

Aus der Medizinische Klinik und Poliklinik I
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München-Großhadern
Direktor: Prof. Dr. med Gerhard Steinbeck

**MODULATION VON DENDRITISCHEN ZELLEN DURCH OXIDIERTES LOW
DENSITY LIPOPROTEIN**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Daniel Schmauß

aus

Augsburg

2010

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Michael Weis

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Reinhard Lorenz

Prof. Dr. med. Ulrich Hoffmann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Thomas Nickel

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR,
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2010

**Gewidmet meinen Eltern Jutta und Max Schmauß
in tiefster Dankbarkeit**

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	7
1.1 Epidemiologie der Arteriosklerose	7
1.2 Pathogenese der Arteriosklerose	8
1.3 Dendritische Zellen	11
1.4 Dendritische Zellen in der Arteriosklerose	12
1.5 OxLDL	14
1.6 Hypothesen zur Studie	15
1.7 Ziele der Arbeit	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Geräte und Chemikalien	18
2.1.1 Geräte	18
2.1.2 Chemikalien	18
2.1.2.1 Substanzen für Zellkulturmedien	18
2.1.2.2 Antikörper	19
2.1.2.3 Zytokine	20
2.1.2.4 Lösungen	20
2.1.2.5 ELISA-Kits	20
2.1.2.6 Western Blot	20
2.2 Kultivierung der DCs	22
2.3 Charakterisierung der DCs	23
2.4 Durchflusszytometrie-(FACS)-Analyse	24
2.5 LDL-Oxidierung	26

2.6 OxLDL und dessen Einfluss auf Dendritische Zellen	27
2.6.1 Endozytosekapazität und Rezeptorexpression	27
2.6.2 Western-Blot	29
2.6.3 OxLDL-Aufnahme	30
2.6.4 Blockierung der oxLDL-Aufnahme	28
2.6.5 DZ-Maturierung und -Differenzierung	30
2.6.6 Zytokin-Sekretion der DC	31
2.6.7 Intrazelluläre Proteinexpression der DC	32
2.6.8 Analyse der NF-κB -Aktivierung	34
2.6.9 NF-κB -Blockierung	36
2.7 Statistische Analyse	36
 3. ERGEBNISSE	38
3.1 Charakterisierung der Zellen	38
3.2 Endozytosekapazität und Expression von Endozytoserezeptoren	38
3.3 LOX-1 Protein und CD-36-Expression (Westernblot):	44
3.4 oxLDL-Aufnahme und Blockierung von Scavenger-Rezeptoren	47
3.5 Reifung und Differenzierung der DCs	53
3.6 Zytokinsekretion der DCs	56
3.7 Analyse des Transkriptions-Pathways	58
3.8 NFκB-Blockierung durch BAY-11-7092:	60
 4. DISKUSSION	61
 5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICKE	68
 6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	73
 7. LITERATURVERZEICHNIS	76

8. LEBENSLAUF	91
9. DANKSAGUNG	94
10. EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	95

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie der Arteriosklerose

Kaum eine Krankheit steht seit mehreren Jahrzehnten so im Blickfeld der medizinischen und biochemischen Forschung wie die Arteriosklerose. Der Begriff Arteriosklerose hat seinen Ursprung im Griechischen und bedeutet „verhärtetes Gefäß“ (arterio = Gefäß, sclerosis = Verhärtung, griechisch). Bezüglich der Nomenklatur muss man die Arteriosklerose von der Atherosklerose unterscheiden. Arteriosklerose ist ein Überbegriff, der jegliche Verdickung und Verhärtung der Arterienwand, die mit einem Elastizitätsverlust der Intima einhergeht, bezeichnet. Atherosklerose (atheros = Brei, griechisch) hingegen ist eine Form der Arteriosklerose, die vor allem durch die Ablagerung von Schaumzellen und der darauf folgenden Entstehung eines atheromatösen Plaques gekennzeichnet ist (Wick G et al., 2004). Die Arteriosklerose ist eine Erkrankung die langsam, chronisch und still verläuft, und lange symptomlos bleiben kann. Da die Erkrankung die Arterien des ganzen Körpers befällt, ist das Spektrum der klinischen Symptome breit; die wichtigsten klinischen Erscheinungsbilder der Erkrankung sind die koronare Herzkrankheit (KHK), die Zerebralsklerose, die Nephrosklerose und die periphere arterielle Verschlußkrankheit (pAVK). Risikofaktoren für die Entstehung und Progression einer Arteriosklerose sind laut Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Kardiologie: Hypertonie, Übergewicht, Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Depressionen, aber auch die individuelle Lebensweise wie kalorien- und fettreiche Ernährung, Rauchen, Stress, sowie genetische und konstitutionelle Faktoren. Die Zahl der Todesfälle durch KHK ist in den letzten 50 Jahren stetig angestiegen, und die Arteriosklerose ist nach wie vor die Todesursache Nummer eins in den westlichen Ländern. Dabei spielen vor allem die

KHK und die Zerebralsklerose eine entscheidende Rolle, da mit dem Herz und dem Gehirn die Organe betroffen sind, die am empfindlichsten auf eine Durchblutungsstörung reagieren.

1.2 Pathogenese der Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist eine multifaktorielle Krankheit, zu deren Pathogenese mehrere Hypothesen aufgestellt wurden. Die beiden wichtigsten stammen von R. Ross und D. Steinberg. Ross vertrat mit seiner „response to injury“-Hypothese die Meinung, dass eine Veränderung des Endothels und der Intima aufgrund von mechanischer Verletzung, oxidativen Radikalen oder Giften, das initiiierende Ereignis, welches zur endothelialen Dysfunktion führt, darstellt (Ross R et al., 1990). Diese Dysfunktion des Endothels führt zu einer erhöhten Permeabilität für Lipoproteine, Wachstumsfaktoren und andere Plasmabestandteile, was eine Ablagerung von Lipiden in der Gefäßwand und eine Aktivierung und Proliferation von Makrophagen und smooth muscle cells (SMCs) nach sich zieht (Wick G et al., 2004).

Steinberg hingegen postulierte in seiner „altered lipoprotein hypothesis“, dass chemisch veränderte Lipoproteine, z.B. oxidized Low-Density Lipoprotein (oxLDL), zu einer primären Ansammlung von Schaumzellen in der Intima führen, und somit eine ursächliche Rolle in der Entstehung der Arteriosklerose einnehmen (Steinberg D et al., 1990).

Ein atheromatöser Plaque ist wie folgt aufgebaut: Im Zentrum des Atheroms findet man v.a. Schaumzellen und extrazelluläre Lipide, die die sogenannte „core region“ bilden; diese ist wiederum von SMCs und einer kollagenreichen Matrix umgeben. In der Schulterregion eines Plaques findet man Immunzellen wie z.B. T-Zellen, Mastzellen, Makrophagen und Dendritische Zellen (DCs) (Stary HC et al., 1995; Jonasson L et al, 1986; Kovanen PT et al., 1995) Viele dieser Immunzellen können

andere Zellen aktivieren und inflammatorische Cytokine ausschütten (Kovanen PT et al., 1995; Hansson GK et al., 1989; van der Wal AC et al., 1994; Frostegard J et al., 1999)

Schon Mitte des 19. Jahrhunderts proklamierten die beiden berühmtesten europäischen Pathologen, Karl von Rokitansky aus Wien und Rudolf Virchow aus Berlin, dass die Inflammation eine zentrale Rolle in der Entstehung und Progression der Arteriosklerose spielt. Während Rokitansky der Entzündungsreaktion eine sekundäre Rolle zuschrieb, sah Virchow sie bezüglich ihrer Wichtigkeit für die Pathogenese als primär an (Mayerl C et al., 2006).

Die Vermutung, dass die Inflammation ein primäres Geschehen ist, wird durch die PDAY-Studie unterstützt (Wissler RW et al., 1998). Im Rahmen dieser Studie wurden mehr als 3000 arterielle Fragmente von jungen Menschen im Alter zwischen 15 und 34 Jahren, die an nicht-kardialen Ursachen verstarben, entnommen und untersucht. Es zeigte sich, dass schon bei diesen jungen Menschen Gefäßwandveränderungen zu sehen waren. Vor allem an Prädilektionsstellen für eine spätere Arteriosklerose, wie Orten mit erhöhter Strömung und vermehrten Turbulenzen, z.B. an Gefäßverzweigungen, fand man subendotheliale Akkumulationen von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wie Monozyten, Makrophagen und DCs. Aber auch T-Zellen, sowohl spezifische, als auch unspezifische wurden dort nachgewiesen.

Immunzellen wie antigenpräsentierende DCs, Mastzellen, Monozyten und Makrophagen, aber auch T-Zellen patrouillieren in den unterschiedlichsten Geweben, so auch in der Gefäßwand, auf der Suche nach Antigenen (Bobryshev YV, 2005; Hansson GK, 2001). In der Arterienwand fungiert verschiedene Moleküle wie z.B. oxLDL oder Hitzeschockprotein 60 (HSP60) als (Auto-)antigene. Beispiele für Fremdantigene sind Clamydienproteine und Cytomegalieviren (Collins RG et al.,

2000; Seifert PS et al., 1988; Buono C et al., 2002). Werden die Antigene als solche erkannt, veranlasst eine lokale Chemokinausschüttung, dass mehr und mehr Monozyten und T-Zellen in die Gefäßwand migrieren. Damit Monozyten, Makrophagen und andere Zellen durch das Endothel migrieren können, müssen sie zuerst daran adhärieren. Dafür sind Adhäsionsfaktoren wie z.B. das intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) oder das vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) verantwortlich (Ohashi R et al., 2004). Diese Faktoren werden vor allem an der Oberfläche von beschädigten Endothelzellen exprimiert. Die Monozyten differenzieren sich in der Gefäßwand durch lokalen macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) zu Makrophagen. Die detektierten Antigene binden auf der Oberfläche der Makrophagen an die so genannten Toll-like Rezeptoren (TLR). Dies führt zu einer Aktivierung des Komplementsystems und der Ausschüttung vieler proinflammatorischer Moleküle durch die Makrophagen. Ein weiterer Rezeptortyp auf Makrophagen sind die sogenannten Scavenger-Rezeptoren, wie z.B. Cluster of Differentiation (CD) 36, blood-dendritic-cell-antigen (BDCA) -1, BDCA-2 und CD 205/Lektinrezeptor (DEC 205). Über diese Rezeptoren wird oxLDL in die Makrophagen aufgenommen, was zu einer intrazellulären Cholesterinakkumulation und der Bildung von Schaumzellen führt (Ohashi R et al., 2004).

Des Weiteren spielt das T-Zell-System eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Artherosklerose, v.a. im Hinblick auf die DCs. T-Zellen werden durch die Interaktion mit APZs wie Makrophagen oder DCs aktiviert (Hohlfeld R, 1997). Sie können nach ihren Oberflächenmarkern in CD4- und CD8- positive T-Zellen unterschieden werden.

Im arteriosklerotischen Plaque findet man vor allem CD4+ Zellen, darunter in erster Linie T-Helfer (Th)-Zellen (Hansson GK et al., 2006). Diese Zellen haben, wie oben beschrieben, vor allem proinflammatorische Effekte, da sie Zytokine, wie z.B.

Interferon (INF) γ , Interleukin (IL) 12, IL18, Tumor Nekrose Faktor (TNF) α/β oder Leukotrien A ausschütten.

All diese Cytokine wirken synergistisch, und führen wiederum zur Produktion von vielen zytotoxischen und inflammatorischen Molekülen und Proteasen in Makrophagen und einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen auf aktivierten Endothelzellen (Hansson GK, 2001; Hansson GK et al., 2006). Die pathogenetische Relevanz proinflammatorischer Zytokine wird dadurch verdeutlich, dass die Entstehung einer Arteriosklerose bei ApoE-Knockout Mäusen, denen INF- γ oder dessen Rezeptor fehlte, verhindern werden konnte (Gupta S et al., 1997; Whitman SC et al., 2002).

1.3 Dendritische Zellen

DCs nehmen unter den APZs eine Schlüsselrolle ein. Die DCs stellen eine heterogene Familie von Zellen dar, deren Hauptaufgabe es ist, das Immunsystem zu regulieren. Sie stammen von Leukozyten-Vorläuferzellen ab, die aus dem Knochenmark auswandern und über den Blutkreislauf in periphere Gewebe gelangen (Zhou LJ et al., 1996). Erstmals beschrieben wurden DCs von Steinman und Cohn im Jahre 1973 in der Milz einer Maus (Steinman RM et al., 1973). Bereits 1968 entdeckte Langerhans die Langerhanszelle in der Haut, von der man heute weiß, dass sie ein epidermal lokalisierter Subtyp der DC-Familie ist (Bobryshev YV, 2005). Nach Lokalisation und Rezeptorexpression werden die DCs in epitheliale DCs (Langerhans Zellen), interstitielle DCs, Monozyten generierte DCs (MGDZ), CD11-negative- und CD11-positive DCs unterteilt (Caux C et al., 2000; Randolph GJ et al., 1999; Hausser G et al., 1997). DCs gehören sowohl zum angeborenen als auch zum erworbenen Immunsystem (Lipscomb MF et al., 2002; Steinman RM et al., 2003; Heath WR et al., 2004). Als Teil des angeborenen Immunsystems sind DCs in der

Lage, auf Gefahrensignale durch die unverzügliche Bildung von Zytokinen mittels TLRs zu reagieren. Auf der anderen Seite sind DCs sehr potente APZs, die die einzigartige Eigenschaft besitzen, naive T-Zellen zu stimulieren und durch Induktion des entsprechenden Effektor-T-Zell-Phänotyps eine Th1- oder Th2-Antwort zu initialisieren. Des Weiteren können DCs Memory- und Effektor-T-Zellen stimulieren. Diese Fähigkeiten machen DCs zu einem Schlüsselement des erworbenen Immunsystems (Lipscomb MF et al., 2002; Steinman RM et al., 2003; Heath WR et al., 2004; Morel PA et al., 2003). Diese beiden wichtigen Funktionen Antigenaufnahme und T-Zell-Aktivierung werden von DCs in zwei unterschiedlichen Reifezuständen geleistet. Während die Antigenaufnahme und die Prozessierung durch immature DCs im peripheren Gewebe stattfinden, läuft die Antigenpräsentation durch mature DCs im Lymphknoten ab. Vom peripheren Gewebe gelangen die DCs durch Chemotaxis in den Lymphknoten (Bobryshev YV, 2005).

1.4 Dendritische Zellen in der Arteriosklerose

Im Jahre 1995 wurden DCs zum ersten Mal in Arterien entdeckt (Bobryshev YV et al., Arch Histol Cytol, 1995). Auch in gesunden Arterien findet man subendothelial kleine Zahlen von DCs, die so genannten vaskulären DCs (Bobryshev YV et al., Arch Histol Cytol, 1995; Kawahara I et al., 2007). Man hat jedoch herausgefunden, dass es in arterioskleroseanfälligen Arealen einer Gefäßwand mehr DCs gibt, als in arterioskleroseresistenten Arealen (Lord RS et al., 1999). Selbst in den Karotiden von Kindern im Alter von 8 Wochen bis 10 Jahren konnte man an Stellen mit großem hämodynamischen Stress und somit Prädisposition zur Arteriosklerose, Akkumulationen von DCs nachweisen (Millonig G et al., 2002). DZs „patrouillieren“ an diesen Orten auf der Suche nach Antigenen (Hansson GK et al., 2002). In arteriosklerotisch veränderten Arterien steigt die Anzahl der DCs mit der Progression

der Arteriosklerose (Bobryshev YV, 2000; Bobryshev YV et al., Cardiovasc Res, 1995). So machen DCs ca 30 % aller Immunzellen im arteriosklerotischen Plaque aus (Bobryshev YV, 2005). Dies liegt zum einen daran, dass vermehrt DCs aus dem Blut über neovaskulatorische Vasa Vasorum in den fortgeschrittenen Plaque migrieren, zum anderen tragen Monozyten, die schon in den frühesten Formen der Arteriosklerose in der Intima akkumulieren und sich zu DCs differenzieren, zu einer gesteigerten DC-Zahl bei (Bobryshev YV et al., 1998; Ross R, 1999). Auch die reduzierte Emigration von DCs im Rahmen der Plaqueprogression ist für die Akkumulation mitverantwortlich (Ludewig B et al., 2004).

In vitro Experimente haben gezeigt, dass die Adhäsion und Transmigration von DCs an bzw. durch die Endothelzellschicht gesteigert werden kann, indem man die Endothelzellen einer Hypoxie, oxLDL oder TNF- α , also allesamt Faktoren, die eine Arterioskleroseentstehung beschleunigen, aussetzt (Weis M et al., 2002). Es gibt vermehrt Hinweise, dass DCs in arteriosklerotischen Plaques in gleicher Weise an der Aufnahme und Präsentation von Antigenen beteiligt sind wie in anderen Geweben (Bobryshev YV, 2000; Bobryshev YV et al., 1998; Llodra J et al., 2004). Bobryshev et al. haben zum Beispiel herausgefunden, dass die Anzahl von DCs in para-aortalen und jugulo-digastrischen Lymphknoten, die mit arteriosklerotisch veränderten Arteriensegmenten zusammenhängen, erhöht ist, was diese Vermutung bestätigen würde (Bobryshev YV, 2000). Eine andere Studie von Bobryshev zeigte, dass DCs auch direkt in der Intima T-Lymphozyten aktivieren können (Bobryshev YV et al., 1998).

90 % der DCs eines arteriosklerotischen Plaques akkumulieren in der Schulterregion des Plaques, einem Ort, der sehr rupturanfällig ist (Bobryshev YV et al., 1998; Yilmaz A et al., 2004). Yilmaz et al. haben herausgefunden, dass 70 % der DCs in diesen Regionen Aktivitätsmarker wie z.B. CD 83 oder DC-Lamp exprimieren (Yilmaz A et

al., 2004). Dort hat man auch Zusammenschlüsse von DCs mit T-Zellen gefunden (Bobryshev YV et al., 1998; Yilmaz A et al., 2004).

Wie oben bereits erwähnt sind einige Autoantigene an der Atherogenese beteiligt. Neben dem HSP60 ist oxLDL dabei das wichtigste Autoantigen (Ohashi R et al., 2004).

1.5 OxLDL

Oxidationsprozesse und die Oxidation von Lipoproteinen im Generellen spielen eine sehr wichtige Rolle in der Entstehung und Progression der Arteriosklerose (Ohashi R et al., 2004).

