von GPIIb/IIIa mittels eines Anti PopB Antikörpers auf das Adhäsionsverhalten von DCs an die verletzte Gefäßwand unter arteriellen Flussbedingungen in vivo

Intravitalmikroskopie mit temporärer Carotisligatur: Adhäsion von DCs an eine durch Ligatur verursachte Gefäßverletzung der A. carotis bei gleichzeitiger intravenösen Gabe eines Anti-PopB Antikörpers unter arteriellen Flussbedingungen in vivo. * $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle. Es zeigt sich eine Abnahme der beschriebenen Adhäsion der DCs zu allen Zeitpunkten nach Eröffnen der Ligatur. Mittelwert und SEM (Standard Error of the mean) von 6 unabhängigen Versuchen sind gezeigt.

3.2.2.2 Die Adhäsion von DCs an die verletzte Gefäßwand in einer Maus mit IL4-R α /GPIb α -Thrombozyten in vivo ist vermindert

Im Adhäsionsassay konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion von DCs an Thrombozyten, an denen der GPIb α Rezeptor nicht mehr vorhanden war (knock-out), reduziert war. Nun sollte dies auch in vivo überprüft werden. Ein Fehlen des GPIb-IX-Rezeptors führt zu strukturell abnormen Thrombozyten und einer verringerten Thrombozytenanzahl, genannt Makrothrombozytopenie. Um dies zu umgehen wurde eine genetisch veränderte Maus verwendet, bei welcher der extrazelluläre Teil der GPIb α Untereinheit durch einen humanen IL4-Rezeptor α ausgetauscht wurde. Dies führte zu einer doppelten Anzahl der zirkulierenden Thrombozyten und eine um 50% reduziertes Volumen der Thrombozyten im Vergleich zu knockout-Mäusen, ohne den intrazellulären Anteil des Rezeptors.[41] Mit diesen Tieren konnten nun bei einer besseren Thrombozytenfunktion und gleichzeitigem Fehlen des extrazellulären Teil des GPIb α Rezeptors Untersuchungen durchgeführt werden, um den Einfluss von GPIb α auf das Adhäsionsverhalten von DCs an Thrombozyten in vivo zu untersuchen.

In 6 unabhängigen Versuchen wurden die Methode der Intravitalmikroskopie mit temporärer Carotisligatur als Modell einer Gefäßverletzung angewandt. Abb. 10 zeigt das Ergebnis dieser Versuche. Zu den Zeitpunkten 10, 30 und 60 Minuten nach der Ligatur ist eine signifikante Abnahme der Adhäsion der DCs an den Bereich der Gefäßverletzung in Mäusen mit IL-4R α /GPIb α Thrombozyten im Vergleich zur Adhäsion in Mäusen mit Wildtyp-Thrombozyten sichtbar.

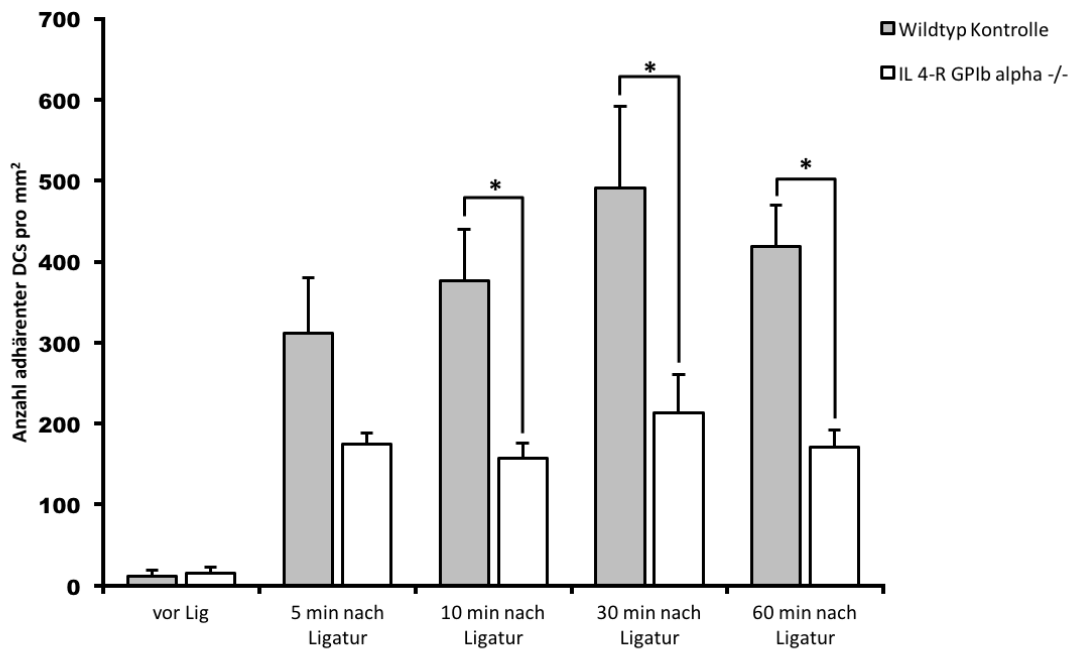


Abb. 10 Analyse der Adhäsion von DCs an IL-4R α /GPIIb α Thrombozyten unter arteriellen Flussbedingungen in vivo

Intravitalmikroskopie mit temporärer Carotisligatur: Adhäsion von DCs an eine durch Ligatur verursachte Gefäßverletzung der A. carotis in Mäusen mit IL-4R α /GPIIb α Thrombozyten unter arteriellen Flussbedingungen in vivo. * $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle. Zu den Zeitpunkten 10 Min., 30 Min. und 60 Min. konnte eine signifikante Reduktion der Adhäsion von DCs an IL-4R α /GPIIb α -Thrombozyten nachgewiesen werden. Mittelwert und SEM (Standard Error of the mean) von 6 unabhängigen Versuchen sind gezeigt.

3.3 Analyse einer spezifischen Inhibition der Mac-1 Bindungsstelle für GPIIb α mittels eines Anti M2-Antikörpers

Es ist bekannt, dass nach einer Gefäßverletzung Thrombozyten einen Monolayer an dieser Stelle ausbilden. Unsere in vitro Versuche haben gezeigt, dass DCs mit Thrombozyten über Mac-1 und GPIIb α interagieren. In vivo konnte dann gezeigt werden, dass die DCs an den Bereich einer Gefäßverletzung adhären und diese Adhäsion analog zu den in vitro Versuchen abnimmt, wenn GPIIb α auf den Thrombozyten beeinflusst wird. Dies zeigt, dass in vivo Thrombozyten die Verbindung zwischen DCs und dem verletzten Gefäß herstellen. In den vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Blockierung von Mac-1 auf DCs zu einer Abnahme der Adhäsion von DCs an Thrombozyten führt. Um die genaue Bindungsstelle auf Mac-1 auf DCs für GPIIb α auf Thrombozyten zu spezifizieren wurden weitere Analysen zuerst in Adhäsionsassays in vitro und anschließend in der Intravitalmikroskopie in vivo durchgeführt. Hierzu wurde der Anti M2 Antikörper verwendet, welcher an das $\alpha_M(P^{201}-K^{217})$ Segment der α_M Domäne von Mac-1 bindet.[109] Diese M2-Sequenz gilt als mögliche Bindungsstelle für GPIIb α .

3.3.1 Spezifische Inhibition der Mac-1 Bindungsstelle für GPIIb/IIIa mittels des Anti M2 Antikörpers vermindert die Adhäsion von DCs an Thrombozyten in vitro

Zur Spezifizierung der Bindungsstelle von Mac-1 auf DCs für GPIIb/IIIa auf Thrombozyten wurden in vitro statische Adhäsionsassays durchgeführt. In Abb. 11 zeigt sich eine signifikante Abnahme der Adhäsion von DCs an Thrombozyten bei Inkubation der DCs mit einem Anti M2 Antikörper im Vergleich zur Inkubation mit einem Kontrollantikörper.