OxLDL entsteht, wenn Low-Density Lipoprotein (LDL) aus dem Blut durch die Endothellschicht diffundiert, im subendothelialen Raum akkumuliert und mit Proteoglykanen der extrazellulären Matrix der Intima interagiert (Hansson GK, 2005). Dort wird das LDL durch Immunzellen, wie z.B. den DCs, über die sogenannten Scavenger-Rezeptoren in die Zelle aufgenommen, und durch das Enzym 15-Lipoxygenase und Sauerstoffradikale zu oxLDL oxidiert. OxLDL ist eine stabile Verbindung aus Arachnidonsäuren, die auf der einen Seite direkt zytotoxisch wirkt, indem sie die Bildung von freien Radikalen katalysiert; auf der anderen Seite fungiert oxLDL, wie oben beschrieben, bekanntermaßen als Autoantigen (Bobryshev YV, 2000; Zaguri R et al., 2007; Alderman CJ et al., 2002). Des Weiteren trägt oxLDL durch eine Akkumulation in Makrophagen zur Schaumzellbildung bei, und wirkt direkt chemotaktisch auf Immunzellen wie z.B. T-Zellen. Dies geschieht durch die Hochregulierung endothelialer Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM-1, VCAM-1, Lymphocyte Function-associated Antigene (LFA) und Chemokine) (Alderman CJ et al., 2002; Tontonoz et al., 1998). Darüber hinaus ist oxLDL in der Lage ausgewählte periphere T-Zellen zu aktivieren (Frostegard J et al., 1992).

Ehara et al. haben oxLDL im arteriosklerotischen Plaque nachgewiesen und erhöhte oxLDL-Serumspiegel bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom, verglichen zu Patienten mit stabiler Angina pectoris, gemessen (Ehara S et al., 2001). Dies zeigt, dass Veränderungen des oxLDL-Gehaltes bei Arteriosklerose nicht nur im Plaque, sondern auch systemisch stattfinden. Coutant et al. haben bereits gezeigt, dass oxLDL den Übergang von sich differenzierenden Makrophagen in reife DCs, also die Maturierung der DCs, fördert (Coutant F et al., 2002). Tertov et al. gelang es, oxLDL-spezifische T-Zellen und Autoantikörper im Menschen nachzuweisen, was die These, dass oxLDL eine Schlüsselrolle für die Entstehung und Induktion der Arteriosklerose hat, unterstützt (Tertov VV et al., 1998). OxLDL spezifische T-Zellen wurden auch in den Lymphknoten von apoE^{-/-} Mäusen gefunden, was ebenfalls einen klaren Zusammenhang zur Arteriosklerose herstellt (Caligiuri G et al., 1999; Nicoletti A et al., 2000).

1.6 Hypothesen zur Studie

Da DCs als einzige Zellen des menschlichen Körpers in der Lage sind, die Ausbildung spezieller T-Zellen aus naiven T-Zellen zu induzieren, erscheint die Betrachtung der Interaktion von DCs mit oxLDL besonders interessant.

Wie oben beschrieben, gibt es einige Vorarbeiten, die zeigen, dass DCs vor allem in Verbindung mit oxLDL in der Arteriosklerose eine wichtige Rolle spielen. Es ist anzunehmen, dass oxLDL von DCs aufgenommen wird. Über welche molekularen Mechanismen dies geschieht, ist bis jetzt nicht geklärt. So könnten hierbei z.B. die so genannten Scavenger-Rezeptoren eine entscheidende Rolle spielen, wobei es auch interessant wäre, zu betrachten, welcher Rezeptor in welchem Maße an der Antigenaufnahme beteiligt ist.

Unreife DCs besitzen eine hohe Endozytosekapazität. Coutant et al. konnten bereits zeigen, dass oxLDL eine Maturierung der DCs induziert (Coutant F et al., 2004). So ist anzunehmen, dass der Einfluss von oxLDL eine Verringerung der Endozytosefähigkeit bewirkt, da DCs während des Maturierungsprozesses ihre Antigenaufnahmefähigkeiten verlieren. Darüber hinaus könnte die Expression der Scavenger-Rezeptoren durch oxLDL beeinflusst werden. Da reife DCs eine hohe Anzahl an Kostimulationsmolekülen wie CD11a, CD80 und CD83 bilden, dürfte die Stimulation unreifer DCs mit oxLDL dazu führen, dass die Expression dieser Moleküle hochreguliert wird. Ebenso ist anzunehmen, dass die Differenzierung von DCs in BDCA-1- und BDCA-2-Zellen durch oxLDL induziert wird.

Ein weiteres bekanntes Merkmal reifer DCs ist die Zytokinsekretion. Auch hier kann man vermuten, dass diese durch den Einfluß von oxLDL auf unreife DCs induziert wird.

Über welchen Transkriptionspathway oxLDL-induzierte Prozesse in der DC ablaufen ist noch nicht geklärt, der Nuclear Factor -κB (NF-κB) Transkriptionsfaktor könnte jedoch eine wichtige Rolle spielen, da er bekanntermaßen bei Entzündungsvorgängen, die durch DCs vermittelt werden, große Bedeutung hat (Zhu CH et al., 2004). Auch ist es noch nicht bekannt, ob die oxLDL-bedingte Aktivierung der DCs durch die Inhibierung dieses Transkriptionsfaktors gehemmt werden kann.

1.7 Ziele der Arbeit

Das Hauptziel der vorliegenden Studie war es, die Interaktion von oxLDL und DCs zu erforschen und zu verstehen, und dadurch einen Beitrag zu einer besseren Kenntnis der Pathogenese der Arteriosklerose zu leisten.

Dazu wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Können DCs oxLDL inkorporieren?
- Welche Scavenger-Rezeptoren werden auf DCs exprimiert?
- Welche Scavenger-Rezeptoren sind an der Aufnahme von oxLDL beteiligt?
- Bedingt die Inkubation mit LDL/oxLDL bzw. Inkorporation von LDL/oxLDL Veränderungen in der:
 - Endozytosefähigkeit von DCs
 - Expression von Scavenger-Rezeptoren auf DCs
 - Expression von Kostimulationsmolekülen durch DCs
 - Differenzierung von DCs
 - Zytokinsekretion von DCs
- Über welchen Transkriptionspathway werden die Effekte von oxLDL auf die DCs vermittelt?
- Bewirkt die Inhibierung dieses Pathways eine Hemmung der Aktivierung der DCs durch oxLDL?

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Geräte

Durchflußzytometer (FACS):

FACScan Becton Dickinson, Germany

Zentrifugen: Centrifuge 5804 Eppendorf , Germany

Rotina 46 R Hettich Zentrifugen, Germany

Mikro 22 R Hettich Zentrifugen, Germany

Chemilumineszenz-Detektor Tecan Genios Multireader, Tecan, Austria

Fluoreszenzmikroskop Zeiss, Deutschland

Konfokales Mikroskop Zeiss LSM 5, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

2.1.2.1 Substanzen für Zellkulturmedien

Fetales Kalbserum (FCS) Biochrom AG, Berlin, Germany

Gentamycin Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Hepes-Puffer Gibco, Paisley, Großbritannien

L-Glutamin Biochrom AG, Berlin, Germany

Penicillin/Streptomycin Biochrom AG, Berlin, Germany

VLE RPMI-1640 Biochrom AG, Berlin, Germany

2.1.2.2 Antikörper

Fastimmune γ 2a/ γ 1 control	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA
CD1a PE anti-Human	Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, Deutschland
CD1c (BDCA-1)	Miltenyi Biotech, Deutschland
CD 11a FITC	Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, Deutschland
CD14 FITC	Becton Dickinson, Biosciences Pharmingen, Deutschland
CD 36	Abcam, USA
CD 80 FITC	Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, Deutschland
CD83 FITC	Becton Dickinson 347497 Heidelberg, Deutschland
CD 205 (DEC 205)	Biozol, USA
CD 209 (DC Sign)	Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, Deutschland
CD 303 (BDCA-2)	Miltenyi Biotech, Deutschland
Anti-human LOX-1	R & D Systems, Minneapolis, USA
Mannoserezeptor	Abcam, USA
Anti-goat IgG	R & D Systems, Minneapolis, USA
Anti-CD 36 Blockierungs-Ak	Abcam, USA,
Anti-LOX-1 Blockierungs-Ak	R&D Systems, USA
Anti-DEC-205 Blockierungs-Ak	Biozol, USA

2.1.2.3 Zytokine

Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF)	Pepro Tech Inc., Tebu Bio, USA
IL-4, rekombinant	Pepro Tech Inc., Tebu Bio, USA

2.1.2.4 Lösungen

FACS Puffer	Eigene Herstellung, siehe 2.4
RIPA Puffer	Pierce, USA

2.1.2.5 ELISA-Kits

IL-10	BenderMed-Systems, Austria
IL-12	BenderMed-Systems, Austria
IL-6	Biosource, USA
TNF- α	Biosource, USA
NF- κ B	Oxford Biomedical Research, USA

2.1.2.6 Western Blot

Commercial Gels	Invitrogen, USA
Blottingpads	Invitrogen, USA
Hs-LOX-1	Freundlicherweise von Dr. Landsberger (Uni Greifswald) zur Verfügung gestellt
Anti-rabbit-HRP conjugate	Bio-Rad, USA
ECL-Pierce	Invitrogen, USA
Visa X-Omat	Kodak, USA

2.1.2.7 Sonstige Substanzen und Kits

Alkaliphosphatase	DAKO Cytomation, Hamburg, Germany
Ficoll Paque Plus	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Eppala, Sweden
γ -Globuline	Octapharma Deutschland GMBH
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Germany
Cholesterin Assay	Boehringer Mannheim, Germany
Fluoreszenzassay für:	
-FITC-Dextran	SIGMA, Germany
-Lucifer-Yellow	Molecular Probes, USA
Limulus-Amöbozyten- Lysat-Assay	Labortechnik Peter Schultz, Germany
Kinetik-QCL-Test	BioWhittaker, Germany
Dil-oxLDL	Biomedical Technologies Inc, USA
Protein Array	Ray-Biotech, USA
Bay11-7082	Merck, USA
Total Lab v2.01 software	Nonlinear Dynamics, Newcastle-upon-Tyne, UK
Vybrant DiD	Molecular Probes, USA
Vybrant Dil	Molecular Probes, USA
Vybrant DiO	Molecular Probes, USA

2.2 Kultivierung der DCs

Mononukleäre Zellen wurden durch einen Ficoll Dichtegradienten nach dem Protokoll von Boyum et al. aus dem Blut von männlichen gesunden Spendern isoliert (Boyum A et al., 1976). Dafür wurde den Spendern je 100 ml peripheres Blut entnommen, und zu 100 ml Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium hinzugefügt. Je 33 ml dieser Mischung wurden in einem 50 ml Falcon vorsichtig auf 15 ml Ficoll Lösung geschichtet.

Die 50 ml Falcons wurden bei 20 Grad Celsius 25 Minuten lang bei 2500 x g zentrifugiert.

Es bildete sich eine Interphase aus, welche die mononukleären Zellen enthielt. Diese wurde abgeerntet, und in 4 x 50 ml Falcons überführt. Anschließend wurde diese Lösung 1:1 mit RPMI-Medium verdünnt, daraufhin ein Mal bei 1500 x g für 10 Minuten und zwei Mal bei 1500 x g für 5 Minuten gewaschen. Danach wurden die Zellen in 24 ml RPMI-Kulturmedium, das pro 554 ml 4 ml Glutamin (200mmol/L), Penicillin/Streptomycin und 50 ml Fetal Calf Serum (FCS) enthielt, aufgenommen. 12 Petrischalen wurden mit je 1,5 ml eines 1:3 Gemisches aus Gamma-Globulin und Phosphate Buffered Saline (PBS) beschichtet. Nach 30 Minuten wurde der Überstand entfernt und die Zellen wurden auf die Petrischalen ausgesäät (2 ml pro Petrischale). Nach einer 2-stündigen Inkubation bei 37 Grad Celsius wurden die Platten mit dem RPMI-Kulturmedium abgewaschen. Nur die adhärenten Zellen, respektive die Monozyten, blieben auf den Platten zurück. So wurde sichergestellt, dass die Monozytenkultur eine Reinheit von bis zu 97 % aufwies.

Die Kultivierung der DCs erfolgte nach dem Protokoll von Romani et al (Romani N et al., 1996). So wurden 3 ml RPMI-Kulturmedium, das zusätzlich 3 µl Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF) (20 µl/ml) und 3 µl IL-4 (20 µg/ml)

enthielt, zu den Zellen jeder Platte dazugegeben. 1 ml des Mediums wurde alle 3 Tage durch 1 ml frischen Mediums ersetzt.

Für die Versuche wurden die Zellen (immature DCs zwischen Tag 3-6) am gewünschten Kulturtag folgendermaßen geerntet:

Die Fläche jeder Platte wurde mit einem Zellschaber zuerst horizontal, dann vertikal abgeschabt. Danach wurde die Zellsuspension (ca. 3 ml pro Platte) von der Platte abpipettiert, und je nach Anzahl der Platten in ein 15- oder 50 ml-Falcon überführt. So wurde mit allen Platten verfahren, und die Suspensionen von Platten gleicher Zellart (z.B. Negativkontrolle) gesammelt. Daraufhin wurden die Falcons 5 Minuten bei 1500 Umdrehungen gewaschen, der Überstand wurde, falls er für Experimente (z.B. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)) benötigt wurde, abgenommen, andernfalls wurde er verworfen. Die Zellen wurden ein Mal in eiskaltem PBS gewaschen (1500 x g für 5 Minuten), in 1 ml PBS resuspendiert, und anschließend wurden davon 10 µl in eine Neubauer Zählkammer überführt und die lebenden Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt.

Nach dem Auszählen von 4x16 Kleinquadrate wurden die Zellzahl/ml nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Anzahl der ausgezählten Zellen} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 / \text{Volumen}$$

2.3 Charakterisierung der DCs

Um sicherzustellen, dass es sich bei den verwendeten Zellen um immature DCs handelt, wurden sie charakterisiert. Dazu wurden die Zellen wie unter 2.4 beschrieben mit Aks gegen CD3 und CD20 inkubiert, um eine T-Zell- und B-Zell-Kontamination auszuschließen. Die DC-Morphologie wurde durch fehlendes CD14

und eine hohe Expression von CD 80, CD 86, Human Leukocyte Antigene (HLA) -DR und CD209 sichergestellt.

2.4 Durchflusszytometrie-(FACS)-Analyse

Für alle FACS Versuche wurden pro Ansatz 1×10^5 lebende Zellen verwendet. Um dies zu erreichen wurden die Falcons ein weiteres Mal 5 Minuten lang bei 1500 g zentrifugiert, und das entstandene Zellpellet wurde in einer so großen Menge FACS-Puffer (4°C) aufgenommen, dass sich 1×10^5 Zellen in 100 μl FACS-Puffer befanden. Der FACS-Puffer wurde von uns selbst hergestellt und bestand aus PBS mit 0,5 % Bovinem Serum Albumin (BSA) und 0,05 % Natriumazid (NaN_3). Aus der entstandenen Suspension wurden jeweils 100 μl bzw 1×10^5 Zellen entnommen und in ein FACS-Röhrchen überführt.

Als nächsten Schritt erfolgte die Inkubation der DCs mit dem bzw. den jeweiligen FACS- Ak(s). Dies erfolgte nach den Gebrauchsanleitungen der Hersteller, bzw. mit 5 bis 20 $\mu\text{g/ml}$. Hierbei war darauf zu achten, dass die Zellen keiner unnötigen Erwärmung oder Lichteinstrahlung ausgesetzt wurden. So wurden die FACS-Röhrchen auf Eis gestellt und die FACS-Antikörper (Ak) möglichst rasch zu den schon vorgelegten Zellen pipettiert. Um die Inkubation so effektiv wie möglich zu gestalten, war es wichtig, die Röhrchen gut zu vortexen, bevor sie für die Zeit der Inkubation in den Kühlschrank (4°C) gestellt wurden. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die jeweilige Inkubationszeit und die Konzentrationen der Ak. Die Konzentration der verwendeten Ak wurde gemäß der Herstellerangaben gewählt. Es wurden Fluorescein-isothiocyanat (FITC) gelabelte oder Phycoerythrin (PE) gelabelte Aks verwendet.

Tabelle 1: Übersicht über die Inkubationszeit der verwendeten Aks

Antikörper	Inkubationszeit	Ak-Konzentration
ISO-FITC Mouse IgG1	30 min	1 : 150
CD 11 a FITC	30 min	1 : 100
CD 14 FITC	30 min	1 : 100
CD 36 PE	60 min	1 : 100
CD 80 FITC	30 min	1 : 100
CD 83 FITC	30 min	1 : 100
DEC 205 FITC	30 min	1 : 100
DC-Sign	30 min	1 : 100
BDCA-1 FITC	30 min	1 : 100
BDCA-2 FITC	30 min	1 : 100
LOX-PE	60 min	1 : 100
PE-goat-anti-mouse (Sekundär-Aks für CD 36 und LOX-1)	30 min	1 : 50
Mannoserezeptor	60 min	1 : 100
Mannosesek. (Sekundär-Aks für Mannoserezeptor)	30 min	1 : 50
Anti-CD 36 Blockierungs-Ak	240 min	1 : 2000
anti-LOX-1 Blockierungs-Ak	240 min	1 : 500
anti-DEC-205 Blockierungs-Ak	240 min	1 : 500

Die DCs eines Ansatzes wurden entweder mit nur einem Ak (FITC- oder PE-gelabelt; Einfachfärbung), oder mit zwei Aks inkubiert, wobei in diesem Fall der eine Ak FITC-gelabelt war, und der andere PE-gelabelt (Doppelfärbung). Da einige der Aks unkonjugiert, also weder FITC- noch PE-gelabelt sind, benötigten sie einen konjugierten Sekundär-Ak, der an den Primär-Ak bindet, und ihn so detektierbar macht.

Nach der Inkubation mussten die nicht-gebundenen Ak aus der Lösung heraus gewaschen werden. Dazu wurden in jedes Röhrchen 500 µl FACS-Puffer gegeben, und diese 5 Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und falls erforderlich wurde nun ein zweiter Ak oder ein Sekundär-AK in das betreffende Röhrchen pipettiert. Für Phänotyp-Analysen wurden die Zellen nach der letzten Inkubation gewaschen und vor der Analyse mit dem FACS-Gerät mit 1% Paraformaldehyd fixiert.

Somit waren die Proben analysebereit.

Alle Aks wurden mit der Isokontrolle verglichen.

2.5 LDL-Oxidierung

Das LDL (Dichte=1,019 bis 1,063 g/ml) wurde durch sequentielle Ultrazentrifugation aus dem Plasma normolipämischer, gesunder, freiwilliger Probanden isoliert, und in PBS, das 2 mmol/L Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA) enthielt, gelagert (Brand K et al., 1997). Unmittelbar vor der Oxidierung wurde das EDTA aus dem LDL isoliert, indem es über eine PD 10 Säule gegeben wurde. Das LDL wurde in Ham's F-10 Medium durch die Zugabe von 5µmol/L Kupfersulfat (CuSO₄) bei 37°C oxidiert (Brand K et al., 1997). Für die beschriebenen Experimente wurde das Präparat dialysiert bevor es zu den kultivierten Zellen gegeben wurde. Die Proteinkonzentration wurde durch die Lowry-Methode bestimmt, und der

Cholesteringehalt wurde durch einen Cholesterinassay festgestellt. Thiobarbituratsäure-reaktive Substanzen (TBARS) wurden wie beschrieben gemessen; der initiale TBARS-Wert lag unter 0,1 nmol Malondialdehyd-Equivalente/mg Protein. Maßnahmen, um während der Lipoprotein-isolierung und -oxidation und während der Experimente eine Endotoxinkontamination zu vermeiden, beinhalteten die Verwendung von pyrogen-freiem Wasser, Reagenzien und Kulturbesteck. Die Endotoxinkontamination wurde durch den Limulus-Amöbozyten-Lysat-Assay und den Kinetik-QCL-Test gescreent. Nur Lipoprotein-Aufbereitungen mit einem Endotoxingehalt von <10 pg/mL wurden für die Experimente benutzt. Diese Konzentration ist mit der oxLDL Konzentration in Plaques vergleichbar, und ist in vorhergehenden Studien verwendet worden (Weis M et al., 2002; Coutant F et al., 2004; Nishi K et al., 2002). In einigen Kontrollexperimenten wurde natives LDL in einer Konzentration von 10 µg/ml bzw 100 µg/ml verwendet.