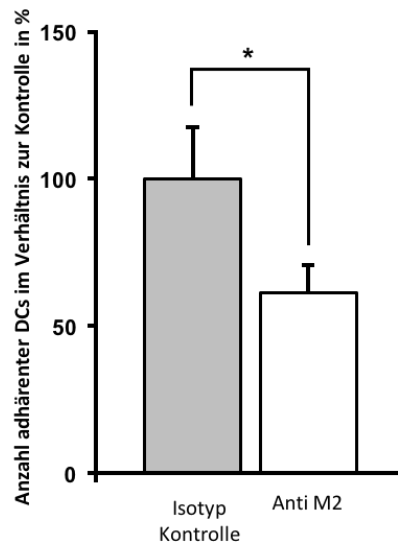


Abb. 11 Analyse des Effekts einer Mac-1 Inhibition mittels des spezifischen Anti M2 Antikörpers auf das Adhäsionsverhalten von DCs an Thrombozyten unter statischen Bedingungen in vitro

Interaktion von DCs mit immobilisierten Thrombozyten unter statischen Bedingungen. * $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle. Die Adhäsion von DCs an Thrombozyten nimmt nach Behandlung mittels eines Anti M2 Antikörpers signifikant ab. Mittelwert und SEM (Standard Error of the mean) von 7 unabhängigen Versuchen sind gezeigt.

3.3.2 Spezifische Inhibition der Mac-1 Bindungsstelle für GPIIb/IIIa mittels eines Anti M2 Antikörpers vermindert die Adhäsion von DCs an Thrombozyten in vivo

Der Einfluss einer Inhibition der möglichen Mac-1 Bindungsstelle für GPIIb/IIIa wurde mittels eines Anti M2 Antikörpers in vivo unter arteriellen Flussbedingungen überprüft. Die temporäre Carotisligatur diente als Modell einer Gefäßverletzung. Die anschließende Intravitalmikroskopie zeigte die adhärenenten, fluoreszierenden DCs am Bereich der Gefäßverletzung. Abb. 12 zeigt das Ergebnis von 6 unabhängigen Versuchen. Das Adhäsionsverhalten konnte durch eine spezifische Blockierung des α_M Segments der α_{MI} -Domäne des Mac-1 Rezeptors beeinflusst werden. Bei gleichzeitiger Injektion des Anti M2 Antikörpers und der fluoreszierend markierten DCs in die Maus nahm die Adhäsion der DCs an die Thrombozyten im Vergleich zu Injektion eines Kontrollantikörpers signifikant ab. Diese Abnahme konnte 5, 10, 30 und 60 Minuten nach Eröffnen der Ligatur beobachtet werden.

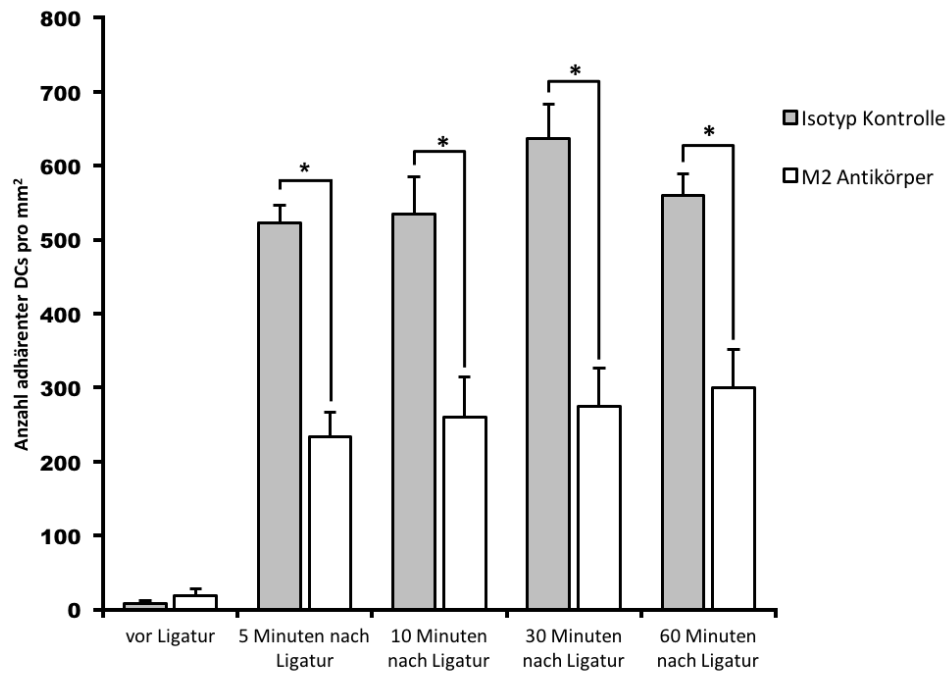


Abb. 12 Analyse des Effekts einer spezifischen Inhibition der Mac-1 Bindungsstelle für GPIIb/IIIa mittels des Anti M2 Antikörper auf das Adhäsionsverhalten von DCs an Thrombozyten unter arteriellen Flussbedingungen in vivo

Intravitalmikroskopie mit temporärer Carotisligatur: Adhäsion von DCs an eine durch Ligatur verursachte Gefäßverletzung der A. carotis bei gleichzeitiger intravenösen Gabe eines Anti M2 Antikörpers unter arteriellen Flussbedingungen in vivo. * $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle. Die beschriebene Adhäsion der DCs ist zu allen Zeitpunkten nach Eröffnen der Ligatur signifikant vermindert. Mittelwert und SEM (Standard Error of the mean) von 6 unabhängigen Versuchen sind gezeigt.

4 Diskussion

Die Atherosklerose als chronisch inflammatorische Gefäßerkrankung besitzt einen hohen Mortalitätsfaktor und zählt mit ihren Folgen zu den Haupttodesursachen in der westlichen Welt.[1, 2] Aus diesem Grund ist es essentiell diese Erkrankung zu verstehen und die molekulare Pathophysiologie aufzuklären. Ziel dieser Forschung sollte in jedem Fall die klinische Translation sein, sodass die Erkenntnisse dem Patienten zugutekommen. Am Anfang steht jedoch immer die Grundlagenforschung im Vordergrund, mit dem Ziel des Übergangs zur klinischen Anwendung.

Die Beteiligung von Thrombozyten an der Pathogenese der Atherosklerose ist unumstritten. Neben ihrer Rolle in der Hämostase und Thrombusbildung verbinden die Thrombozyten in der Atherogenese die Plättchenaggregation mit dem Immunsystem.[36] In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass die Atherosklerose eine Krankheit ist, in der das Immunsystem eine entscheidende Rolle spielt.[3] Beide Teile des Immunsystems, der angeborene sowie auch der erworbene Teil sind involviert.[24] Vor allem die Rolle von klassischen Immunzellen, wie Makrophagen oder Lymphozyten in der Atherogenese sind gut beforscht.[119] Jedoch wurde der Beitrag weiterer immunologischer Zellen, wie auch der von antigenpräsentierenden Dendritischen Zellen (DCs), zur Atherosklerose erst kürzlich entdeckt.[84] DCs haben Einfluss auf die Initiation der Atherosklerose[49, 84, 123], ihre Progression [137] sowie auch auf das Endstadium der Erkrankung mit ihren erheblichen Folgen durch den Verlust von vitalen Organfunktion durch z.B. einen Myokardinfarkt oder einen apoplektischen Insult.[35, 49, 82, 84, 127, 132, 136, 137] In allen Stadien spielen Mechanismen der Inflammation eine wichtige Rolle.

Die Adhäsion von DCs an die Gefäßwand steht mit der Atherogenese in Verbindung. Die Kinetik der DC-Gefäßwand-Interaktionen nach Gefäßwandverletzungen ist bislang noch nicht hinreichend untersucht. Die Aufdeckung pathophysiologischer Mechanismen kann zur Entwicklung therapeutischer und prophylaktischer Strategien beitragen.