2.6 OxLDL und dessen Einfluss auf Dendritische Zellen

2.6.1 Endozytosekapazität und Rezeptorexpression

Es ist bekannt, dass sich die DCs im Laufe ihrer Reifung phänotypisch verändern (Bobryshev YV, 2005). Auch die Endozytosekapazität und die Rezeptorexpression unterliegen Veränderungen in den verschiedenen Reifestadien. Die Wirkung von oxLDL auf die Endozytose und die Expression der Rezeptoren ist deshalb von großem Interesse.

Dazu wurden DCs wie unter 2.2 beschrieben angezüchtet, und am 6. Kulturtag nach 24-stündiger Stimulation der Zellen mit oxLDL (10µg/ml) oder ohne oxLDL-Stimulation geerntet. Die Expression verschiedener Scavangerrezeptoren (CD 36

und Lectin-like Oxidized Low-Density Lipoprotein type 1 (LOX-1) und Rezeptoren für Endozytose (DEC 205, Mannoserezeptor (MR)) auf humanen DCs wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert, nachdem die Zellen, wie unter 2.4 beschrieben, für die FACS-Analyse vorbereitet wurden.

Die Phagozytosekapazität der DCs wurde mit einem Fluoreszenz-Assay, der FITC-Dextran als Marker für Makropinozytose und Lucifer-Yellow als Marker für Phagozytose verwendet, untersucht. Die Zellen wurden in 10 % PBS Medium resuspendiert und eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Die Internalisierung wurde auf Eis mit kaltem FACS-Puffer gestoppt. Die Zellen wurden in diesem Puffer drei Mal bei 4°C gewaschen und mit Fluoreszenz-Reader, FACS und konfokaler Mikroskopie analysiert. Vybrant DiD wurde als Marker für die Zellmembran verwendet.

2.6.2 Western-Blot

Leider existieren nur wenige Publikationen für die Expression von LOX-1 auf DCs, und diese Expression ist vor allem auf unreifen DCs beschrieben worden (Delnesto Y et al., 2002). Aufgrund dieser unzureichenden Informationslage ergänzten wir unsere Durchflusszytometer-Ergebnisse durch Westernblot-Daten. Dazu wurden DCs wie unter 2.2 beschrieben, angezüchtet, und am dritten, vierten, fünften und sechsten Kulturtag wurden jeweils DCs (10^6 Zellen/mL) geerntet und mit RIPA-Puffer lysiert. Die Proteinkonzentration wurde anhand des standardisierten Pierce-Protokolls gemessen. Die Commercial-Gels wurden mit in Probe-Puffer gelösten Proben befüllt und bei 200V für 30-60 Minuten laufen gelassen. Das Blotting wurde auf Nitrozellulose-Membranen (blottingpads) bei 80V über 3h durchgeführt. Die Membranen wurden mit Panceau-Lösung angefärbt um die Blotting-Qualität zu kontrollieren und danach mit dem Pulver entrahmter Milch abgesättigt. Der Hs-LOX-1-Ak detektiert die C-type-lectin-like Domäne (amino acid 143-273) des humanen

LOX-1-Rezeptor, und wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. Landsberger (Universität Greifswald; Deutschland) zur Verfügung gestellt. Der Ak wurde in einer Milchpuder-Lösung verdünnt (1:2000) und bei 4°C für 12h inkubiert. Für den Nachweis von CD36 verwendeten wir einen monoklonalen Ak, der in Milchpuderlösung 1:200 verdünnt, und bei 4°C für 12 Stunden inkubiert wurde. Der Antigen-Ak-Komplex wurde durch den Zusatz von Anti-rabbit-Horse-Radish-Peroxidase (HRP) in einer Verdünnung von 1:1000 (LOX-1) bzw. 1:2500 (CD36) mit Hilfe des ECL-Pierce Chemilumineszenz-Detektions-Systems, sichtbar gemacht. Die Entwicklung erfolgte mit dem Kodak visa X-Omat.

Die quantitative Analyse der Westernblots durch Densitometrie wurde mit der Histogramm-Funktion der Photoshop 7.0 Software durchgeführt.

2.6.3 OxLDL-Aufnahme

Um die Wirkung von oxLDL auf die DC zu untersuchen, ist es wichtig zu erfahren, ob oxLDL von der DC aufgenommen wird.

Die DCs wurden wie unter 2.2 beschrieben, angezüchtet, und am sechsten Tag der Kultur mit 1,1'-dioctadecyl-3.3.3',3'-tetramethyl-lindocarbocyanine perchlorate (Dil) - markiertem oxLDL (10 µg/ml) bei 37°C für 60 Minuten inkubiert (Thiery J et al., 1996). Daraufhin wurden die DCs wie unter 2.2 nachzulesen, geerntet; die aufgenommene Dil-oxLDL-Fraktion wurde mit konfokaler Mikroskopie untersucht und mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Zellen wurden wie in Punkt 2.4 für die FACS-Analyse vorbereitet. Vybrant DiO wurde als Marker der Zellmembran verwendet, und Vybrant Dil als Negativkontrolle.

2.6.4 Blockierung der oxLDL-Aufnahme

Neben der Tatsache, ob oxLDL von DCs aufgenommen wird, ist es natürlich auch essentiell, über welche Rezeptoren dies geschieht. Um dies zu beantworten, wurden humane DCs, wie unter 2.2 beschrieben, kultiviert. Diese wurden am sechsten Tag der Kultur, wie unter 2.2 und 2.4 beschrieben, mit Dil-oxLDL (10 µg/ml) ± Blockierungs-Aks gegen CD 36, LOX-1 und DEC-205 für vier Stunden bei 4°C inkubiert, geerntet und für die FACS-Analyse vorbereitet. Die jeweils inkorporierte Dil-oxLDL Fraktion wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. Um unspezifische Blockierungsaktivität zu erfassen, wurden IgG-Kontroll-Aks verwendet.

2.6.5 DZ-Maturierung und -Differenzierung

Coutant et al konnten bereits zeigen, dass oxLDL Einfluß auf die Reifung DCs hat (Coutant F et al., 2004). Da DCs wie eben erwähnt, in den verschiedenen Reifestadien unterschiedliche Phänotypen und Fähigkeiten haben, ist der Effekt von oxLDL auf die Maturierung weiterhin von großem Interesse. Aber auch die Differenzierung in BDCA-1/-2 spielt eine große Rolle für das Immunsystem, und findet deshalb in dieser Arbeit ebenfalls Beachtung. DCs wurden, wie unter 2.2 beschrieben, kultiviert. Am sechsten Tag der Kultur (+/- 24-stündiger Inkubation mit 10 µg/ml oxLDL) wurden die Zellen, wie unter 2.2 und 2.4 beschrieben, inkubiert, und der Maturierungsstatus anhand der Expression von CD 83, CD11a und CD14 mit Durchflusszytometrie bestimmt. Um die Differenzierung zu kontrollieren wurde die Expression von BDCA-1/-2 per Durchflusszytometrie gemessen.

2.6.6 Zytokin-Sekretion der DC

Da die DC als antigenpräsentierende und entzündungsvermittelnde Zelle im Körper allgemein und im atherosklerotischen Plaque im Speziellen eine herausragende Bedeutung hat, ist die Beeinflussung der Zytokin-Sekretion durch oxLDL ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit.

Um dies zu untersuchen wurden wie in Punkt 2.2 beschrieben, die Überstände humaner DC-Kultur (+/- 24-stündiger Inkubation mit 10 µg/ml oxLDL) abgenommen und bei -80°C gelagert, bis sie auf den Gehalt an IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- α analysiert wurden. Diese Zytokine wurden mit Zytokin-spezifischen ELISA-Kits nachgewiesen. Dies wurde folgendermaßen durchgeführt: Die benötigten Mikrowell-Streifen wurden zweimal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dieser Waschpuffer wurde hergestellt, indem man dem vom Hersteller bereitgestellten Waschpufferkonzentrat destilliertes Wasser im Verhältnis 1:20 dazugab. Danach wurde je 100 µl Assay-Puffer, der in gleicher Weise wie der Waschpuffer aus einem bereitgestellten Konzentrat hergestellt wurde, in alle Standard-Wells gegeben. Um die Standard-Lösung herzustellen, wurden 100 µl IL-10-Standard-Lösung (bereitgestelltes IL-10 Konzentrat 1:8 mit Assay-Puffer vermischt) in das Well A pipettiert, durch Aspiration und Ejektion vermischt, und in Well B transferriert. Dies wurde fünf Mal wiederholt (bis Well G), und die überschüssigen 100 µl anschließend aus Well G entnommen und verworfen. So erreichte man, dass man Standard-Lösungen in Konzentrationen von 200 bis 3,1 pg/ml hatte. Danach wurden 100 µl Assay-Puffer in das leere Well H gegeben. In alle Wells, die für Proben vorgesehen waren (A-H Probe) wurden 50 µl Assay-Puffer gegeben, daraufhin wurde zu jedem Probe-Well 50 µl der Probe gegeben, und die Lösung vermischt. Daraufhin wurde eine 1:100 Verdünnung des vom Hersteller bereitgestellten Biotin-Konjugates in Assay-Puffer hergestellt. Je 50 µl dieser Lösung wurden in alle Wells, auch in das

Well H, gegeben. Die Platte wurde abgedeckt und zwei Stunden bei Raumtemperatur (20°C) auf einem Rotator bei 100 rotations per minute (rpm) inkubiert. Währenddessen wurde das bereitgestellte Streptavidin-HRP 1:300 in Assay-Puffer verdünnt. Nach der Inkubation wurde die Wells wie oben beschrieben, geleert und gewaschen. Je 100 µl der Streptavidin-HRP-Lösung wurde in jedes Well gegeben, darauf folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur (20°C) auf einem Rotator mit 200 rpm. Die Wells wurde wie eben beschrieben, geleert und gewaschen, danach wurden je 100 µl der vom Hersteller bereitgestellten Tetramethyl-benzidine-(TMB)Substrat-Lösung zu allen Wells gegeben, und die Platte für 10 Minuten bei (20°C) inkubiert, vorzugsweise auf einem Rotator mit 100 rpm. Die Farbentwicklung sollte beobachtet werden, und die Substratreaktion gestoppt werden, bevor positive Wells nicht mehr richtig dokumentierbar sind. Die Reaktion wurde gestoppt, indem auf jedes Well 100 µl der vom Hersteller bereitgestellten Stop-Lösung gegeben wurde. Es ist zu empfehlen, die Stop-Lösung dann dazuzugeben, wenn das Well mit dem höchsten Standard eine dunkelblaue Farbe zeigt. Die Ergebnisse müssen direkt nach diesem Schritt abgelesen werden. Der Absorptionsgrad jedes Wells wird mit Hilfe eines Spektro-Photometers mit einer primären Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Das Photometer wird anhand des „leeren“ Wells H geeicht.

2.6.7 Intrazelluläre Proteinexpression der DC

Neben den ELISA-Untersuchungen, die für die Zytokine IL-10, IL-12, IL-6 und TNF- α durchgeführt wurden, analysierten wir die intrazelluläre Proteinexpression verschiedener anderer Zytokine, die in diesem Zusammenhang von Interesse waren. Humane DCs wurden, wie unter 2.2 beschrieben, kultiviert, und am fünften Tag der Kultur in Kulturmedium für 24 Stunden mit 10µg/ml oxLDL inkubiert. Daraufhin wurde ein intrazellulärer Protein-Array auf Gamma interferon-inducible protein 10 (IP-10),

IL-4, IL13, LIGHT, Osteoprotegerin, Vascular Endothelial (VE)-Cadherin, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Oncostatin-M folgendermaßen durchgeführt: Nach der Inkubation wurden die adhärenten Zellen mit eiskaltem PBS Medium gewaschen (siehe 2.4) und zehn Minuten lang bei 4°C durch Zell-Lysepuffer, der vom Hersteller bereitgestellt wurde, lysiert. Die Proben wurden daraufhin 5 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und auf eine Konzentration von 0.25 mg/ml verdünnt (Bradford protein assay). Die Dot-Blots wurden zuerst bei 4°C für eine Stunde mit Blockierungspuffer (0.5% TWEEN 20, 0,5 g/l Casein, PBS pH 7.4) gegen unspezifische Bindung geblockt; darauf folgte eine 24-stündige Inkubation mit den Proben bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen (siehe 2.4) mit Blockierungspuffer wurden die Dot-Blots bei 4°C für weitere 24 Stunden mit Antikörperlösung, die ebenfalls vom Hersteller bereitgestellt wurde, inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen (siehe 2.4) wurden die gebundenen Antikörper-Protein-Komplexe durch eine Inkubation mit einer Mischung aus Sekundär-Antikörpern, gekoppelt an Alkaliphosphatase (Dilution 1:2000) nachgewiesen. Die Antikörper-Protein-Komplexe wurden durch Nitro-Blue Tetrazolium Chloride/5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphate p-Toluidine Salt (NBT/BCIP) nach Standardprotokollen sichtbar gemacht. Die Dot-Intensitäten wurden mit der Total Lab v2.01 software von Nonlinear Dynamics gemessen. Alle Proben wurden zwei Mal gemessen, und die densitometrische Analyse zeigte eine hohe Genauigkeit mit einer Standardabweichung von ± 13%. Proben, die (in wiederholten Messungen) verglichen mit den Kontrollen eine Differenz von ± 3 Standardabweichungen zeigten, wurden als signifikant angesehen (Krebs B et al., 2006).

2.6.8 Analyse der NF-κB -Aktivierung

Um die Frage, wie DCs durch oxLDL aktiviert werden, suffizient beantworten zu können, ist es natürlich ebenfalls wichtig zu erfahren, über welchen Transkriptionsweg die Effekte von oxLDL auf die DCs vermittelt werden. Dabei legte wir unser Hauptaugenmerk auf den NF-κB -Pathway, da er bekanntermaßen eine wichtige Rolle bei DC-vermittelten Entzündungsvorgängen spielt (Zhu CH et al., 2004).

Es wurde ein ELISA für die Quantifizierung der NF-κB -Aktivierung verwendet: Für diesen Assay wurden DCs wie unter Punkt 2.2 beschrieben, kultiviert und am fünften Tag der Kultur bei 37 C° für 24 Stunden mit oxLDL (10µg/ml oder 100µg/ml) bzw. LDL (10µg/ml oder 100µg/ml) inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen, wie unter 2.2 zu lesen ist, abgeerntet, und eine Zellkernestraktion wie unter 2.6.7 beschrieben, durchgeführt.

Die Proteinkonzentration des Extraktes wurde mithilfe eines Bradford Protein Assays bestimmt, daraufhin wurden die Proben mit bereitgestelltem Verdünnungspuffer auf eine Konzentration von 0,25 µg/µl verdünnt (Davis JN et al., 2001). Des Weiteren wurde der bereitgestellte Waschpuffer mit 450 ml deionisiertem Wasser vermischt und der NF-κB- Bindungspuffer mit 6 ml deionisiertem Wasser vermischt. Daraufhin wurde die bereitgestellte nicht spezifische DNA mit 7,5 ml der Bindungspuffer-Lösung vermischt (Arbeitskonzentration der DNA = 0,01mg/ml). Je 0,10 ml des bereitgestellten Primär-Aks (p50 und p150 spezifisch) und des bereitgestellten Sekundär-Aks wurden mit je 9,90 ml des bereitgestellten Verdünnungspuffers vermischt. Danach wurde die benötigten Verdünnungen für die Standard-Kurve nach Herstellerangaben präpariert, indem in 7 beschrifteten Verdünnungsröhrchen für die Standard-Lösungen (S1-7) durch Vorlage von Verdünnungspuffer und Transfer von jeweils 0,2 ml von Röhrchen zu Röhrchen in absteigender Reihenfolge bestimmte

NF-κB-Konzentrationen erreicht wurden (von 25000 pg/ml in S7 bis 250 pg/ml in S1).

Des Weiteren gab es ein Kontroll-Röhrchen B0, in dem sich kein NF-κB befand. Nun wurden auf jedes Well der ELISA-Platte 60 µl der DNA-enthaltenden NF-κB-Bindungspuffer-Lösung gegeben. Jedes Well, egal ob Standard, Kontrolle oder Probe wurde in zweifacher Ausführung angelegt. Daraufhin wurden je 40 µl der Standards oder der verdünnten Proben zu den Wells gegeben. Danach wurde die Platte bei Raumtemperatur und gleichmäßigem orbitalem Schwenken zwei Stunden lang inkubiert. Zum Waschen wurde die Platte umgedreht und entleert, 300 µl Waschpuffer wurden hinzugefügt, und nach 2 Minuten wurde die Platte abermals entleert. Dies wurde vier Mal wiederholt, und die Platte danach kopfüber auf einem Tuch getrocknet. Anschließend wurden 100 µl der Primär-Ak-Lösung in jedes Well pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte wie eben beschrieben drei Mal gewaschen. Der Schritt wiederholte sich daraufhin mit der Sekundär-Ak-Lösung, ebenfalls mit drei Mal Waschen. Zu guter Letzt wurden 100 µl des bereitgestellten Enzym-Substrats in jedes Well gegeben und die Platte in den Chemilumineszenz-Detektor Tecan Genios Multireader gegeben und gemessen.

Die RLU's der Standards (B0 bis S7) wurden gemittelt und eine Standardkurve erstellt, indem die Standard-Konzentrationen (auf der x-Achse in pg/ml) gegen die RLU-Werte (auf der y-Achse) aufgetragen wurden. Die Korrelationskonstante r^2 ist typischerweise 0,99. Anhand der erzielten RLU-Werte der Proben konnte so auf die entsprechende NF-κB-Konzentration in pg/ml geschlossen werden. Danach wurde die jeweilige NF-κB-Konzentration durch den Proteingehalt der Probe in mg/ml geteilt um den Verdünnungsfaktor zu eliminieren. So konnte man den Gehalt an NF-κB in pg/mg Protein ausdrücken.

2.6.9 NF-κB -Blockierung

Die Blockierung des NF-κB -Pathways und die Untersuchung der damit verbundenen Veränderungen der oxLDL-abhängigen Aktivierung der DCs, ist eine gute Möglichkeit, die Ergebnisse der Analyse der NF-κB -Aktivierung zu überprüfen bzw. zu bekräftigen.