Schon längere Zeit ist bekannt, dass Thrombozyten eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von zirkulierenden Leukozyten an die Gefäßwand spielen. Nach einer Gefäßverletzung nehmen die Thrombozyten eine Schlüsselposition ein. Sie initiieren die Thrombusbildung und verhindern damit eine größere Blutung. Weiter aktivieren sie Prozesse um die Verletzung zu heilen. Um das Immunsystem zu aktivieren sezernieren die Thrombozyten verschiedene Chemokine und bilden eine Oberfläche, über die Leukozyten an die Gefäßwand adhären können.[36]

Für verschiedene Leukozyten ist die Interaktion mit Thrombozyten bekannt. Thrombozyten kommunizieren unter anderem mit Neutrophilen Granulozyten über Mac-1 und GPIIb α . [39] Mit Monozyten treten sie ebenfalls über das genannte Rezeptor-Ligandenpaar in Verbindung. Es gibt jedoch noch wenige Informationen darüber, ob auch DCs über diese Mechanismen rekrutiert werden. Langer et. al konnten jedoch erstmals eine Interaktion zwischen Thrombozyten und DCs beobachten. Diese Interaktion kam über das Rezeptor-Liganden-Paar Jam-C und Mac-1 zustande. Es ist bekannt, dass das Integrin Mac-1 mit seinen beiden Subeinheiten CD11b(α_M) und CD18(β_2) auf DCs stark exprimiert ist. Die Expression der β_2 -Untereinheit steigt sogar mit dem Reifegrad der DCs noch an.[35] Weiter konnte im speziellen Fall der Interaktion zwischen DCs und Thrombozyten gezeigt werden, dass Thrombozyten Pseudopodia ausbilden, um mit DCs zu interagieren, was darauf schließen lässt, dass es spezifische Rezeptoren für die Adhäsion geben muss.[35] Auf murinen Thrombozyten ist Jam-C nicht exprimiert (unpublished), was auf einen alternativen Interaktionsmechanismus schließen lässt. In den durchgeführten Experimenten wurde der Hypothese nachgegangen, dass die Rekrutierung von DCs durch Thrombozyten an die Gefäßwand in atherosklerotischen Regionen durch das Rezeptor-Ligandenpaar GPIIb α auf Thrombozyten und Mac-1 auf DCs geschieht.

Zur Aufklärung dieser möglichen Interaktionspartner zwischen Thrombozyten und DCs wurden in dieser Arbeit in vitro statische Adhäsionsassays durchgeführt, wobei verschiedene Rezeptoren durch Antikörper blockiert und die Adhäsion der Zellen gemessen wurde. Dies wurde für verschiedenen Rezeptoren auf Seite der Thrombozyten und auf Seite der DCs durchgeführt. Anschließend wurden Adhäsionsassays durchgeführt, um die Adhäsion von DCs zu Thrombozyten zu untersuchen.

sionsassays mit GPIIb/IIIa-Knockout Thrombozyten durchgeführt. Um diese Ergebnisse im Lebenden zu verifizieren wurde die Methode der temporären Karotisligatur in der Intravitalmikroskopie als Modell einer Gefäßverletzung in vivo durchgeführt.

Im Adhäsionsassay zeigte sich bei Blockierung des Mac-1 Rezeptors (CD11b) [165, 166] auf DCs eine signifikante Abnahme der Adhäsion von DCs an den Thrombozyten, nicht jedoch bei Blockierung anderer spezifischer Oberflächenrezeptoren auf den DCs, wie CD11c [167, 168] und CD209a [94]. Im nächsten Schritt wurden Oberflächenrezeptoren auf Thrombozyten mittels spezifischen Antikörpern blockiert. Hierbei zeigte sich bei der Blockierung von GPIIb/IIIa eine signifikante Reduktion der adhären DCs an den Thrombozyten. Nicht jedoch bei der Blockierung anderer Oberflächenrezeptoren. GPIIb/IIIa ist als einzige Untereinheit innerhalb des von-Willebrandrezeptors auf Thrombozyten bekannt, welcher Liganden bindet.[39, 40] Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ebenfalls nur für GPIIb/IIIa eine Interaktion mit DCs. Weiter konnte der Einfluss von GPIIb/IIIa auf das Adhäsionsverhalten von DCs auf Thrombozyten in einem Adhäsionsassay, in dem GPIIb/IIIa-Knockout Thrombozyten mit DCs inkubiert wurden, gezeigt werden. Es bestand eine deutlich abnehmende Adhäsion von DCs an Thrombozyten im Vergleich zu Wildtyp Thrombozyten. Dies bestätigt die vorangegangenen Ergebnisse.

Unter verschiedenen Bedingungen adhären Thrombozyten an das Gefäßendothel. Hierzu zählen Gefäßverletzungen[35] oder auch allein hohe Scherkräfte.[49, 152] Durch die anschließende Aktivierung der Thrombozyten interagieren diese mit Leukozyten.[36, 37] Sie bilden dann eine Oberfläche, welche es anderen Zellarten möglich macht, dort zu adhären. In vivo adhären DCs nur mittels eines Thrombozytenlayers an eine Gefäßwand.[35]

Zur Übertragung der in vitro Ergebnisse dieser Arbeit ins Lebende wurde ein in vivo Mausmodell ausgewählt. Die primäre Carotisligatur dient als Modell einer Gefäßverletzung und wurde schon früher angewandt.[35] Objektivierbar wurden die Ergebnisse durch die Messung der Adhäsion von fluoreszierend markierten DCs an der Stelle der Gefäßverletzung in der Intravitalmikroskopie in der narkotisierten Maus. Analog zu den vorhergehenden Untersuchungen wurde Mac-1

mittels des spezifischen Antikörpers Anti CD11b, welcher simultan zu den DCs intravenös injiziert wurde, blockiert. Hierbei zeigte sich eine signifikante Abnahme der Adhäsion der DCs an der Stelle der Gefäßverletzung im Vergleich zur Injektion eines Isotyp Kontrollantikörpers. Auch nach der Inhibition von GPIIb/IIIa mittels eines spezifischen Antikörpers konnte eine signifikant abnehmende Adhäsion von DCs gezeigt werden. Im nächsten Schritt konnte diese Abnahme der Interaktion zwischen den beiden Zellpopulationen auch bei IL4-Rezeptor GPIIb/IIIa knockout Thrombozyten gezeigt werden.[41]

Simon et al. konnten für Leukozyten, wie Monozyten und Neutrophile Granulozyten zeigen, dass Mac-1 und GPIIb/IIIa ein Rezeptor-Liganden-Paar darstellt. [39, 158] Weiter konnte diese Arbeitsgruppe die genaue Bindungssequenz innerhalb der I-Domäne von Mac-1 für die Bindung von GPIIb/IIIa identifizieren. Gegen diese Rezeptordomäne wurde ein spezifischer Antikörper (Anti M2 Antikörper) entwickelt.[109] Um die spezifische Bindungsstelle auf Mac-1 auch auf DCs zu identifizieren, wurden entsprechende in vitro sowie in vivo Untersuchungen analog der vorhergehenden Versuche durchgeführt. Mittels des Anti M2 Antikörpers wurde nun untersucht, ob die Sequenz P²⁰¹-K²¹⁷ der I-Domäne der α_M Einheit von Mac-1 die Bindung von GPIIb/IIIa auch bei DCs vermittelt. Im in vitro Adhäsionsassay zeigte sich eine signifikante Abnahme der Adhäsion der DCs an den Thrombozyten nach Inkubation der DCs mit dem spezifischen Anti M2 Antikörper. Unter arteriellen Flussbedingungen in vivo konnte nach Blockierung der spezifischen Bindungsstelle für GPIIb/IIIa auf Mac-1 eine signifikante Abnahme der Adhäsion der DCs an den Thrombozytenlayer an der Stelle der Endothelverletzung nachgewiesen werden.