Für diese Blockierungsexperimente wurde der spezifische Inhibitor der NF-κB Aktivierung Bay11-7082 benutzt. Bay11-1082 inhibiert die IκBa-Phosphorylierung, und vermeidet dadurch dessen Ubiquitin-Proteasomen-vermittelten Abbau, was wiederum zu einer Antagonisierung der NF-κB -Aktivierung führt (Kamthong PJ et al., 2001). DCs wurden, wie unter 2.2 beschrieben, kultiviert. Am vierten Tag der Kultur wurden die DCs mit BAY (10μM) inkubiert. Am fünften Tag der Kultur wurde oxLDL (10μg/ml) zu den Zellen gegeben. Am sechsten Tag der Kultur wurden die DCs wie unter Punkt 2.2 beschrieben, geerntet, und die Expression von BDCA-1/-2, CD83, CD209, CD11a and CD36 wurde, wie unter Punkt 2.4 beschrieben, mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

2.7 Statistische Analyse

Die Daten sind als Mittelwert +/- standart error of mean (SEM) dargestellt. Es wurde der Kolmogorov-Smirnov Test verwendet, um festzustellen, ob die Daten normal verteilt sind. Wenn dies der Fall war, wurde der ungepaarte t-Test verwendet um die beiden Gruppen zu vergleichen. Daten, die nicht normal verteilt waren, wurden anhand des Wilcoxon signed Rank Test verglichen. Unterschiede zwischen den Mittelwerten wurden als signifikant angesehen, wenn $p<0.05$ war, und als hochsignifikant, wenn $p<0.01$ war. Alle in-vitro-Experimente wurden mindestens drei Mal mit verschiedenen Zell- und Lipoproteinaufbereitungen wiederholt. Für die

statistische Analyse wurde SPSS (Version 16, Leibnitz Rechenzentrum München) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Zellen

Die verwendeten Zellen zeigten hohe Expressionen von CD80, CD86, HLA-DR und CD209, und eine zu vernachlässigend kleine Expression von CD3, CD14 und CD20. Damit konnte man sicher davon ausgehen, dass es sich bei den verwendeten Zellen um immature DCs handelt.

3.2 Endozytosekapazität und Expression von Endozytoserezeptoren

Unreife DCs haben eine hohe Endozytosekapazität. Der Einfluß von oxLDL (10 µg/ml) auf die Endozytosekapazität wurde anhand von Endozytoseassays und der Expression von endozytoserelevanten Rezeptoren in der Durchflusszytometrie gemessen.

Die Aufnahme von FITC-Dextran, einem Marker für die Makropinozytose (-15±2%; p<0.05; Abbildungen (Abb) 1a,b) und die Aufnahme von Lucifer-Gelb ein Marker der rezeptorabhängigen Phagozytose (-14±1%; p<0.05), wurden durch oxLDL signifikant verringert (Abb. 1b). Die Aufnahme von FITC-Dextran wurde anhand von konfokaler Mikroskopie dargestellt (Fotos 1a-f). Dabei ist zu sehen, dass das FITC-Dextran um den Zellkern herum akkumuliert. Foto 1f visualisiert die verminderte Aufnahme von Fitc-Dextran durch den Einfluß von oxLDL.

Abb. 1a,b und Fotos 1a-f: Einfluß von oxLDL auf die Endozytoseaktivität der DC

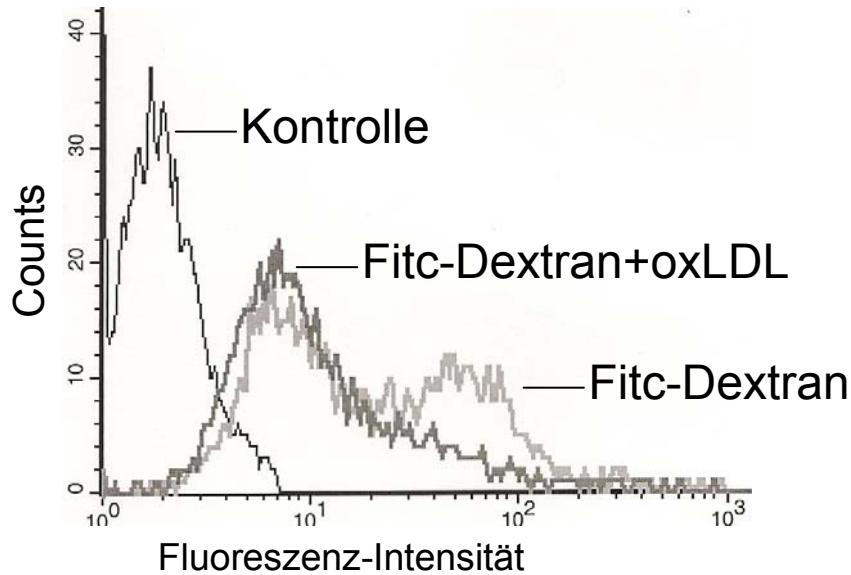


Abb. 1a: Repräsentative Beispiele der Fitc-Dextran-Aufnahme durch DCs bei 37°C.

Die erste Kurve (schwarz) repräsentiert die Kontrollen. Die zweite Kurve (dunkelgrau) zeigt die Fitc-Dextran-Aufnahme der DCs nach Vorstimulation mit oxLDL für 24 Stunden. Die dritte Kurve (hellgrau) repräsentiert die unstimulierte Fitc-Dextran-Aufnahme. (n=5)

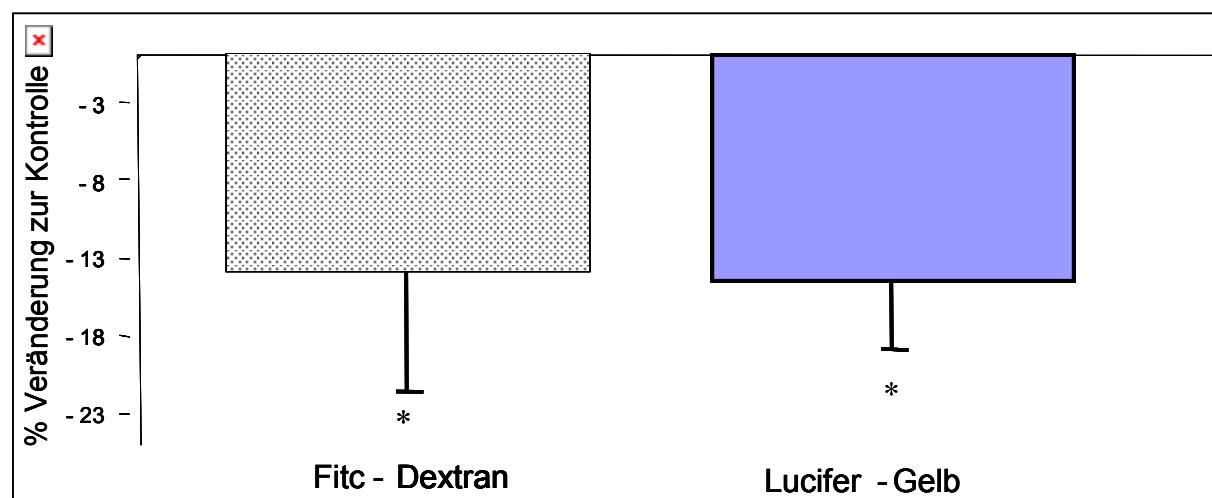


Abb. 1b: Phagozytose-assay: Die Makropinozytose (Aufnahme von FITC-Dextran) und die rezeptorabhängige Phagozytose (Aufnahme von Lucifer-Gelb) wurden durch oxLDL (10 μ g/ml) signifikant verringert. (*= p<0.05; **= p<0.01; n=5)

Fotos 1a-f: Repräsentative Darstellungen der intrazellulären Verteilung von FITC-Dextran, das durch DCs aufgenommen wurde (konfokale Mikroskopie; 65 fache Vergrößerung).

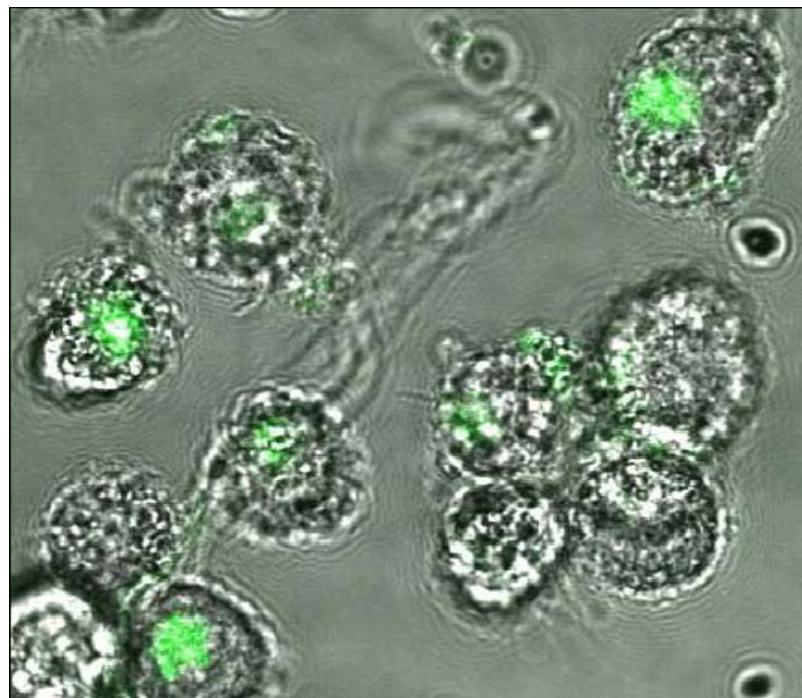


Foto 1a: DCs (Tag 5) mit typischen Schleieren haben FITC-Dextran aufgenommen.



Foto 1b: Konfokale Z-Serien ($0,5\mu\text{m}$) einer DC, die die Verteilung von aufgenommenem FITC-Dextran zeigen.

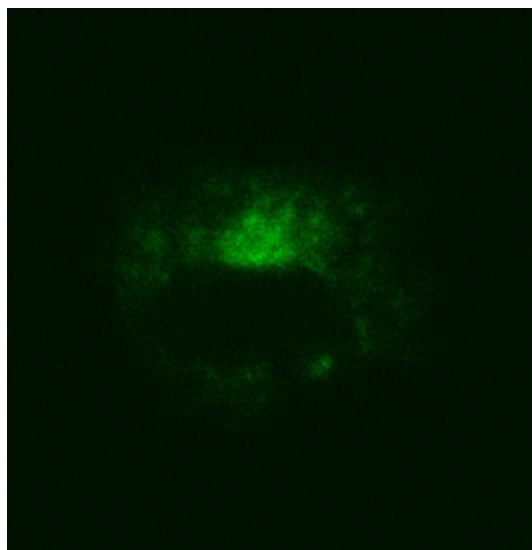


Foto 1c: Grüne Farbe: die intrazelluläre Verteilung von Fitc-Dextran.

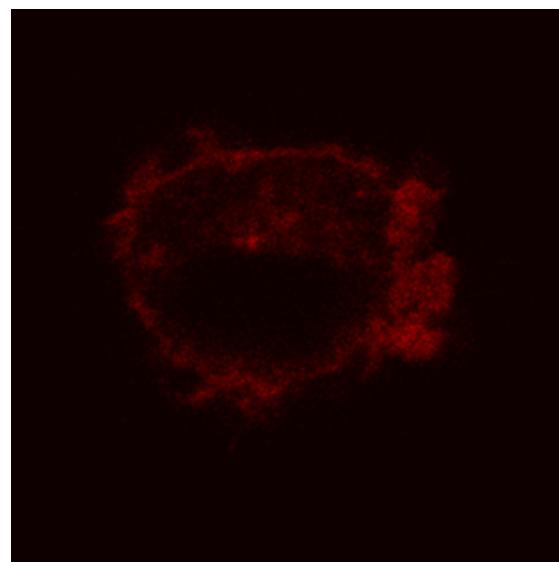


Foto 1d: Rote Farbe: Vybrad-DiD repräsentiert die Zellmembran.

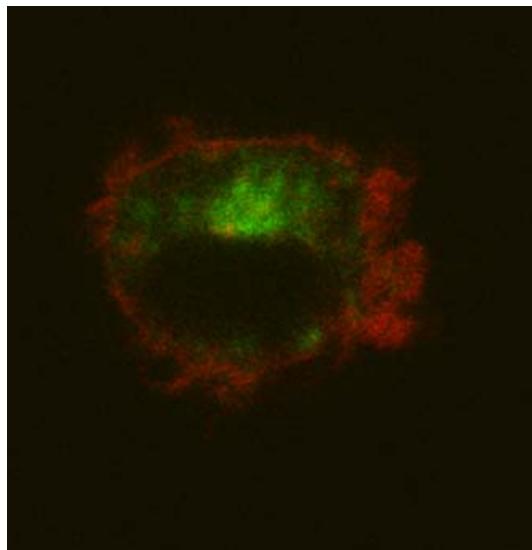


Foto 1e: Fusion der Abbildungen von Fitc-Dextran und Vybrad-DiD.

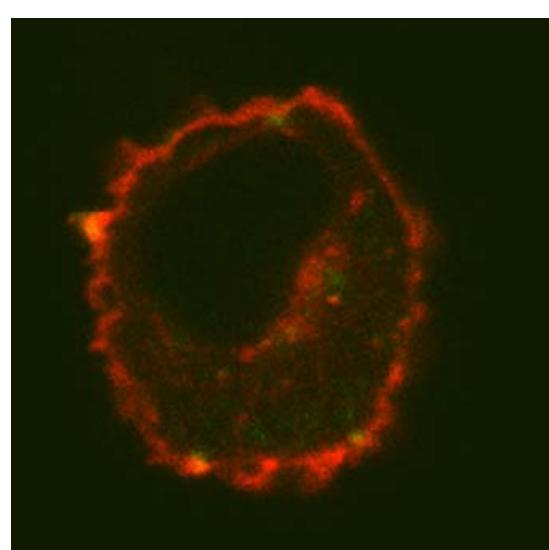


Foto 1f: Fusion der Abbildungen von Fitc-Dextran und Vybrad-DiD nach 24 stündiger oxLDL-Stimulation.

Die Analyse der Expression der Scavenger-Rezeptoren mit Hilfe der Durchflusszytometrie zeigte folgendes: Die Expression des MR (CD206; ein

Endozytoserezeptor für die Aufnahme von Glukose-konjugierten Proteinen) wurde durch oxLDL um -36 % ($p<0.05$) herunterreguliert (Abb. 2a,b). Im Gegensatz dazu wurde die Expression von DEC205 (CD205), einem DC-spezifischem Rezeptor, der relevant für die Aufnahme von viralen Antigenen ist (Guo M et al., 2000), um +77% ($p<0.05$), und damit ebenfalls signifikant, hochreguliert (Abb. 2a,b). Lox-1 wurde am sechsten Kulturtag auf der Oberfläche von 67 % der unstimulierten DCs nachgewiesen (Abb. 2a,c). Bei DCs, die 24 Stunden mit oxLDL inkubiert wurden, zeigte sich kein Unterschied in der Lox-1 Expression. CD36 hingegen wurde von 51% der unstimulierten DCs exprimiert, und wurde durch den Einfluß von oxLDL um weitere 30 % ($p<0,05$) hochreguliert (Abb. 2a,c).

Abb. 2 a-c: Der Einfluß von oxLDL auf die Expression von Scavenger-Rezeptoren

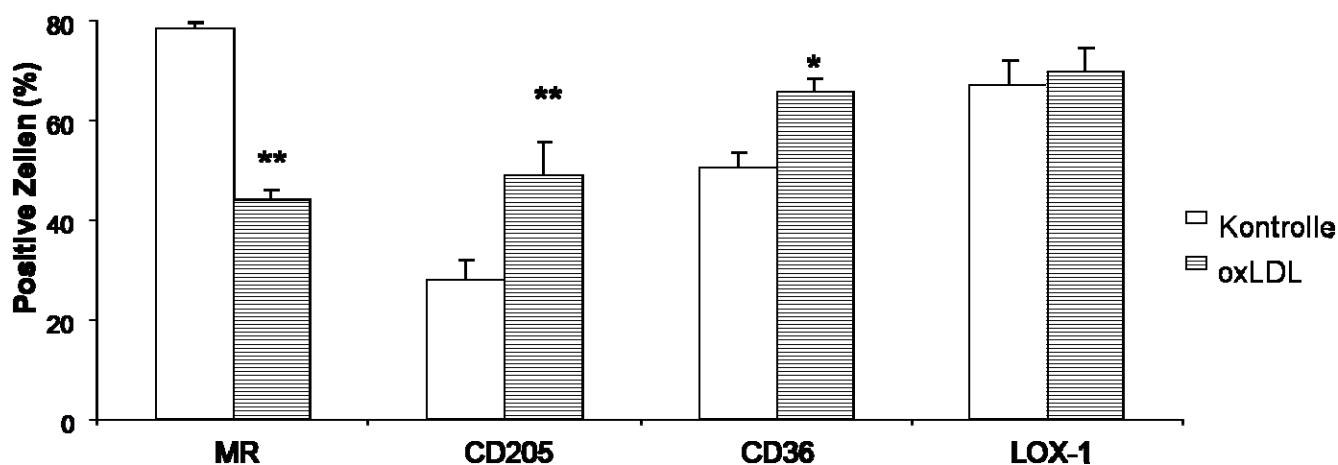


Abb 2a: Die Scavenger-Rezeptoren CD205 und CD36 (jedoch nicht LOX-1) wurden durch oxLDL hochreguliert, wohingegen der MR runterreguliert wurde (mittlere Fluoreszenz-Intensität; FACS-Analyse).

* $p< 0.05$; ** $p<0.01$; positive Zellen (schraffiert) versus unstimulierte Kontrolle (weiß)
n=5

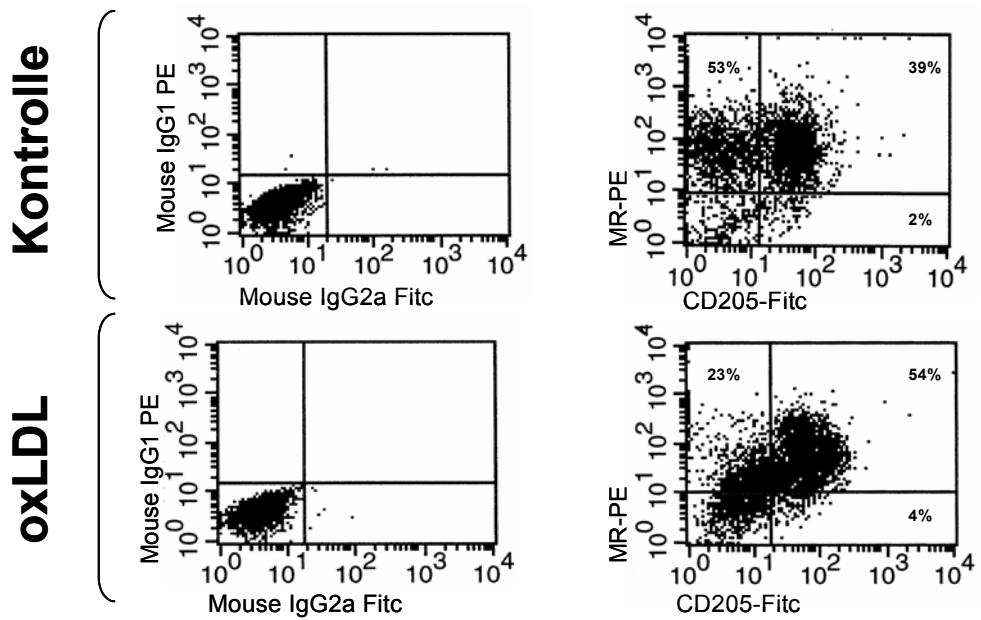


Abb. 2b

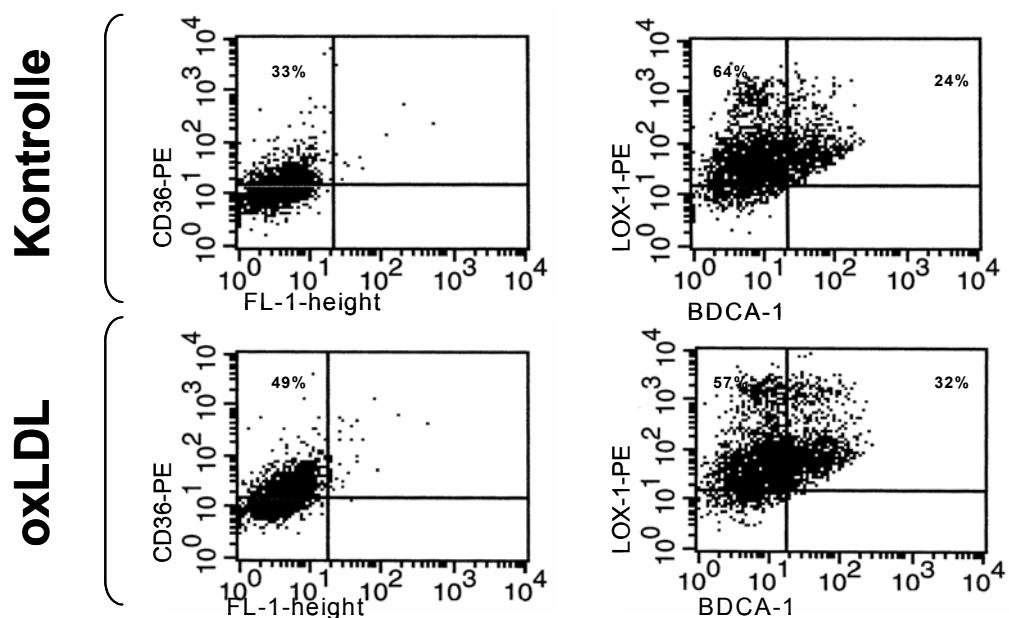


Abb. 2c

Abb. 2b/c: Repräsentative Dot Plot-Beispiele von MR, CD205, CD36 und LOX-1 (Kontrolle und oxLDL-stimuliert). Die Zahlen in den Bildern geben die Expression des jeweiligen Rezeptors in Prozent an. Um die Gesamt-Expression eines Rezeptors in Prozent zu erhalten, müssen die Prozentangaben des linken oberen und des rechten oberen Quadranten, respektive des rechten unteren und des rechten oberen Quadranten addiert werden. *p< 0.05; **p<0.01; positive Zellen versus unstimulierte Kontrolle, n=5.

3.3 LOX-1 Protein und CD-36-Expression (Westernblot):

Steinmann et al. haben bereits die Expression von CD205 auf humanen DCs beschrieben (Guo M et al., 2000), deshalb haben wir uns auf die Expression von CD36 und LOX-1 konzentriert. CD 36 ist ein bekanntes Endozytosemolekül auf DCs, das unter anderem für die Aufnahme von apoptotischen Zellen zuständig ist (Bertho N et al., 2005). Die Expression von LOX-1 auf unreifen DCs wurde kürzlich beschrieben (Delneste Y et al., 2002). Aufgrund dieser unzureichenden Informationslage haben wir unsere Durchflusszytometer-Ergebnisse durch Westernblot-Daten ergänzt, vor allem im Hinblick auf die Expression von LOX-1 auf reifen DCs (Delneste Y et al., 2002). Auf der einen Seite konnten wir zeigen, dass LOX-1 in höchstem Maße auf reifen DCs exprimiert ist, und dass die LOX-1 Expression im Laufe des Reifungsprozesses von Monozyten zu DCs zunimmt (Abb. 3a); die CD36-Expression war andererseits zwischen Tag 3 und Tag 6 stabil (Abb. 3b).

Abb. 3a/b: LOX-1-Rezeptor Protein- und CD36-Expression

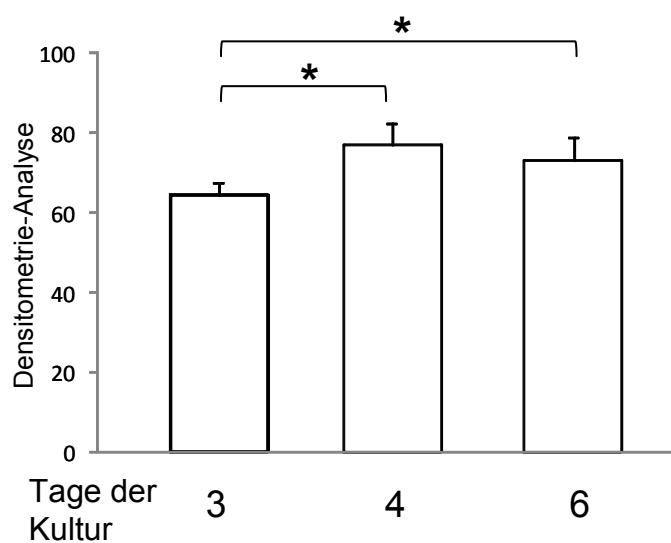
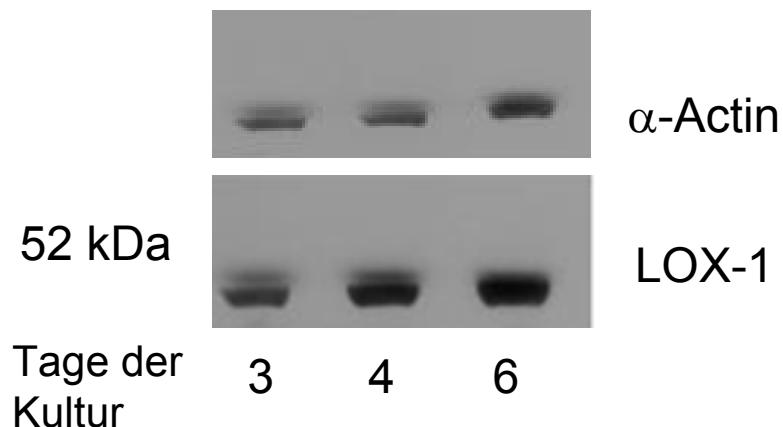


Abb. 3a: Repräsentatives Beispiel für die zeitabhängige Expression von LOX-1 auf DCs am 3, 4 und 6. Kulturtag und den entsprechenden α -Actin Banden. Die densitometrische Analyse zeigte eine signifikante Zunahme der Expression über diesen Zeitraum. * $p < 0.05$; n=3 .

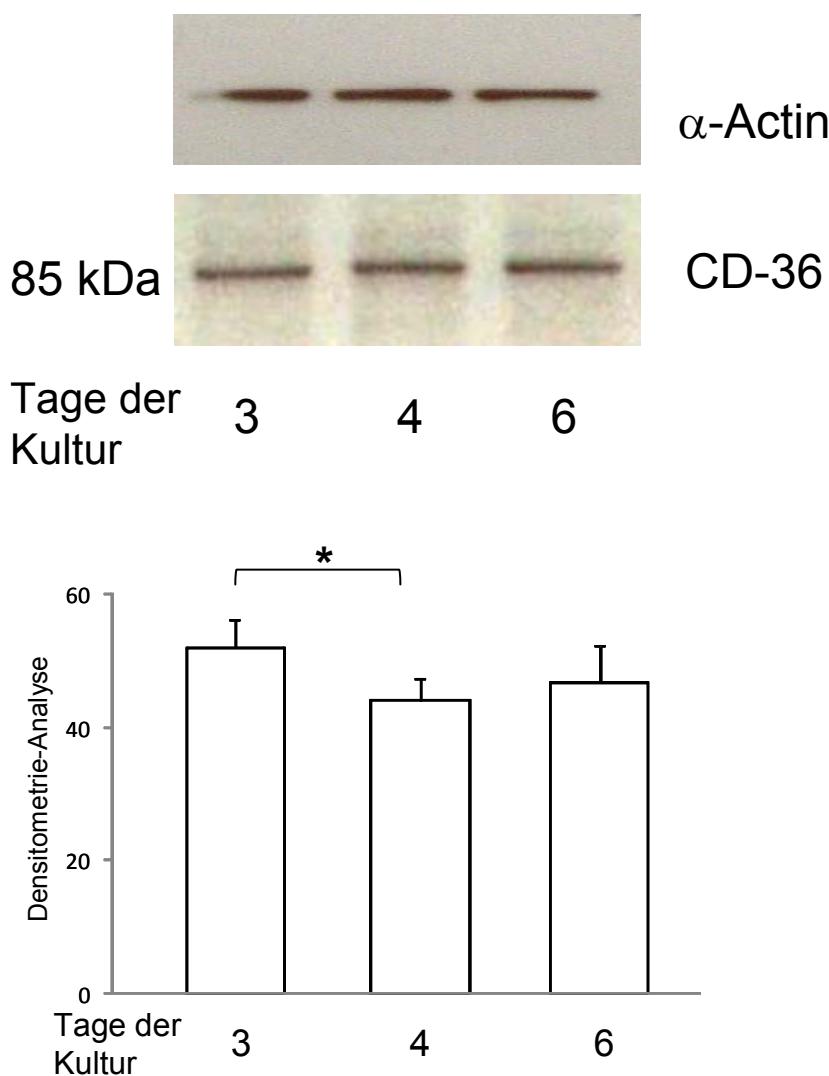


Abb. 3b: Repräsentatives Beispiel für die zeitabhängige Expression von CD36 auf DCs am 3., 4. und 6. Kulturtag und den entsprechenden α -Actin Banden. Die densitometrische Analyse zeigte keine signifikante Zunahme der Expression über diesen Zeitraum. * $p < 0.05$; n=3

3.4 oxLDL-Aufnahme und Blockierung von Scavenger-Rezeptoren

In Anbetracht der Tatsache, dass im subendothelialen Raum hohe Konzentrationen von oxLDL vorzufinden sind, wurde als nächstes die oxLDL-Aufnahmekapazität von DCs und die beteiligten Scavenger-Rezeptoren untersucht.

Dil-oxLDL ($10 \mu\text{g/ml}$) wurde nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C von $76\pm10\%$ ($p<0.01$) der DCs aufgenommen (Abb. 4a,b). Die intrazelluläre Verteilung von Dil-oxLDL wurde anhand von konfokaler Mikroskopie dargestellt (Fotos 2a-f). Dabei ist zu sehen, dass das Dil-oxLDL um den Zellkern herum akkumuliert. Foto 2f stellt eine mit Vybrant-DiI behandelte Negativkontrolle dar.

Abb. 4a,b und Fotos 2a-f: Aufnahme von Dil-oxLDL durch DCs

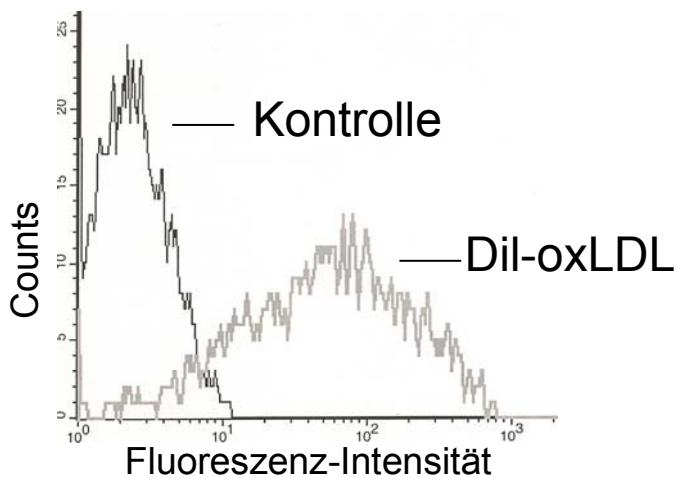


Abb. 4a: Repräsentatives Beispiel für die Aufnahme von Dil-oxLDL durch DCs bei 37°C . Die erste Kurve (schwarz) repräsentiert die Kontrollen. Die zweite Kurve (hellgrau) repräsentiert die Aufnahme von Dil-oxLDL.

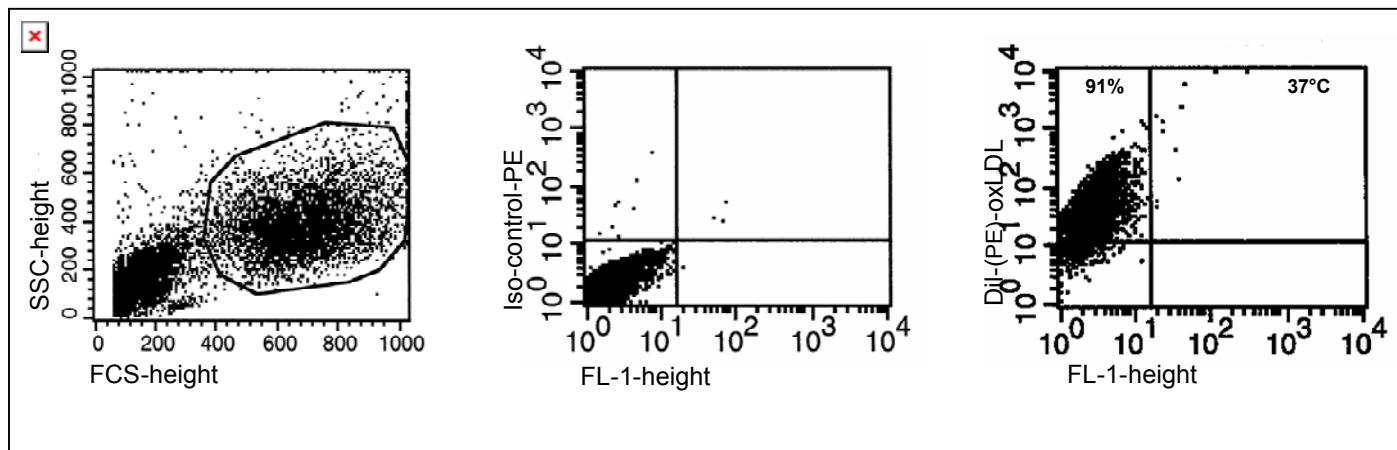


Abb. 4b: Aufnahme von Dil-oxLDL durch DCs. Repräsentative Dot-plots der Dil-oxLDL-Aufnahme durch DCs bei 37°C. Die 15% bzw 91% ergeben sich jeweils aus der Summe des linken und rechten oberen Quadranten.

Fotos 2a-f: Repräsentative Fotos der intrazellulären Verteilung von Dil-oxLDL das von DCs aufgenommen wurde (konfokale Mikroskopie; 63-fache Vergrößerung).

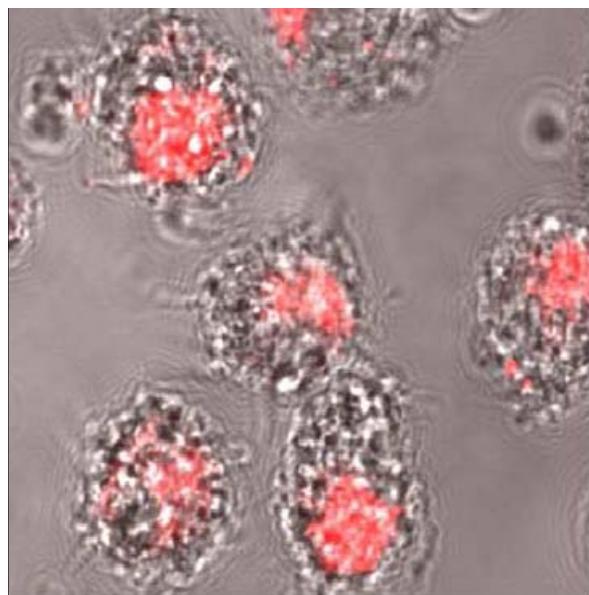


Foto 2a: DCs (Tag 5) mit typischen Schleiern haben FITC-Dextran aufgenommen.

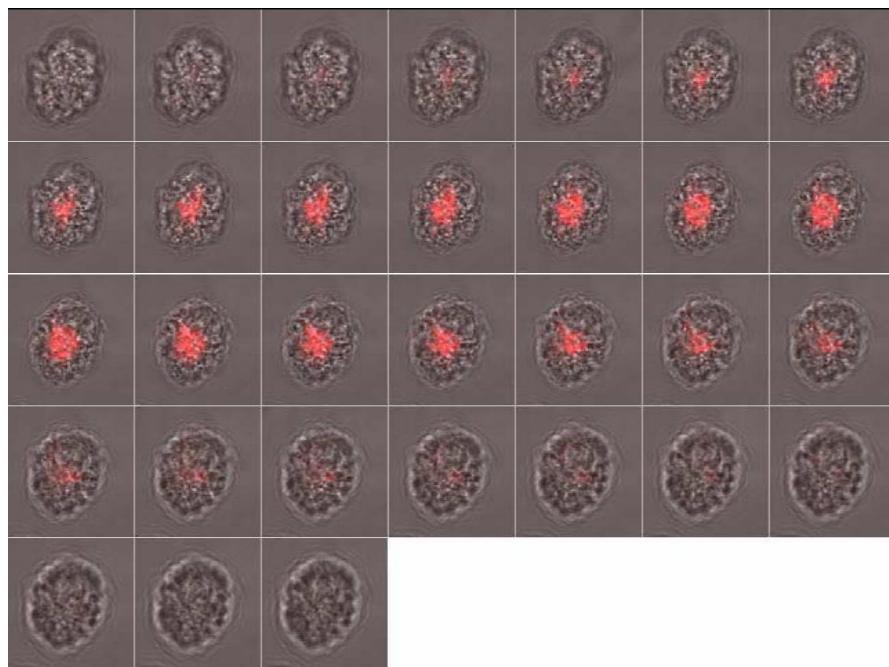
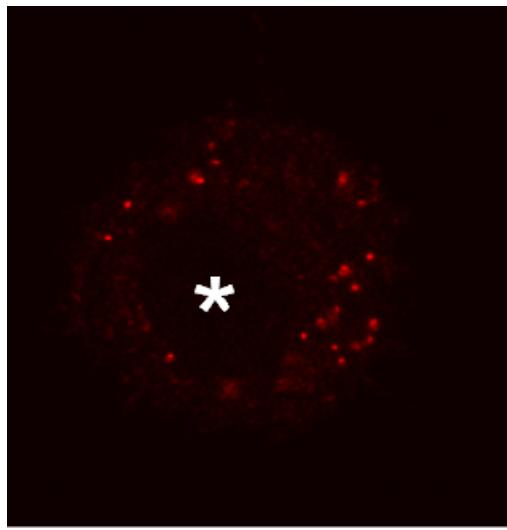
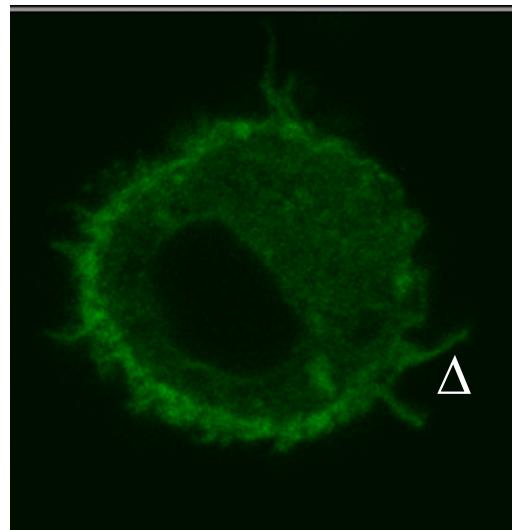


Foto 2b: Konfokale Z-Serien ($0,5\mu\text{m}$) einer DC, die die Verteilung von aufgenommenem oxLDL zeigen.