Dies zeigt, dass Dendritische Zellen mit Thrombozyten über das Rezeptor-Ligandenpaar Mac-1 und GPIIb/IIIa eine adhärenente Verbindung eingehen. Dies ist auch schon für die mit den DCs verwandten Monozyten und Neutrophile Granulozyten bekannt und bestätigt die Hypothese dieser Arbeit.[39, 158]

Wethmar et al. zeigten, dass die transendotheliale Migration von unreifen DCs unabhängig von β_2 Integrinen ist. Jedoch wurde auch gezeigt, dass β_2 Integrine auf der Oberfläche der DCs exprimiert sind. Dies könnte bedeuten, dass diese sich in einem inaktiven Status befinden.[169] Von Neutrophilen Granulozyten ist

bekannt, dass der intrazellulär liegende Mac-1 Rezeptor nach Stimulation schnell in die Plasmamembran eingebaut wird.[170] Sollten sich diese Ergebnisse bestätigen, wäre ein Mechanismus aufzudecken, welcher der festen Adhäsion, wie in dieser Arbeit gezeigt, vorangeht. Bei diesem Mechanismus könnte es sich um eine Konfirmationsänderung des Rezeptors handeln.

Die Methoden, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, sind gut etabliert und vorbeschrieben. Es wurde beschrieben, dass es sich bei der Zellpopulation, welche aus dem Knochenmark mittels GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor) generiert wurden, um eine heterogene Gruppe aus Makrophagen und Dendritischen Zellen handelt und nicht nur um reine Dendritische Zellen.[171] In einer FACS Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die aus Knochenmark differenzierten, murinen DCs CD11b und CD11c positiv sind.[unpublished] Diese Marker sind typisch für murine, myeloide DCs.[172] CD11b positive, proinflammatorische DCs prädominieren eine atherogene Plaque.[173] Die Rolle von DCs im Plaque allgemein und in verschiedenen Plaquebereichen im Speziellen ist noch nicht abschließend geklärt. Analog der Herangehensweise zur Klärung der Rolle von Monozyten und Makrophagen in der Plaque[174] wäre es möglich ein Modell zu generieren, durch welches DCs z.B. durch einen genetisch inserierten Diphtherin-Toxin-Rezeptor (DTR) zur Apoptose angeregt werden. Hierdurch könnten die DCs selektiv ausgeschaltet und der Effekt auf die Atherosklerose zu verschiedenen Zeitpunkten der Deletion der DCs untersucht werden. Weiter wäre es möglich Apoprotein E knockout (Apo E -/-) Mäusen, welche schnell eine Atherosklerose entwickeln, diesen DTR zu inserieren und hierbei noch genauer die Fragestellung zu beleuchten.[174] Zur weiteren Spezifizierung mit Blick auf den in dieser Arbeit beleuchteten Rezeptormechanismus könnte der Anti M2 Antikörper, welcher in dieser Arbeit verwendet wurde, in Apo E -/- Mäuse injiziert und die Pathogenese der Atherosklerose histologisch untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit wäre diese Mäuse mit CD11b Knockout-Mäusen zu kreuzen und die direkte Pathogenese und die Plaqueentwicklung mit Apo E -/- Mäusen und Wildtypmäusen zu vergleichen.

Nun stellt sich die Frage der klinischen Relevanz dieser Arbeit. Bisher gibt es widersprüchliche Daten, ob DCs zur Atherogenese beitragen oder atheroprotektiv wirken.[116-118] Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben wirken DCs in der Atherosklerose auch immunmodulatorisch. Es konnte gezeigt werden, dass Aspirin, sowie auch neue P2Y₁₂- Rezeptor Antagonisten die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten reduzieren und die Rekrutierung und die weiteren Funktionen der Leukozyten schwächen.[153, 175, 176] Sollten DCs negativ auf die Atherogenese wirken, so wären diese schon gut beforschten Medikamente ein möglicher Weg der Einflussnahme auf diesen Pathomechanismus. DCs kommunizieren im atherosklerotischen Endothelabschnitt auch mit anderen Immunzellarten, wie z.B. T-Zellen über das Interleukin 12. [177, 178] Durch eine medikamentöse Hemmung der IL-12 Produktion der DCs über den untersuchten Rezeptormechanismus könnte die Aktivität anderer Leukozyten in der Atherosklerose beeinflusst werden. Eine Interaktion der Thrombozyten mit den DCs über Jam-C und Mac-1 führt zur Apoptose der DCs. Eine Inhibition dieser Interaktion führt zu einer verringerten Apoptoseneigung der antigenpräsentierenden Zellen.[35] Es bleibt zu untersuchen, ob eine Inhibition der Mac-1/GPIIb/IIIa Interaktion ebenfalls Einfluss auf die Lebensdauer der Zellarten nimmt. Diese Apoptoseneigung könnte zur Plaqueinstabilität mit erheblichen Folgen der Atherosklerose, wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall führen.[135] Hier könnte pharmakologisch über das hier untersuchte Rezeptor/Ligandenpaar Einfluss genommen werden. Eine Inhibition der Interaktion über Mac-1 und GPIIb/IIIa könnte jedoch auch Nachteile, wie eine abnehmende Zellproliferation mit der Folge einer schlechteren Regeneration des verletzten Gefäßendothels, mit sich bringen. [158] So bedarf es weiterer Forschung in dieser für viele Menschen relevanten Erkrankung.

5 Zusammenfassung

Die Atherosklerose, welche mit ihren Folgen zu den Haupttodesursachen zählt, gilt als eine chronisch inflammatorische Erkrankung. Dendritische Zellen (DCs) sind zelluläre Bestandteile des Immunsystems und verbinden den angeborenen mit dem erworbenen Teil. Es ist vorbeschrieben, dass DCs vermehrt in für die Atherosklerose prädisponierten Stellen vorkommen. Ebenfalls sind in einer atherosklerotischen Plaque DCs nachweisbar. Die Bedeutung von Thrombozyten in der Atherosklerose ist schon länger bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Endothel und Thrombozyten für die Initiierung der Atherosklerose einen entscheidenden Faktor darstellt. Sie rekrutieren proatherosklerotische Zellen und sezernieren proinflammatorische Mediatoren. Auf der anderen Seite gibt es Hinweise, dass Thrombozyten auch Reparaturmechanismen initiieren können.

Es wurde gezeigt, dass humane DCs mit Thrombozyten *in vivo* im Bereich einer Gefäßverletzung interagieren. DCs interagieren jedoch nicht mit der intakten Gefäßwand. *In vitro* vermitteln diese Interaktion unter anderem die Rezeptoren JAM-C und das Integrin Mac-1 auf DCs. Interessanterweise wird Jam-C nicht auf murinen Thrombozyten exprimiert, was auf einen alternativen Mechanismus hinweist, welcher noch nicht identifiziert wurde. Das thrombozytäre Glykoprotein GPIIb/IIIa ist Teil des von-Willebrand-Rezeptor-Komplexes. Für verschiedene Leukozyten ist bekannt, dass Thrombozyt und Leukozyt eine feste Adhäsion über GPIIb/IIIa und Mac-1 eingehen. So wurde in dieser Arbeit der Hypothese nachgegangen, dass DCs mit Thrombozyten über das Rezeptor-Ligandenpaar Mac-1 und GPIIb/IIIa in der Atherosklerose interagieren. Hierfür wurde die mögliche Interaktion von murinen, aus Knochenmark gewonnenen DCs mit murinen Thrombozyten in statischen Adhäsionsassays *in vitro*, sowie mit Hilfe der Intravitalmikroskopie *in vivo* im Mausmodell untersucht.

In vitro im statischen Adhäsionsassay zeigte sich eine Reduktion der Adhäsion von DCs an Thrombozyten nach Blockierung von Mac-1 durch einen spezifischen

Antikörper, bei Blockierung anderer Oberflächenrezeptoren auf DCs war kein Unterschied nachweisbar. Ebenfalls nach Blockierung von GPIIb/IIIa konnte eine signifikant verminderte Adhäsion von DCs an Thrombozyten *in vitro* gezeigt werden.

Um diese Ergebnisse ins Lebende zu übertragen wurde die temporäre Carotisligatur mit Intravitalmikroskopie als *in vivo*-Modell einer Gefäßverletzung ausgewählt. Fluoreszierend markierte DCs und ein blockierender Antikörper wurden einer Maus injiziert. Die Arteria carotis wurde für 5 Minuten temporär ligiert. Hierbei kam es zu einer Quetschung des Endothels und somit zu einer Gefäßverletzung. Nach Wiedereröffnung des Gefäßes wurde die Anzahl der adhären DCs an den Monolayer der Thrombozyten und somit an die Gefäßwand gemessen. Durch blockierende Antikörper, analog zu den *in vitro* Versuchen, konnte eine Reduktion der Adhäsion nach Blockierung von entweder Mac-1 auf DCs oder GPIIb/IIIa auf Thrombozyten gezeigt werden. Ebenfalls mit GPIIb/IIIa-knockout Thrombozyten zeigte sich *in vitro*, sowie *in vivo* eine Reduktion der Adhäsion von DCs an den Thrombozyten. Mittels des Anti-M2 Antikörpers konnte die Bindungsstelle *in vitro*, sowie *in vivo* mittels analogen Versuchen spezifiziert werden. Vorbekannt ist, dass die Sequenz P²⁰¹-K²¹⁷ der I-Domäne der α_M -Einheit von Mac-1 für die Bindung von GPIIb/IIIa in Neutrophilen Granulozyten zuständig ist. In dieser Arbeit konnte *in vitro* sowie *in vivo* eine signifikante Reduktion der Adhäsion von DCs auf Thrombozyten bei Blockierung der M2-Sequenz nachgewiesen werden.

In Zusammenschau der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Interaktion des Integrins Mac-1 mit dem Glykoprotein GPIIb/IIIa eine feste Adhäsion von DCs auf Thrombozyten vermittelt. Dies trägt dazu bei die Kinetik der DC-Gefäßwandinteraktion besser zu verstehen. Bereits bei anderen Leukozyten konnte dieses Rezeptor-Liganden-Paar gezeigt werden. Die Übertragung vom Tiermodell zum menschlichen Organismus, sowie die weitere Klärung der Folgen einer solchen Interaktion stellen die nächsten Schritte der Forschung dar. Bisher ist noch nicht aufgedeckt, ob diese Interaktion einen atheroprotektiven oder -progressiven Verlauf begünstigt. Nach Klärung dieser Effekte wäre ein therapeutisches Vorgehen mittels des spezifischen Antikörpers, welcher in dieser Arbeit verwendet wurde, ein mögliches pharmakologisches Mittel in der Bekämpfung der Atherosklerose.

6 Literaturverzeichnis

1. Herrington, W., et al., *Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease*. *Circ Res*, 2016. **118**(4): p. 535-46.
2. RKI and Destatis, *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=3&p_aid=30790238&nummer=517&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=78338638, 2016. abgerufen am 25.08.2016.
3. Galkina, E. and K. Ley, *Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*)*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 165-97.
4. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(9): p. 2045-51.
5. Howard, G., et al., *Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. *JAMA*, 1998. **279**(2): p. 119-24.
6. Meigs, J.B., et al., *Coronary artery calcification in type 2 diabetes and insulin resistance: the framingham offspring study*. *Diabetes Care*, 2002. **25**(8): p. 1313-9.
7. Graham, G., et al., *Impact of coronary artery calcification on all-cause mortality in individuals with and without hypertension*. *Atherosclerosis*, 2012. **225**(2): p. 432-7.
8. Talayero, B.G. and F.M. Sacks, *The role of triglycerides in atherosclerosis*. *Curr Cardiol Rep*, 2011. **13**(6): p. 544-52.
9. Yusuf, S., et al., *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study*. *Lancet*, 2004. **364**(9438): p. 937-52.
10. Herder, M., et al., *Risk factors for progression of carotid intima-media thickness and total plaque area: a 13-year follow-up study: the Tromso Study*. *Stroke*, 2012. **43**(7): p. 1818-23.
11. Strong, J.P., et al., *Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study*. *JAMA*, 1999. **281**(8): p. 727-35.
12. McGill, H.C., Jr., et al., *Association of Coronary Heart Disease Risk Factors with microscopic qualities of coronary atherosclerosis in youth*. *Circulation*, 2000. **102**(4): p. 374-9.
13. van Dijk, R.A., et al., *The natural history of aortic atherosclerosis: a systematic histopathological evaluation of the peri-renal region*. *Atherosclerosis*, 2010. **210**(1): p. 100-6.
14. Jackson, S.P., *Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly*. *Nat Med*, 2011. **17**(11): p. 1423-36.

15. Kitta, Y., et al., *Persistent impairment of endothelial vasomotor function has a negative impact on outcome in patients with coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(4): p. 323-30.
16. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
17. Davies, M.J., et al., *Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries*. Br Heart J, 1988. **60**(6): p. 459-64.
18. Zhu, S.N., et al., *GM-CSF regulates intimal cell proliferation in nascent atherosclerotic lesions*. J Exp Med, 2009. **206**(10): p. 2141-9.
19. Anderson, T.J., et al., *Endothelium-dependent coronary vasomotion relates to the susceptibility of LDL to oxidation in humans*. Circulation, 1996. **93**(9): p. 1647-50.
20. Harrison, D.G., et al., *Restoration of endothelium-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis*. J Clin Invest, 1987. **80**(6): p. 1808-11.
21. John, S., et al., *Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients: a randomized, placebo-controlled, double-blind study*. Circulation, 1998. **98**(3): p. 211-6.
22. Mancini, G.B., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study*. Circulation, 1996. **94**(3): p. 258-65.
23. Levine, G.N., et al., *Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease*. Circulation, 1996. **93**(6): p. 1107-13.
24. Andersson, J., P. Libby, and G.K. Hansson, *Adaptive immunity and atherosclerosis*. Clin Immunol, 2010. **134**(1): p. 33-46.
25. Jonasson, L., et al., *Expression of class II transplantation antigen on vascular smooth muscle cells in human atherosclerosis*. J Clin Invest, 1985. **76**(1): p. 125-31.
26. Cybulsky, M.I. and M.A. Gimbrone, Jr., *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis*. Science, 1991. **251**(4995): p. 788-91.
27. Kaartinen, M., A. Penttila, and P.T. Kovanen, *Mast cells in rupture-prone areas of human coronary atheromas produce and store TNF-alpha*. Circulation, 1996. **94**(11): p. 2787-92.
28. Sata, M., et al., *Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis*. Nat Med, 2002. **8**(4): p. 403-9.
29. Kockx, M.M., et al., *Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques*. Circulation, 1998. **97**(23): p. 2307-15.
30. Ambrose, J.A., et al., *Angiographic progression of coronary artery disease and the development of myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 1988. **12**(1): p. 56-62.
31. Brewer, D.B., *Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet*. Br J Haematol, 2006. **133**(3): p. 251-8.