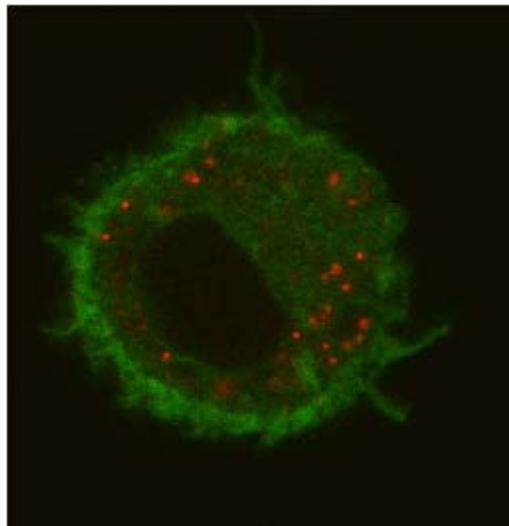
Dil-oxLDL

Foto 2c: Die rote Farbe entspricht der intrazellulären Dil-oxLDL Verteilung; die schwarze Kavität repräsentiert den Zellkern (*).



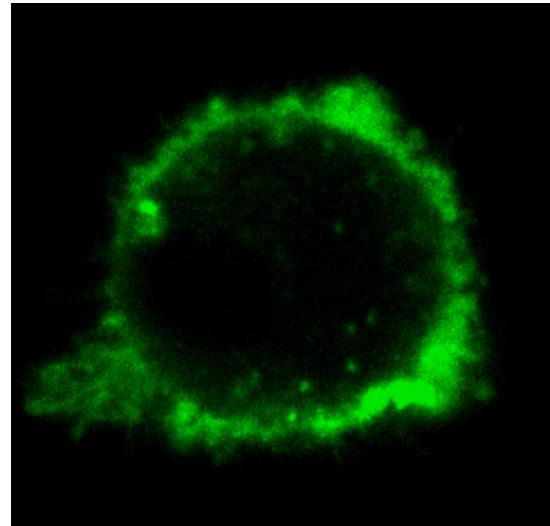
Vybrand-DiO

Foto 2d: Die grüne Farbe (Vybrand-DiO) repräsentiert die Zellmembran mit dendritischen Schleieren (Δ).



Fusion: Dil-oxLDL/Vybrand-DiO

Foto 2e: Fusion der Abbildungen von Dil-oxLDL und Vybrand-DiO.



Vybrand-DIL

Foto 2f: Die grüne Farbe (Vybrand-DIL) repräsentiert die Zellmembran mit dendritischen Schleieren.

Um herauszufinden, welcher Rezeptor in welchem Maße an der oxLDL-Aufnahme der DCs beteiligt ist, wurde jeder Rezeptor durch einen geeigneten Blockierungs-Ak geblockt, und die spezifische Änderung in der oxLDL-Aufnahme analysiert (Abb. 5a-c). So reduzierte der anti-CD36-Ak die oxLDL-Aufnahme um -36 %. Der anti-LOX-1-Ak verringerte die Aufnahme um -48 %, die Inkubation mit anti-CD205-Ak führte zu einer um -53 % reduzierten oxLDL-Aufnahme ($p<0.01$ für alle Experimente). Die Blockierung des MR durch Mannan führte jedoch zu keiner signifikanten Abnahme der oxLDL-Aufnahme.

Abb. 5a-c: Blockierung der Aufnahme von Dil-oxLDL durch DCs

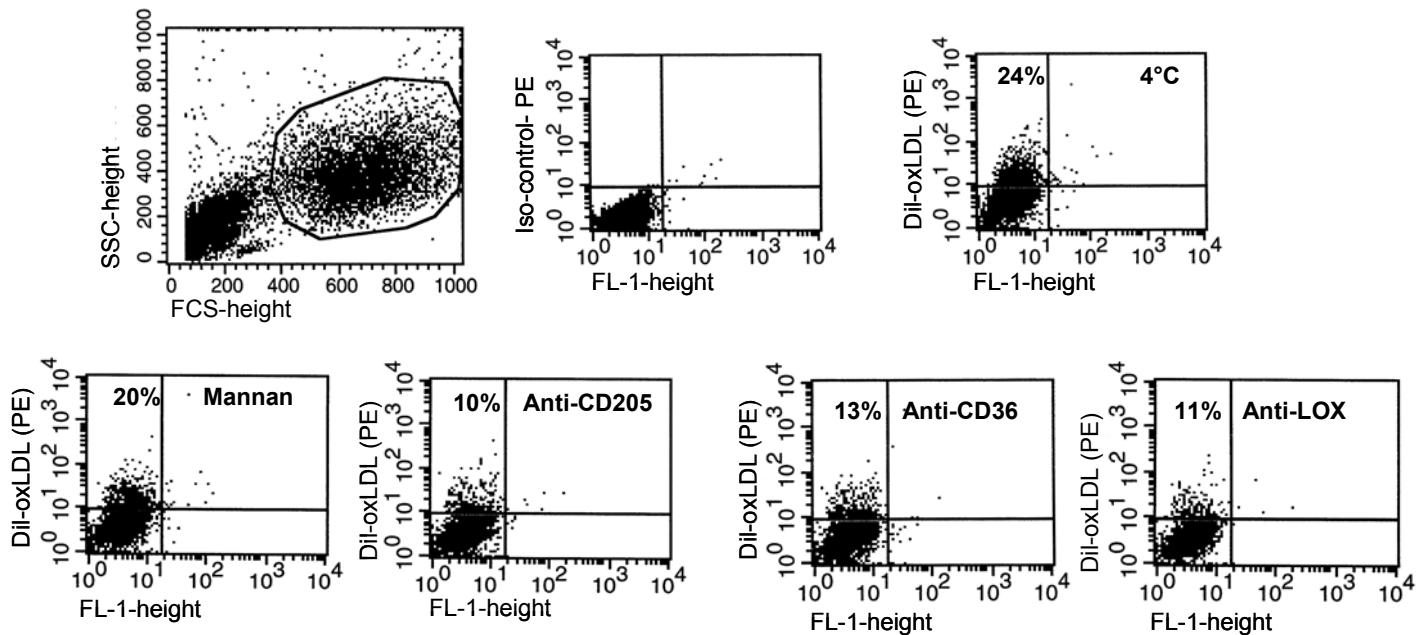


Abb. 5a: Dot-plots der Blockierungen der Dil-oxLDL Aufnahme unter Verwendung von Mannan für die Blockierung des MR, und Blockierungs-Aks gegen CD205, CD36 und LOX-1 bei 4°C. Die Zahlen in den Bildern geben die Expression des betreffenden Rezeptors in Prozent an, und werden durch die Summe der rechte oberen und der linken oberen Quadranten errechnet.

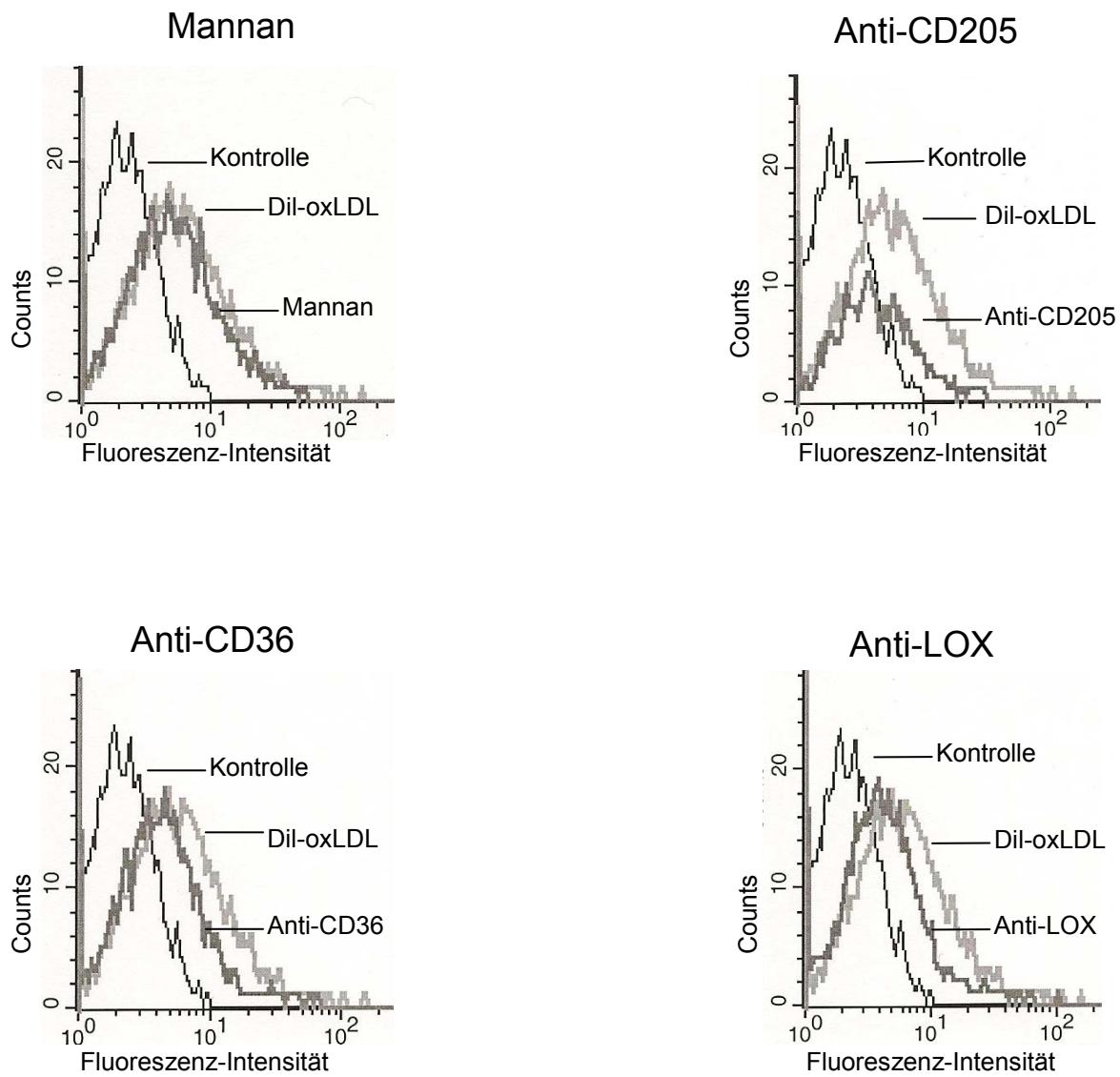


Abb. 5b: Repräsentative Histogramme der Blockierung der Aufnahme von Dil-oxLDL unter Verwendung von Mannan (Blockade des Mannose-Rezeptors), und der Blockierungs-Aks gegen CD205, CD36 und LOX-1 bei 4°C. Die erste Kurve (schwarz) repräsentiert jeweils die Kontrolle, die zweite Kurve (hellgrau) zeigt die unblockierte Dil-oxLDL-Aufnahme und die dritte Kurve (dunkelgrau) repräsentiert die Ak-induzierte Abnahme der Dil-oxLDL-Aufnahme.

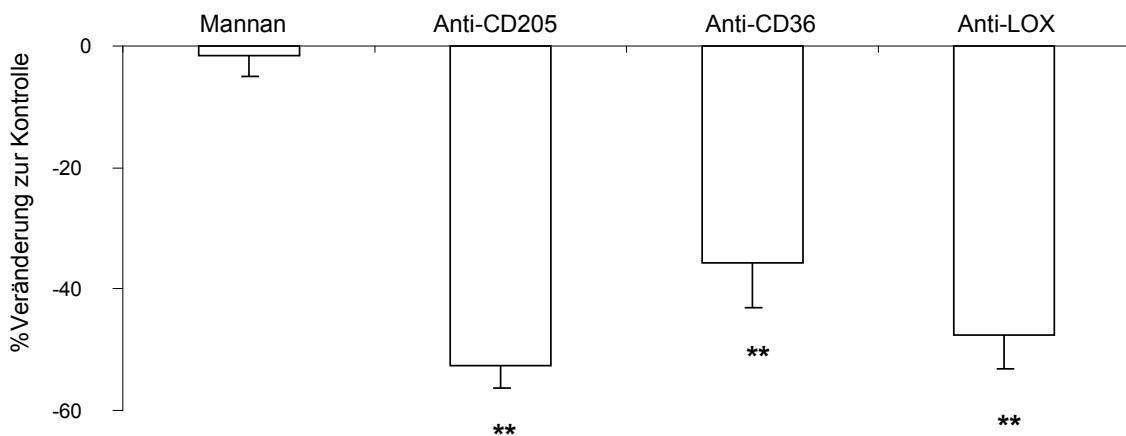


Abb. 5c: Mittelwerte der Ergebnisse der Blockierungs-Experimente (mittlere Fluoreszenz-Intensität; FACS-Analyse).

n=5 **p<0.01 versus ungeblockte Kontrolle

3.5 Reifung und Differenzierung der DCs

Reife DCs exprimieren eine hohe Zahl an Kostimulationsmolekülen wie z.B. CD11a, CD83, CD80, CD86 and HLA-DR. Es konnte bereits gezeigt werden, dass oxLDL die Reifung von Monozyten-generierten DCs induziert (Zaguri R et al., 2007). Dies konnte in dieser Arbeit durch die Hochregulation des Reifemarkers CD83 um 71 % (p<0.05) durch eine 24-stündige Stimulation mit 10 µg/ml oxLDL bestätigt werden (Abb. 6 a/b). Darüber hinaus fanden wir heraus, dass die Expression des Reifemarkers und Adhäsionsmoleküls CD11a/LFA-1 durch oxLDL um 39 % (p<0.05) gesteigert wird (Abb. 6 a/b). DC-sign (Kontrolle 73,6%±7,3, oxLDL 75%±6), das neben anderen Eigenschaften auch ein Adhäsionsmolekül ist, zeigte keine signifikante Hochregulation durch oxLDL. CD80 (57±11%), CD86 (93±2%), und HLA-DR (98±0,5%) hatten eine hohe Basisexpression, die durch oxLDL nicht signifikant gesteigert werden konnte.

Abb. 6a/b: OxLDL induzierte Reifung von DCs

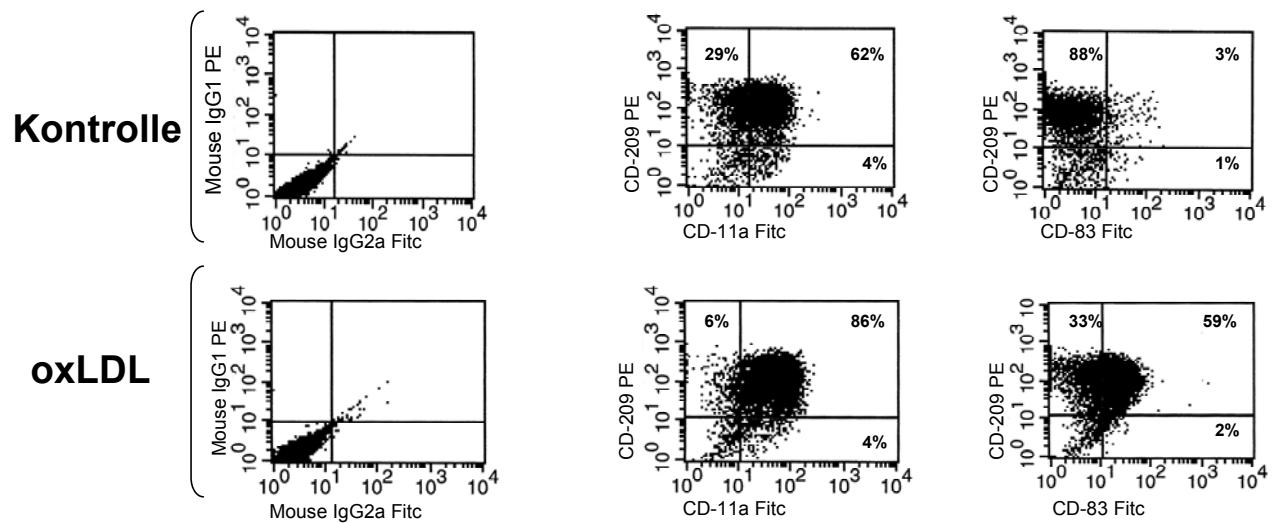


Abb. 6a: Dot-plot eines repräsentativen Experiments der oxLDL-induzierten Reifung von DCs, gezeigt anhand der Expression von CD 11a und CD83.