32. Ribatti, D. and E. Crivellato, *Giulio Bizzozzero and the discovery of platelets*. Leuk Res, 2007. **31**(10): p. 1339-41.
33. Ghoshal, K. and M. Bhattacharyya, *Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis*. ScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 781857.
34. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1227-34.
35. Langer, H.F., et al., *Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function in vitro*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(6): p. 1463-70.
36. Gawaz, M., H. Langer, and A.E. May, *Platelets in inflammation and atherogenesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3378-84.
37. McEver, R.P., *Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation*. Thromb Haemost, 2001. **86**(3): p. 746-56.
38. Li, R. and J. Emsley, *The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex*. J Thromb Haemost, 2013. **11**(4): p. 605-14.
39. Simon, D.I., et al., *Platelet glycoprotein Ib α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 193-204.
40. Lopez, J.A. and J.F. Dong, *Structure and function of the glycoprotein Ib-IX-V complex*. Curr Opin Hematol, 1997. **4**(5): p. 323-9.
41. Kanaji, T., S. Russell, and J. Ware, *Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome*. Blood, 2002. **100**(6): p. 2102-7.
42. Tsuji, S., et al., *Role and initiation mechanism of the interaction of glycoprotein Ib with surface-immobilized von Willebrand factor in a solid-phase platelet cohesion process*. Blood, 1996. **88**(10): p. 3854-61.
43. Savage, B., E. Saldivar, and Z.M. Ruggeri, *Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor*. Cell, 1996. **84**(2): p. 289-97.
44. Kroll, M.H., et al., *Platelets and shear stress*. Blood, 1996. **88**(5): p. 1525-41.
45. Andrews, R.K., et al., *The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling*. Thromb Haemost, 1999. **82**(2): p. 357-64.
46. Okumura, T., M. Hasitz, and G.A. Jamieson, *Platelet glycolalicin. Interaction with thrombin and role as thrombin receptor of the platelet surface*. J Biol Chem, 1978. **253**(10): p. 3435-43.
47. Baglia, F.A., et al., *Factor XI binding to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex promotes factor XI activation by thrombin*. J Biol Chem, 2002. **277**(3): p. 1662-8.
48. Bradford, H.N., R.A. Pixley, and R.W. Colman, *Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 22756-63.

49. Gawaz, M., K. Stellos, and H.F. Langer, *Platelets modulate atherogenesis and progression of atherosclerotic plaques via interaction with progenitor and dendritic cells*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(2): p. 235-42.
50. Arya, M., et al., *Glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin alpha(IIb)beta(3): effects of receptor clustering and von Willebrand factor adhesion*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(6): p. 1150-7.
51. Gawaz, M., et al., *Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty*. Circulation, 1996. **93**(2): p. 229-37.
52. Bombeli, T., B.R. Schwartz, and J.M. Harlan, *Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha(v)beta3 integrin, and GPIIb/IIIa*. J Exp Med, 1998. **187**(3): p. 329-39.
53. Gawaz, M., et al., *Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction*. Circulation, 1997. **96**(6): p. 1809-18.
54. Frenette, P.S., et al., *Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7450-4.
55. Massberg, S., et al., *Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin*. Blood, 1998. **92**(2): p. 507-15.
56. Romo, G.M., et al., *The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin*. J Exp Med, 1999. **190**(6): p. 803-14.
57. Frenette, P.S., et al., *P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo*. J Exp Med, 2000. **191**(8): p. 1413-22.
58. Massberg, S., et al., *Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3829-38.
59. Huo, Y., et al., *Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E*. Nat Med, 2003. **9**(1): p. 61-7.
60. Gawaz, M., et al., *Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis*. Atherosclerosis, 2000. **148**(1): p. 75-85.
61. Hawrylowicz, C.M., G.L. Howells, and M. Feldmann, *Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production*. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 785-90.
62. Lu, B., et al., *Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice*. J Exp Med, 1998. **187**(4): p. 601-8.
63. Badnaya, S., et al., *Platelets mediate oxidized low-density lipoprotein-induced monocyte extravasation and foam cell formation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(3): p. 571-80.

64. Zarbock, A., R.K. Polanowska-Grabowska, and K. Ley, *Platelet-neutrophil interactions: linking hemostasis and inflammation*. *Blood Rev*, 2007. **21**(2): p. 99-111.
65. Herter, J.M., J. Rossaint, and A. Zarbock, *Platelets in inflammation and immunity*. *J Thromb Haemost*, 2014. **12**(11): p. 1764-75.
66. Evangelista, V., et al., *Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule*. *Blood*, 1999. **93**(3): p. 876-85.
67. Santoso, S., et al., *The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1*. *J Exp Med*, 2002. **196**(5): p. 679-91.
68. Gidlof, O., et al., *Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression*. *Blood*, 2013. **121**(19): p. 3908-17, S1-26.
69. Diacovo, T.G., et al., *A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(3): p. 1243-51.
70. Weyrich, A.S., et al., *Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(6): p. 1525-34.
71. Li, N., *Platelet-lymphocyte cross-talk*. *J Leukoc Biol*, 2008. **83**(5): p. 1069-78.
72. Nording, H.M., P. Seizer, and H.F. Langer, *Platelets in inflammation and atherogenesis*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 98.
73. Passacquale, G., et al., *Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes*. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e25595.
74. Gudbrandsdottir, S., H.C. Hasselbalch, and C.H. Nielsen, *Activated platelets enhance IL-10 secretion and reduce TNF-alpha secretion by monocytes*. *J Immunol*, 2013. **191**(8): p. 4059-67.
75. Daub, K., et al., *Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells*. *FASEB J*, 2006. **20**(14): p. 2559-61.
76. Willoughby, S., A. Holmes, and J. Loscalzo, *Platelets and cardiovascular disease*. *Eur J Cardiovasc Nurs*, 2002. **1**(4): p. 273-88.
77. Fateh-Moghadam, S., et al., *Platelet degranulation is associated with progression of intima-media thickness of the common carotid artery in patients with diabetes mellitus type 2*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(6): p. 1299-303.
78. McCarthy, M.J., et al., *Angiogenesis and the atherosclerotic carotid plaque: an association between symptomatology and plaque morphology*. *J Vasc Surg*, 1999. **30**(2): p. 261-8.
79. Virmani, R., et al., *Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(10): p. 2054-61.

80. Sakakura, K., et al., *Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression*. Heart Lung Circ, 2013. **22**(6): p. 399-411.
81. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
82. Koltsova, E.K. and K. Ley, *How dendritic cells shape atherosclerosis*. Trends Immunol, 2011. **32**(11): p. 540-7.
83. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
84. Bobryshev, Y.V., *Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance*. Eur Heart J, 2005. **26**(17): p. 1700-4.
85. Steinman, R.M. and H. Hemmi, *Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **311**: p. 17-58.
86. Tan, J.K. and H.C. O'Neill, *Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(2): p. 319-24.
87. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-61.
88. Lipscomb, M.F. and B.J. Masten, *Dendritic cells: immune regulators in health and disease*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 97-130.
89. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
90. Heath, W.R., et al., *Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens*. Immunol Rev, 2004. **199**: p. 9-26.
91. Bobryshev, Y.V., *Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis*. Micron, 2006. **37**(3): p. 208-22.
92. de Jong, E.C., H.H. Smits, and M.L. Kapsenberg, *Dendritic cell-mediated T cell polarization*. Springer Semin Immunopathol, 2005. **26**(3): p. 289-307.
93. Morel, P.A., et al., *Dendritic cells, T cell tolerance and therapy of adverse immune reactions*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(1): p. 1-10.
94. Dudziak, D., et al., *Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo*. Science, 2007. **315**(5808): p. 107-11.
95. Joffre, O., et al., *Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 234-47.
96. Mempel, T.R., S.E. Henrickson, and U.H. Von Andrian, *T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases*. Nature, 2004. **427**(6970): p. 154-9.
97. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
98. O'Neill, D.W., S. Adams, and N. Bhardwaj, *Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer*. Blood, 2004. **104**(8): p. 2235-46.

99. Arnaout, M.A., *Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18*. Blood, 1990. **75**(5): p. 1037-50.
100. Lim, K., et al., *Visualization of integrin Mac-1 in vivo*. J Immunol Methods, 2015. **426**: p. 120-7.
101. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
102. Todd, R.F., 3rd, *The continuing saga of complement receptor type 3 (CR3)*. J Clin Invest, 1996. **98**(1): p. 1-2.
103. Hyun, Y.M., C.T. Lefort, and M. Kim, *Leukocyte integrins and their ligand interactions*. Immunol Res, 2009. **45**(2-3): p. 195-208.
104. Smith, C.W., et al., *Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro*. J Clin Invest, 1989. **83**(6): p. 2008-17.
105. Diamond, M.S., et al., *The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands*. J Cell Biol, 1993. **120**(4): p. 1031-43.
106. Lee, J.O., et al., *Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18)*. Cell, 1995. **80**(4): p. 631-8.
107. Larson, R.S., et al., *Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily*. J Cell Biol, 1989. **108**(2): p. 703-12.
108. Colombatti, A. and P. Bonaldo, *The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms*. Blood, 1991. **77**(11): p. 2305-15.
109. Ehlers, R., et al., *Targeting platelet-leukocyte interactions: identification of the integrin Mac-1 binding site for the platelet counter receptor glycoprotein Ibalpha*. J Exp Med, 2003. **198**(7): p. 1077-88.
110. Wang, Y., et al., *Leukocyte engagement of platelet glycoprotein Ibalpha via the integrin Mac-1 is critical for the biological response to vascular injury*. Circulation, 2005. **112**(19): p. 2993-3000.
111. Petty, H.R. and R.F. Todd, 3rd, *Integrins as promiscuous signal transduction devices*. Immunol Today, 1996. **17**(5): p. 209-12.
112. Fan, S.T. and T.S. Edgington, *Coupling of the adhesive receptor CD11b/CD18 to functional enhancement of effector macrophage tissue factor response*. J Clin Invest, 1991. **87**(1): p. 50-7.
113. Rezzonico, R., et al., *Engagement of CD11b and CD11c beta2 integrin by antibodies or soluble CD23 induces IL-1beta production on primary human monocytes through mitogen-activated protein kinase-dependent pathways*. Blood, 2000. **95**(12): p. 3868-77.
114. Shi, C., et al., *Leukocyte integrin Mac-1 recruits toll/interleukin-1 receptor superfamily signaling intermediates to modulate NF-kappaB activity*. Circ Res, 2001. **89**(10): p. 859-65.

115. Shi, C., et al., *Integrin engagement regulates monocyte differentiation through the forkhead transcription factor Foxp1*. J Clin Invest, 2004. **114**(3): p. 408-18.
116. Llodra, J., et al., *Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(32): p. 11779-84.
117. Gautier, E.L., et al., *Conventional dendritic cells at the crossroads between immunity and cholesterol homeostasis in atherosclerosis*. Circulation, 2009. **119**(17): p. 2367-75.
118. Massberg, S., et al., *A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation*. J Exp Med, 2002. **196**(7): p. 887-96.
119. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
120. Bobryshev, Y.V. and R.S. Lord, *S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions*. Cardiovasc Res, 1995. **29**(5): p. 689-96.
121. Bobryshev, Y.V. and R.S. Lord, *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, 1995. **58**(3): p. 307-22.
122. Wick, G., et al., *Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue*. FASEB J, 1997. **11**(13): p. 1199-207.
123. Jongstra-Bilen, J., et al., *Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis*. J Exp Med, 2006. **203**(9): p. 2073-83.
124. Lord, R.S. and Y.V. Bobryshev, *Clustering of dendritic cells in athero-prone areas of the aorta*. Atherosclerosis, 1999. **146**(1): p. 197-8.
125. Galkina, E., et al., *Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1273-82.
126. Millonig, G., G.T. Malcom, and G. Wick, *Early inflammatory-immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY)-study*. Atherosclerosis, 2002. **160**(2): p. 441-8.
127. Yilmaz, A., et al., *Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques*. Atherosclerosis, 2004. **176**(1): p. 101-10.
128. Robert, C., et al., *Interaction of dendritic cells with skin endothelium: A new perspective on immunosurveillance*. J Exp Med, 1999. **189**(4): p. 627-36.
129. Weis, M., et al., *Endothelial determinants of dendritic cell adhesion and migration: new implications for vascular diseases*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(11): p. 1817-23.
130. Phillipson, M., et al., *Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2569-75.

131. Paulson, K.E., et al., *Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis*. *Circ Res*, 2010. **106**(2): p. 383-90.
132. Brossart, P., et al., *Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. *Blood*, 1998. **92**(11): p. 4238-47.
133. Shi, H., et al., *Peripheral-blood dendritic cells in men with coronary heart disease*. *Am J Cardiol*, 2007. **100**(4): p. 593-7.
134. Yilmaz, A., et al., *Predictive value of the decrease in circulating dendritic cell precursors in stable coronary artery disease*. *Clin Sci (Lond)*, 2009. **116**(4): p. 353-63.
135. Niessner, A. and C.M. Weyand, *Dendritic cells in atherosclerotic disease*. *Clin Immunol*, 2010. **134**(1): p. 25-32.
136. Yilmaz, A., et al., *Decrease in circulating myeloid dendritic cell precursors in coronary artery disease*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **48**(1): p. 70-80.
137. Kawahara, I., et al., *The expression of vascular dendritic cells in human atherosclerotic carotid plaques*. *Hum Pathol*, 2007. **38**(9): p. 1378-85.
138. Landsman, L., et al., *CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival*. *Blood*, 2009. **113**(4): p. 963-72.
139. Sun, J., et al., *Deficiency of antigen-presenting cell invariant chain reduces atherosclerosis in mice*. *Circulation*, 2010. **122**(8): p. 808-20.
140. Buono, C., et al., *B7-1/B7-2 costimulation regulates plaque antigen-specific T-cell responses and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice*. *Circulation*, 2004. **109**(16): p. 2009-15.
141. Doring, Y. and A. Zernecke, *Plasmacytoid dendritic cells in atherosclerosis*. *Front Physiol*, 2012. **3**: p. 230.
142. Manthey, H.D. and A. Zernecke, *Dendritic cells in atherosclerosis: functions in immune regulation and beyond*. *Thromb Haemost*, 2011. **106**(5): p. 772-8.
143. Ranjit, S., et al., *Differentiation of dendritic cells in monocyte cultures isolated from patients with unstable angina*. *Int J Cardiol*, 2004. **97**(3): p. 551-5.
144. Huang, D.R., et al., *Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Exp Med*, 2001. **193**(6): p. 713-26.
145. Braunersreuther, V., F. Mach, and S. Steffens, *The specific role of chemokines in atherosclerosis*. *Thromb Haemost*, 2007. **97**(5): p. 714-21.
146. Packard, R.R., et al., *CD11c(+) dendritic cells maintain antigen processing, presentation capabilities, and CD4(+) T-cell priming efficacy under hypercholesterolemic conditions associated with atherosclerosis*. *Circ Res*, 2008. **103**(9): p. 965-73.
147. Hilf, N., et al., *Human platelets express heat shock protein receptors and regulate dendritic cell maturation*. *Blood*, 2002. **99**(10): p. 3676-82.