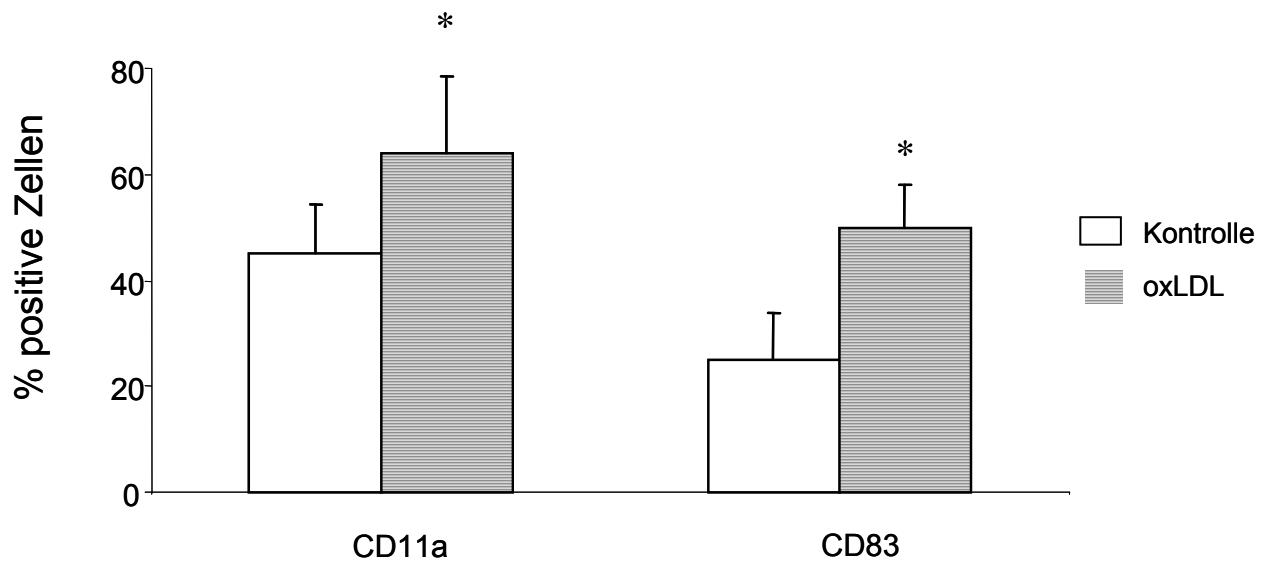


Abb. 6b: Die Mittelwerte der Ergebnisse aller sechs Experimente in Prozent (schraffiert) verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (weiß). Die Expression von CD11a und CD83 steigerte sich nach der Inkubation mit oxLDL (n=6).

Neben der Reifung ist auch die Differenzierung in DC-1 und DC-2 (nach der Nomenklatur der T-Zell-Klassifikation) von klinischem Interesse (Yilmaz A et al., 2006). Deshalb wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss von oxLDL auf die Differenzierung der DCs untersucht (Abb. 6c/d). Sowohl die Differenzierung in BDCA-1 (DC-1; +115%, p<0,05), als auch die Differenzierung in BDCA-2 (DC-2; +454%, p<0,01) wurde durch die Stimulation mit oxLDL signifikant induziert (Abb. 6 d). Neben BDCA-1 wird auch BDCA-3 durch myeloide DCs exprimiert, genauer gesagt durch einen speziellen Subtypus von myeloiden DCs. In Anbetracht der Tatsache, dass die Anzahl der zirkulierenden DCs, die BDCA-3 exprimieren, verglichen mit der Zahl der DCs, die BDCA-1 exprimieren, sehr gering ist, und dass alle relevanten in vivo Studien mit BDCA-1-exprimierenden Zellen durchgeführt wurden, haben wir uns auf die BDCA-1-Expression konzentriert (MacDonald KP et al., 2002; Dzinek A et al., 2000)

Abb. 6c/d: OxLDL induzierte Differenzierung von DCs

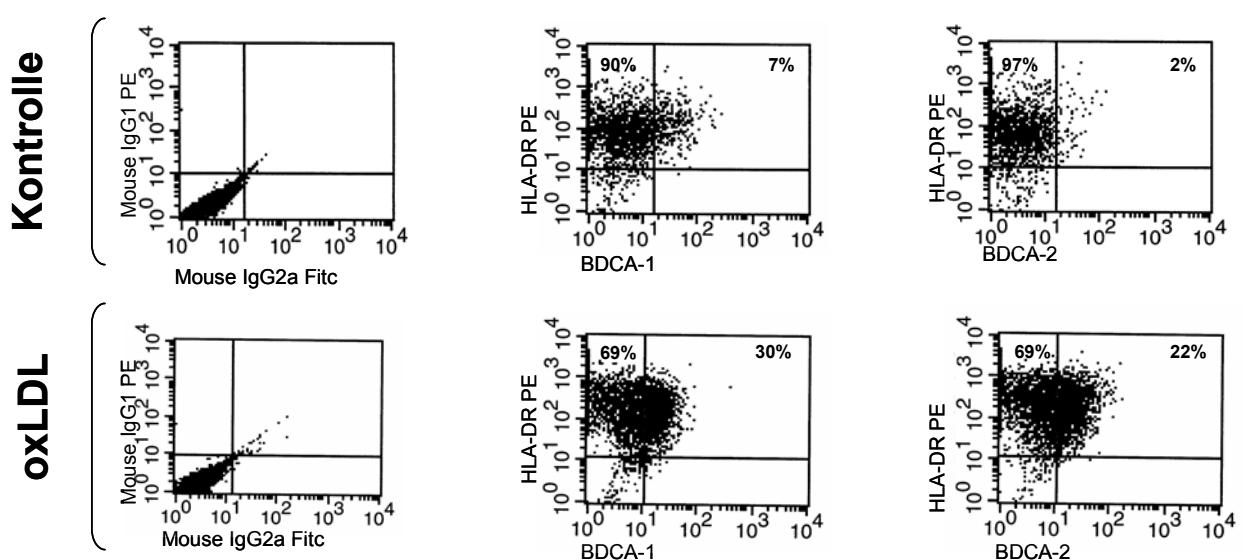


Abb. 6c: Dot-plot eines repräsentativen Experiments der oxLDL-induzierten Differenzierung von DCs gezeigt anhand der BDCA-1 und BDCA-2 Expression.

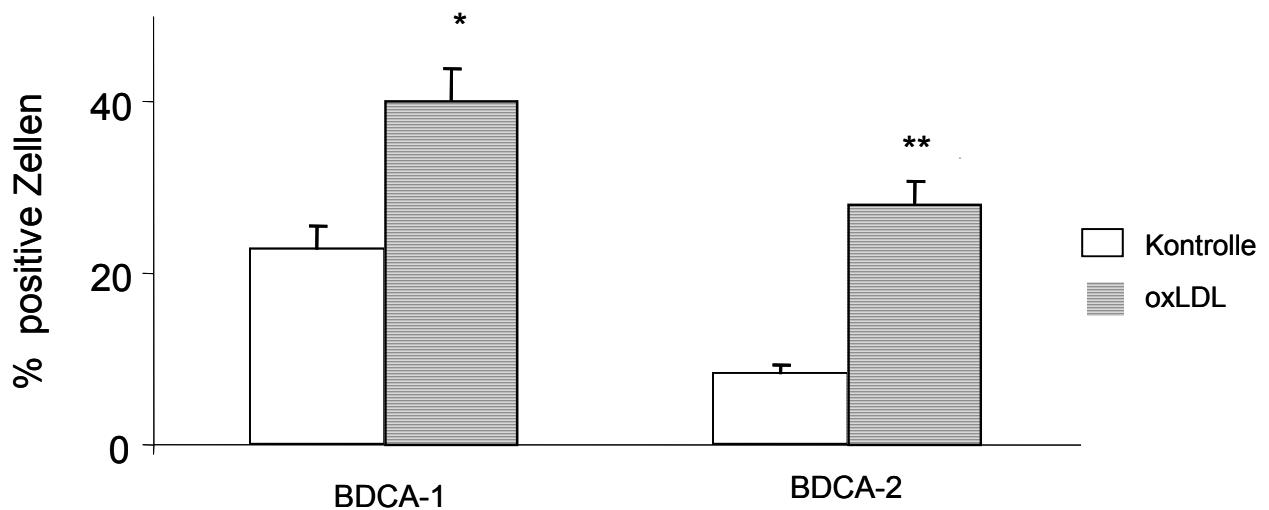


Abb. 6d: Die Mittelwerte der Ergebnisse aller sieben Experimente in Prozent (schraffiert) verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (weiß). Die BDCA-1-Expression wurde durch oxLDL signifikant gesteigert, die Expression von BDCA-2 wurde hochsignifikant gesteigert ($n=7$).

a-d mittlere Fluoreszenz-Intensität; FACS-Analyse

* $p<0.05$; ** $p<0.01$ versus unstimulierte Kontrolle

3.6 Zytokinsekretion der DCs

Reife DCs bilden und sekretieren ein weites Spektrum an Zytokinen und Chemokinen (Kofler S et al., 2005). Der Einfluß von oxLDL (10 µg/ml) auf das Zytokinprofil wurde anhand zweier unterschiedlicher Methoden untersucht.

Zum einen wurden im Überstand der Kultur mit ELISA die Zytokinspiegel von IL-6, IL-12, TNF-α und IL-10 gemessen. Dabei konnte man sehen, dass die Sekretion von IL-6 durch den Einfluss von oxLDL um 80 ± 12 pg/ml (+27%; $p<0.05$) signifikant gesteigert wurde, wohingegen die Sekretion von IL-10, einem antiinflammatorischem Zytokin, um $1,2\pm0,15$ pg/ml (-34% $p<0.05$) signifikant gesenkt wurde. Die Sekretion von IL-12 (+33pg/ml; +10%) und TNF-α (-190±512pg/ml; -4%) wurde von oxLDL nicht signifikant beeinflusst (Abb. 7a).

Zusätzlich zu diesen Experimenten konnte ein intrazellulärer Protein-assay für die pro-inflammatorischen Zytokine/Chemokine IL-4, IL-12, IL-13, IP-10, LIGHT (CD258), Osteoprotegerin und Oncostatin-M etabliert werden. Den meisten dieser Faktoren wird eine große Bedeutung in der Rolle von Monozyten in der Atherogenese zugeschrieben (Tedgui A et al., 2006). Der Assay zeigte, dass die Stimulation mit oxLDL dazu führt, dass Osteoprotegerin um +60% und IL-13 um +47% stärker exprimiert werden als in der Negativkontrolle (Abb. 7b). Die Expression der anderen Zytokine/Chemokine wird durch eine Stimulation mit oxLDL nicht signifikant beeinflusst.

Abb. 7a/b: oxLDL induzierte Veränderungen des intrazellulären Zytokin-Spektrums von DCs

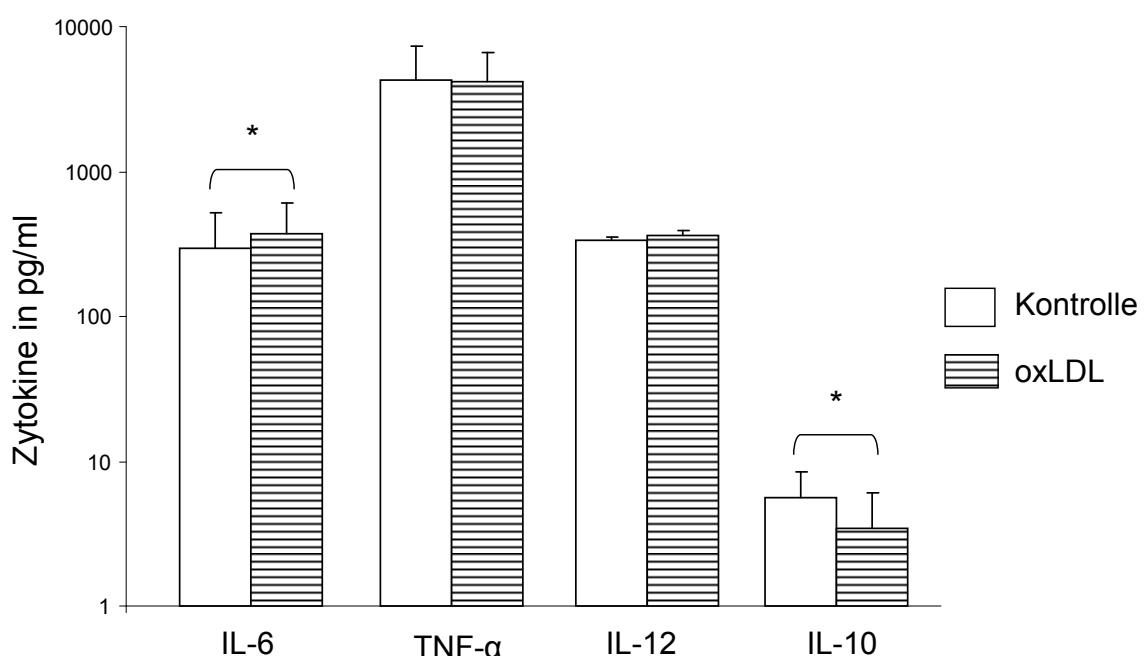


Abb. 7a: oxLDL induzierte Sekretion von IL-6, TNF- α , IL-12 und IL-10. Die weißen Säulen repräsentieren die entsprechenden Zytokinlevel vor der Stimulation, die schraffierten Säulen die Zytokinlevel nach Stimulation (logarithmische Skala).

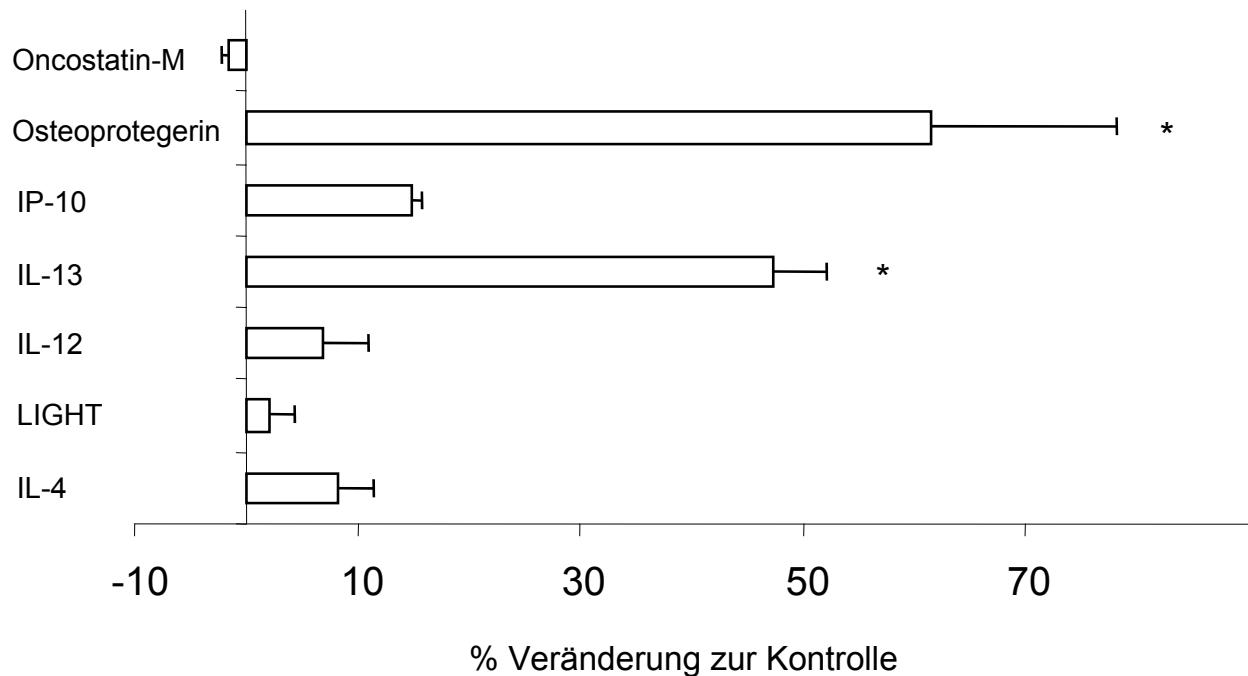


Abb. 7b: oxLDL-induzierte Protein-Expression (Protein-array) von IL-4, IL-12, IL-13, IP-10, LIGHT, Osteoprotegerin und Oncostatin-M. Veränderungen in der dot-plot-Dichte von $\geq 15\%$ wurden als signifikant angesehen.

n=3-5. * $p< 0.05$ versus unstimulierte Kontrolle

3.7 Analyse des Transkriptions-Pathways

Bei der Analyse des Transkriptionspathways haben wir uns auf den NF-κB Transkriptionsfaktor konzentriert, da er bekanntermaßen eine wichtige Rolle bei Entzündungsvorgängen, die durch DCs vermittelt werden, spielt (Zhu CH et al., 2004; Koski GK et al., 2001). Mit Hilfe eines chemilumineszenz-basierten sandwich-type ELISA konnte gezeigt werden, dass oxLDL in einer Konzentration von 10μg/ml die totale NF-κB Aktivität um $73\pm47\%$ ($p<0.01$) steigert. Eine Konzentration von 100μg/ml oxLDL und natives LDL in beiden Konzentrationen änderte die NF-κB Aktivität in DCs jedoch nicht signifikant (64 ± 58 ; -3 ± 39 ; $-1\pm15\%$; $p=ns$; n=4-10) (Abb. 8).

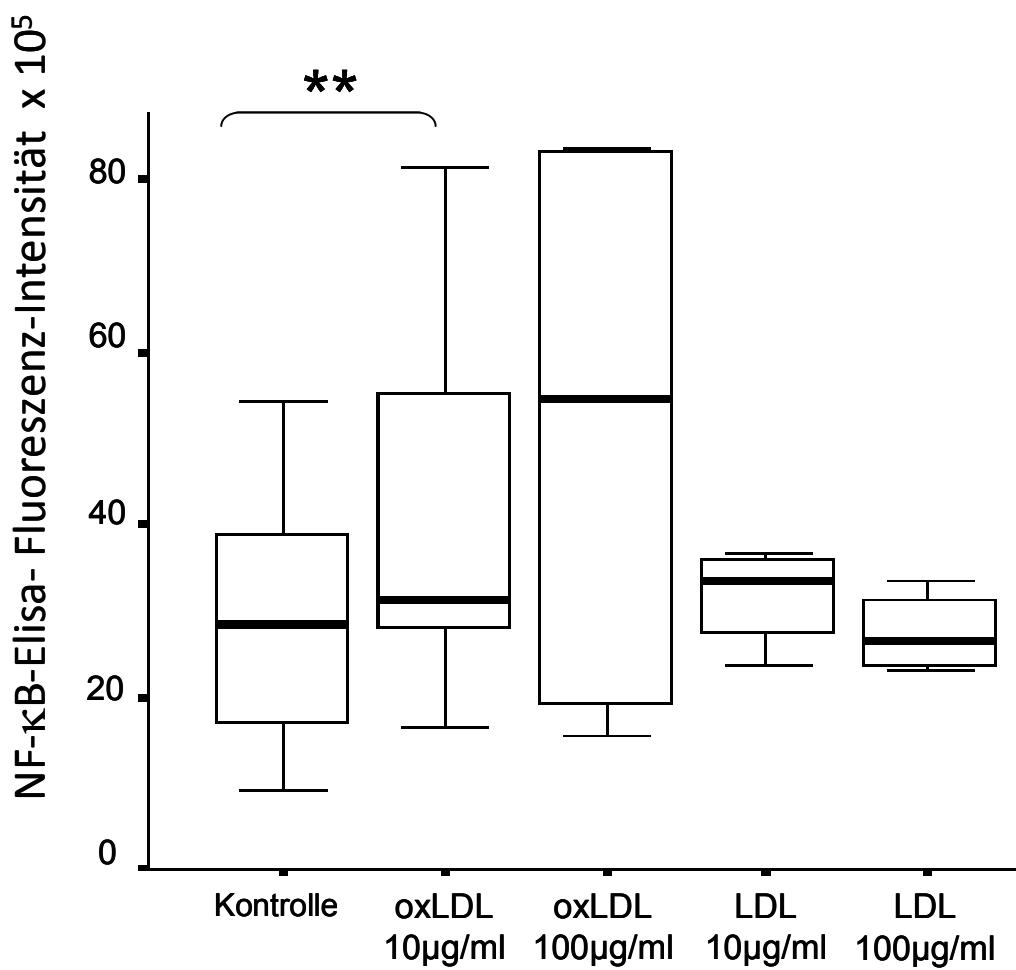


Abb 8: oxLDL induzierte Veränderungen in der DC-NF-κB Aktivität

NF-κB-ELISA: Steigerung der NF-κB Aktivität unter Stimulation mit 10µg/ml oxLDL.