148. Bauriedel, G., et al., *Dendritic cells in neointima formation after rat carotid balloon injury: coordinated expression with anti-apoptotic Bcl-2 and HSP47 in arterial repair*. J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(5): p. 930-8.
149. Corrales, J.J., et al., *Decreased production of inflammatory cytokines by circulating monocytes and dendritic cells in type 2 diabetic men with atherosclerotic complications*. J Diabetes Complications, 2007. **21**(1): p. 41-9.
150. Chandler, A.B. and R.A. Hand, *Phagocytized platelets: a source of lipids in human thrombi and atherosclerotic plaques*. Science, 1961. **134**(3483): p. 946-7.
151. De Meyer, G.R., et al., *Platelet phagocytosis and processing of beta-amyloid precursor protein as a mechanism of macrophage activation in atherosclerosis*. Circ Res, 2002. **90**(11): p. 1197-204.
152. Hagihara, M., et al., *Platelets, after exposure to a high shear stress, induce IL-10-producing, mature dendritic cells in vitro*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5297-303.
153. Kral, J.B., et al., *Platelet Interaction with Innate Immune Cells*. Transfus Med Hemother, 2016. **43**(2): p. 78-88.
154. Chavakis, T., et al., *High Molecular Weight Kininogen Regulates Platelet-Leukocyte Interactions by Bridging Mac-1 and Glycoprotein Ib*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(46): p. 45375-45381.
155. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
156. Hillgruber, C., et al., *Blocking von Willebrand factor for treatment of cutaneous inflammation*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(1): p. 77-86.
157. Weber, C. and T.A. Springer, *Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to alphaIIb beta3 and stimulated by platelet-activating factor*. J Clin Invest, 1997. **100**(8): p. 2085-93.
158. Zago, A.C., et al., *The importance of the interaction between leukocyte integrin Mac-1 and platelet glycoprotein Ib-a for leukocyte recruitment by platelets and for the inflammatory response to vascular injury*. Arq Bras Cardiol, 2008. **90**(1): p. 54-63.
159. Simon, D.I., et al., *Decreased neointimal formation in Mac-1(-/-) mice reveals a role for inflammation in vascular repair after angioplasty*. J Clin Invest, 2000. **105**(3): p. 293-300.
160. Rogers, C., E.R. Edelman, and D.I. Simon, *A mAb to the beta2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(17): p. 10134-9.
161. Xia, C.Q. and K.J. Kao, *Effect of CXC chemokine platelet factor 4 on differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells*. Int Immunol, 2003. **15**(8): p. 1007-15.

162. Kissel, K., et al., *Human platelets target dendritic cell differentiation and production of proinflammatory cytokines*. *Transfusion*, 2006. **46**(5): p. 818-27.
163. Hamzeh-Cognasse, H., et al., *Direct contact of platelets and their released products exert different effects on human dendritic cell maturation*. *BMC Immunol*, 2008. **9**: p. 54.
164. Maitre, B., et al., *Immature myeloid dendritic cells capture and remove activated platelets from preformed aggregates*. *J Thromb Haemost*, 2010. **8**(10): p. 2262-72.
165. Woollard, K.J. and F. Geissmann, *Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions*. *Nat Rev Cardiol*, 2010. **7**(2): p. 77-86.
166. Ley, K., Y.I. Miller, and C.C. Hedrick, *Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(7): p. 1506-16.
167. Wu, H., et al., *Functional role of CD11c⁺ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia*. *Circulation*, 2009. **119**(20): p. 2708-17.
168. Bradford, B.M., et al., *Defining the anatomical localisation of subsets of the murine mononuclear phagocyte system using integrin alpha X (Itgax, CD11c) and colony stimulating factor 1 receptor (Csf1r, CD115) expression fails to discriminate dendritic cells from macrophages*. *Immunobiology*, 2011. **216**(11): p. 1228-37.
169. Wethmar, K., et al., *Migration of immature mouse DC across resting endothelium is mediated by ICAM-2 but independent of beta2-integrins and murine DC-SIGN homologues*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(10): p. 2781-94.
170. Sengelov, H., et al., *Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils*. *J Clin Invest*, 1993. **92**(3): p. 1467-76.
171. Helft, J., et al., *GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells*. *Immunity*, 2015. **42**(6): p. 1197-211.
172. Collin, M., N. McGovern, and M. Haniffa, *Human dendritic cell subsets*. *Immunology*, 2013. **140**(1): p. 22-30.
173. Van Brussel, I., et al., *Fluorescent activated cell sorting: an effective approach to study dendritic cell subsets in human atherosclerotic plaques*. *J Immunol Methods*, 2015. **417**: p. 76-85.
174. Stoneman, V., et al., *Monocyte/macrophage suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and established plaques*. *Circ Res*, 2007. **100**(6): p. 884-93.
175. Schror, K. and K. Huber, *Platelets, inflammation and anti-inflammatory drugs in ACS and CAD*. *Thromb Haemost*, 2015. **114**(3): p. 446-8.
176. Schrottmaier, W.C., et al., *Aspirin and P2Y12 Inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes*. *Thromb Haemost*, 2015. **114**(3): p. 478-89.

177. Zhang, X., et al., *Interleukin 12 induces T-cell recruitment into the atherosclerotic plaque*. *Circ Res*, 2006. **98**(4): p. 524-31.
178. Bachetoni, A., et al., *Diltiazem impairs maturation and functions of human dendritic cells*. *Hum Immunol*, 2002. **63**(7): p. 524-33.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Innere Medizin, Abteilung Kardiologie und Kreislaufkrankungen (Chefarzt Prof. M. Gawaz), Arbeitsgruppe Kardiimmunologie unter Betreuung von Prof. Harald F. Langer durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Harald F. Langer und Manuela Sauter (Doktorandin).

Die Einarbeitung in die Versuche erfolgte durch Manuela Sauter, Dr. Marcus Olbrich, Dr. Tanja Schönberger, Frederic Emschermann und Sarah Gekeler.

Die Tierversuche wurden nach sorgfältiger Einarbeitung durch und unter Aufsicht von Manuela Sauter, Dr. Marcus Olbrich, Dr. Tanja Schönberger und Prof. Harald F. Langer, nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Tübingen (M15/13), sowie nach vorschriftgemäßer Erlangung von tierschutz- und versuchstierkundlichen Fachkenntnissen (Privatissimum) von mir selbstständig durchgeführt.

Reagenzien wurden hauptsächlich durch mich und teilweise durch Medizinische Fachangestellte des Labors hergestellt. Die Versorgung der Zellkulturen erfolgte weitgehend durch mich, teilweise durch andere Labormitarbeiter oder Medizinische Fachangestellte des Labors.

Die Versuche unter 3.1.2 und 3.1.3 wurden von Prof. Harald F. Langer durchgeführt. Die sonstigen Versuche wurden ausschließlich durch mich nach o.g. Einarbeitung und unter o.g. Aufsicht durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Manuela Sauter und Dr. Marcus Olbrich durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Herrenberg, den 24.02.2018

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Langer danke ich herzlich für die Konzeption und Betreuung meiner Arbeit, die Finanzierung und die Übernahme des Erstgutachtens.

Vielen Dank an Prof. Dr. Aicher für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Gawaz danke ich für die Bereitstellung des Labors.

Mein großer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Manuela Sauter für die freundliche Begleitung des Projektes, die Unterstützung bei allen Fragen und die zahlreichen Korrekturen der Dissertation.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter des Labors für die Beantwortung aller Fragen, Einarbeitung, Betreuung, Aufsicht, Versorgung von Zellkulturen, Vorbereitung und Hilfestellung bei Versuchen und jegliche Unterstützung im Laboralltag. Besonders zu nennen sind hier Dr. Marcus Olbrich, Sarah Gekeler, Dr. Tanja Schönberger und Frederic Emschermann.

Vielen Dank an meinen Mitdoktoranden Matthias Mezger für jeglichen Austausch und Zusammenarbeit bei der Gewinnung und Versorgung der Zellkulturen.

Herrn Bernhard Nieswandt, Würzburg und Herrn Daniel Simon, Cleveland danke ich für die freundliche Zurverfügungstellung der Antikörper.

Ich danke meinen Eltern, die mir das Studium und meinen beruflichen Werdegang ermöglicht und immer an mich geglaubt haben. Diese Unterstützung trug einen großen Teil zu dieser Arbeit bei.

Tiefe Dankbarkeit gilt meiner Frau Rebecca für das geduldige Mittragen der Höhen und Tiefen dieser Arbeit. Diese Ermutigungen gaben mir neuen Mut, nicht aufzugeben, Kraft die nächsten Schritte zu gehen und waren entscheidend diesen Weg zu beschreiten.