Unter Stimulation mit 100µg/ml oxLDL oder mit LDL in beiden Konzentrationen ergab sich kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle.

**p< 0.01 versus unstimulierte Kontrolle (n=4-10)

3.8 NF κ B-Blockierung durch BAY-11-7092:

Mit Hilfe des NF- κ B-Blockers Bay11-7082 konnte der oxLDL-induzierte Reifungsprozess (CD83-Expression) um -35% ($p<0,01$) und der Differenzierungsprozess (BDAC-1/-2-Expression) um -37% bzw. -29% (beide $p<0,05$) geblockt werden. Darüber hinaus verringerte sich auch die Expression von CD205 durch die Blockierung um -31% ($p<0,01$). Es konnte keine signifikante Änderung in der Expression von CD36 und CD11a gefunden werden (Tab. 2).

Rezeptor	oxLDL	oxLDL+Bay11-7082	Veränderung in %	p
CD 83	41±07	24±04	-35±12	$p<0.01$
BDCA-1	29±06	21±08	-37±07	$p<0.05$
BDCA-2	18±06	13±05	-29±04	$p<0.05$
CD 36	46±19	42±18	-22±20	ns
CD 205	43±09	26±04	-31±10	$p<0.01$
CD 11a	84±06	76±05	-08±16	ns

Tabelle 2: Einfluss von NF- κ B auf die oxLDL-induzierte DC-Marker Expression
(mittlere Fluoreszenz-Intensität nach oxLDL-Stimulation mit und ohne NF- κ B-Inhibitor Bay11-7082)

4. Diskussion

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Aktivierung von DCs durch oxLDL. Die Experimente brachten folgende Ergebnis hervor: oxLDL steigerte die Expression der Scavenger-Rezeptoren CD205 und CD36 und verminderte die Mannose-Rezeptor-Expression, wohingegen die Expression des LOX-1-Rezeptors durch oxLDL nicht beeinflusst wurde. Die Endozytosekapazität von FITC-Dextran und Lucifer-yellow wurde durch oxLDL vermindert. Die Blockierung der Scavenger-Rezeptoren CD36, LOX-1 und CD205 reduzierte die oxLDL-Aufnahme deutlich. Des Weiteren induzierte oxLDL die Reifung der DCs und triggerte die Differenzierung der DCs in myeloide (BDCA-1) und plasmacytoide DCs (BDCA-2).

Mit Hilfe eines Protein-arrays zum Nachweis von DC-Proteinen fanden wir heraus, dass Osteoprotegerin und IL-13 durch oxLDL in hohem Maße exprimiert werden. Die Expression von IL-10 sank, während die Ausschüttung von IL-6 durch oxLDL gesteigert wurde.

Zu guter Letzt induzierte oxLDL die Aktivierung von NF-κB, die Inhibition der IκBα-phosphorylation hingegen verhinderte die durch oxLDL hervorgerufene Reifung und Differenzierung der DCs.

Die Arteriosklerose ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung. Plaques enthalten neben Lipiden und fibrösen Elementen eine Vielzahl von Immunzellen wie z.B. Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen (Zaguri R et al., 2007; Luo Y et al., 2004). Auch DCs wurden bereits vor ca. zehn Jahren in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen (Bobryshev YV et al., 1998). DCs sind professionelle APZs, die myeloiden oder lymphoiden Ursprungs sind (Szeles L et al., 2007). Sie besitzen die einzigartige Fähigkeit naive, Memory- oder Effektor-T-Zellen zu stimulieren (Bobryshev YV, 2005; Hansson GK et al., 2002; Hart DN, 1997). Es ist bekannt, dass

oxLDL endogenen Ursprungs eines der wichtigsten Auto-antigene in der zelluläre Immunantwort, die sich bei der Atherosklerose abspielt, ist (Luo Y et al., 2004). Aus diesem Grund ist es von höchstem Interesse, wie DCs und oxLDL interagieren, bzw. welche Reaktionen und Veränderungen das Autoantigen oxLDL bei antigenpräsentierenden DCs hervorruft. Diese Erkenntnisse könnten von großer Wichtigkeit sein, um die komplexe Pathogenese der Atherosklerose besser zu verstehen.

Aufnahme

Es ist bekannt, dass DCs und oxLDL in fortschreitenden atherosklerotischen Plaques akkumulieren (Ehara S et al., 2001; Yilmaz A et al., 2006; Luo Y et al., 2004; Van Vre EA et al., 2006; Ehara S et al., 2002; Randolph GJ, 2002). Im subendothelialen Raum nutzen die DCs ihre Fähigkeit Antigene wie oxLDL zu phagozytieren. Die erste Frage, die sich in diesem Zusammenhang stellt, ist, ob oxLDL in die DC aufgenommen wird, und wie dies geschieht. Es konnte hier gezeigt werden, dass oxLDL von der DC aufgenommen wird. Es ist bekannt, dass die Aufnahme von oxLDL durch Makrophagen durch spezifische Scavenger-Rezeptoren geschieht (Martin-Fuentes P et al., 2007; Yoshida H et al., 1998). Deshalb haben wir uns unter anderem auf ebendiese Scavenger-Rezeptoren auf DCs konzentriert, und konnten durch Expressionsanalysen und Blockierung der einzelnen Rezeptoren zeigen, dass LOX-1, CD36, und CD205 als Scavenger-Rezeptoren auf DCs fungieren, und dass sie für die Aufnahme von oxLDL verantwortlich sind.

Dieses Ergebnis bestätigt Perrin-Cocon et al, der sich in seiner Arbeit unter anderem mit der Interaktion von oxLDL mit Scavenger-Rezeptoren auf APZs beschäftigt hat (Perrin-Cocon L et al., 2001). Der Autor vermutet in dieser Arbeit, dass oxidierte Phospholipide ihre biologische Aktivität nicht durch einen einzelnen Rezeptor

exprimieren, da Scavenger-Rezeptoren zu einer großen Gruppe von Rezeptoren gehören, die Liganden mit hoher negativer Ladung durch ionische Interaktionen binden.

Man weiß, dass die Aufnahme von oxLDL durch Makrophagen, ähnlich wie von uns bei DCs gezeigt, zum größten Teil durch die Scavenger-Rezeptoren CD36, Scavenger-Rezeptor-A und LOX-1 bewerkstelligt wird. Interessanterweise fanden Martin-Fuentes et al. heraus, dass inter-individuelle Unterschiede in der Genexpression der Scavenger-Rezeptoren auf Makrophagen zu unterschiedlichen Entzündungsreaktionen nach oxLDL-Stimulation führen (Martin-Fuentes P et al., 2007). So scheint die Makrophagen-Aktivierung nach oxLDL-Inkubation mehr proinflammatorisch auszufallen, wenn sie mit CD36 und LOX-1 assoziiert ist, als wenn sie durch den Scavenger-Rezeptor-A übertragen wird. Es wäre von großen Interesse und ein wichtiger zukünftiger Forschungsansatz, zu prüfen, ob sich diese Sachlage bei DCs genauso verhält wie eben bei Makrophagen beschrieben.

Um zu erfahren, welche Folgen die Aufnahme von oxLDL für die DC hat, haben wir uns neben dem Einfluß von oxLDL auf die Scavenger-Rezeptoren auch mit der Aktivierung von DCs beschäftigt, und damit frühere Projekte unserer Arbeitsgruppe, die sich mit dem Einfluß von oxLDL auf die Adhäsion und Transmigration von DCs beschäftigten (Weis M et al., 2002), durch Versuche zur Endozytose, Differenzierung, Zytokin-Produktion und NF-κB-Aktivierung ergänzt.

Reifung

Wie von Coutant et al. gezeigt werden konnte, induziert oxLDL die Differenzierung von Monozyten zu DCs, und damit deren Reifung (Coutant F et al., 2002; Coutant F et al., 2004). Während der Maturierung verändern sich die Eigenschaften und Aufgaben der DC. Wie eben beschrieben wurde, verlieren DCs im Laufe ihrer

Reifung die Fähigkeit, Antigene aufzunehmen (Bobryshev YV, 2005). Die oxLDL-vermittelte, herabgesetzte Endozytose-Kapazität der DCs konnte mit einer Reifungs-abhängigen Herunterregulierung der Endozytose-Rezeptoren und Aquaporinkanäle (wichtig für die Makropinozytose) in Verbindung gebracht werden (De Baey A et al., 2000). Dieser Verlust an Endozytosefähigkeit könnte für die Akkumulation von Debris und für eine höhere Lipidbelastung im subendothelialen Raum von atherosklerotischen Läsionen mitverantwortlich sein (Perrin-Cocon L et al., 2001). Die Herunterregulierung des MR korreliert mit einer verminderten Fähigkeit zur Endozytose, und wird höchstwahrscheinlich ebenfalls durch Reifungsprozesse verursacht.

Durch die Maturierung exprimieren die DCs hohe Konzentrationen an verschiedenen Adhäsionmoleküle (CD11 a, CD50, CD54 und CD58), Kostimulations-Molekülen (CD40, CD 80/B7.1, CD 83 und CD86/B7.2) und antigenpräsentierenden Molekülen wie Major Histocompatibility Complex (MHC)-Proteine der Klasse I oder II und CD1 Moleküle (Lipscomb MF et al., 2002; Steinman RM et al., 2003; Banchereau J et al., 1998). CD11a zum Beispiel ist ein Rezeptor, der teilweise für die gesteigerte Akkumulation reifer DCs im atherosklerotischen Plaque verantwortlich ist (Bobryshev YV, 2005).

Die in dieser Studie gezeigte, von oxLDL induzierte Hochregulierung des Kostimulations-Rezeptors CD83 unterstützt die Hypothese, dass T-Zellen im arteriosklerotischen Plaque von DCs aktiviert werden. Tatsächlich repräsentieren hohe Anzahlen an potenteren kostimulatorischen DCs (70% CD83 positiv) in der direkten Nachbarschaft zu T-Zellen im Plaque Regionen mit hoher immunologischer Aktivität (Bobryshev YV, 2005) und zeigen Parallelen zu den Zellanordnungen in Lymphknoten (Bobryshev YV et al., 2002).

Interessanterweise konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass natives LDL im Gegensatz zu oxLDL nicht, oder zumindest nicht in gleichem Maße, in der Lage ist, die Reifung von DCs zu induzieren (Coutant F et al., 2002; Luo Y et al., 2004), was bedeutet, dass die Oxidationsprodukte in oxLDL für diesen Effekt verantwortlich sind. Untersuchungen von Coutant et al. haben gezeigt, dass der Lipidanteil von oxLDL für dessen Effekt auf DCs verantwortlich sein muss, da sich die CD86-Expression sowohl durch oxLDL als auch durch den extrahierten Lipid-Anteil von oxLDL signifikant hochregulieren lässt (Coutant F et al., 2002). Der Wasser-Anteil des oxLDL Moleküls, der z.B. oxidierte freie Fettsäuren enthalten könnte, konnte diesen Effekt nicht zeigen. Darüber hinaus fanden Coutant et al. in der gleichen Studie heraus, dass Lysophosphatidylcholin (LPC), ein Phospholipid, das bis zu 50 % des Gesamtphospholipidanteils von oxLDL ausmacht, für die Effekte von oxLDL auf DCs verantwortlich sein könnte. LPC zeigte zum einen eine gesteigerte Expression von CD83, CD 86, CD40 und HLA-DR, und zum anderen eine Abnahme der Endozytosekapazität. Darüber hinaus konnten LPC-behandelte DCs naive T-Zellen aktivieren, was an der Abgabe von IL-2 zu erkennen war. Dies alles spricht für eine LPC-induzierte Reifung von DCs, die wie oben mehrfach beschrieben, auch durch oxLDL hervorgerufen werden konnte.

Differenzierung

Die Aufnahme von oxLDL durch die DCs führte nicht nur zur Reifung, sondern, wie hier gezeigt, auch zu einer Differenzierung in myeloide (BDCA-1) DCs und plasmacytoide (BDCA-2) DCs. Dies repräsentiert nicht nur eine Veränderung in der Morphologie, sondern zeigt auch den Einfluß auf das Immunsystem. Ein Übergewicht zu einer Seite kann sowohl mit dem Fortschreiten als auch dem Abheilen einer entzündlichen Erkrankung assoziiert sein. Neuste Veröffentlichungen haben gezeigt,

dass die Zahl der zirkulierenden BDCA-1 und BDCA-2 DCs mit dem Voranschreiten der Arteriosklerose reduziert wird (Yilmaz A et al., 2006; Van Vre EA et al., 2006), was für eine vermehrte Akkumulation der DCs im Gewebe spricht. Neben der durch oxLDL getriggerten Induktion der DC-Differenzierung, könnte oxLDL auch die Differenzierung von Makrophagen in einen DCs-ähnlichen Phänotyp stimulieren (Cho HJ et al., 2007).

Zytokine

Die Aktivierung einer Entzündung durch DCs wird durch das unterschiedlich ausgeprägte Zytokin-Chemokin-Spektrum, das durch den Einfluß von oxLDL entsteht, widergespiegelt. Es hat sich in unseren Versuchen gezeigt, dass die Bildung proatherosklerotischer Chemokine, wie z.B. IL-6, Osteoprotegerin und IL-13, durch oxLDL gesteigert wird, wohingegen die Abgabe des anti-atherosklerotischen IL-10 reduziert wird. IL-6 ist ein bekanntes proatherogenes Zytokin, welches lokal von in den Plaque infiltrierenden Entzündungszellen gebildet wird (Kofler S et al., 2005; Maier W et al., 2005). IL-13 erhöht die Fähigkeit von aktivierten humanen Monozyten LDL zu oxidieren, und kann die Chemokin-Produktion von humanen vaskulären SMCs ändern (Jordan NJ et al., 1997; Folcik VA et al., 1997). Des Weiteren scheint IL-13, das von DCs gebildet wurde, einer der kritischen Faktoren zu sein, der DCs befähigt, eine TH2 Zytokin-Produktion hervorzurufen (Bellinghausen I et al., 2003). Osteoprotegerin ist eine Komponente des Knochenmetabolismus, und wird auch von DCs produziert (Bengtsson AK et al., 2004). Darüber hinaus ist es mit der Kalzifizierung des Plaques assoziiert, und stellt einen unabhängigen Risikofaktor für das Voranschreiten der Koronar-Atherosklerose dar (Kiechl S et al., 2004). Vor kurzem konnten Schoppet et al. zeigen, dass die Expression von Osteoprotegerin

durch DCs mit der Reifung zunimmt, und NF-κB abhängig ist (Schoppet M et al., 2007).

Die Steigerung der proatherogenen Cytokine IL-6, Osteoprotegerin und IL-13 zeigt die wichtige Rolle von DCs und oxLDL bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose, da sie auf der einen Seite eine Entzündungsreaktion vermitteln und auf der anderen Seite weitere Entzündungszellen zum Ort des Geschehens „locken“.

NF-κB

Unsere Gruppe konnte hier zeigen, dass eine 24-stündige Inkubation mit moderaten oxLDL Konzentrationen (10µg/ml) zu einer Aktivierung von NF-κB in DCs führt, ein Effekt, der bereits für Monozyten (Zhu CH et al., 2004; Brand K et al., 1997), Fibroblasten, SMCs und Endothelzellen gezeigt werden konnte (Maziere C et al., 1996).

Demgegenüber steht die Arbeit von Blumli et al, die zeigt, dass eine kurze Inkubation (70 Minuten) mit hohen Konzentrationen an oxidierten Phospholipiden (60µg/ml) eine LPS-induzierte NF-κB Aktivierung in humanen DCs verhindert (Blumli S et al., 2005).

Es ist hervorzuheben, dass in dieser Arbeit die oxLDL-induzierten Reifungs- und Differenzierungsprozesse ebenso wie die Hochregulierung von CD205 teilweise verhindert werden konnten, indem die NF-κB-Aktivierung durch eine Blockierung der IκBα-Phosphorylierung unterdrückt werden konnte; dies unterstreicht den Einfluß von oxLDL auf die NF-κB-vermittelte DC-Aktivierung.

Die Tatsache, dass TNF-α und IL-12 als NF-κB-abhängige Zytokine durch oxLDL nicht hochreguliert werden konnten, hat uns gezeigt, dass auch andere Transkriptionsfaktoren, die in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurden, an der oxLDL-induzierten DC-Aktivierung beteiligt sein könnten. IL-10, das von DCs ausgeschüttet wurde, aktiviert den Transkriptionsfaktor *signal transducers and*

activators of transcription (STAT)-3- durch die IL-10-Rezeptor-Signalkaskade (autocrine regulatory loop), was wiederum proinflammatorische Gene inaktiviert (Barton BE, 2006; Li Y et al., 2006). Eine Abnahme der IL-10-Sekretion, wie sie in dieser Arbeit unter oxLDL-Einfluß beobachtet wurde, steht mit einer reduzierten STAT-3-Aktivität in Zusammenhang, was das oxLDL induzierte proinflammatorische Zytokinprofil teilweise erklärt (Barton BE, 2006; Murray PJ, 2006). Nagy et al. (Szatmari I et al., 2006) schreiben dem sogenannten *peroxisome proliferator-activated receptor- γ* (PPAR γ) eine wichtige Rolle für den Lipidmetabolismus in DCs (wie in Monozyten/Makrophagen) zu. Vor allem die Expression von CD36 war mit der Aktivität von PPAR γ verknüpft, was erklären könnte, dass die Hochregulierung von CD 36 in der vorliegenden Arbeit nicht durch die NF- κ B-Blockierung verhindert werden konnte (Szatmari I et al., 2006).

Nichtsdestotrotz scheint NF- κ B der zentrale Pathway für die Reifung der DCs, die darauf folgende T-Zell-Stimulation, und letztendlich für die Aktivierung des Immunsystems zu sein (Iruretgoyena MI et al., 2006). Dies ist insofern wichtig, da dieser Pathway einen guten Angriffspunkt in der Pathogenese der Erkrankung bieten könnte.

5. Zusammenfassung und Ausblicke

Zusammenfassung

Einleitung: Die Erforschung der Arteriosklerose ist durch die hohe Prävalenz der Krankheit in der westlichen Welt eine der größten Herausforderungen in der medizinischen Forschung. Neben den Endothelzellen ist die DC eine der Schlüsselzellen in der Pathophysiologie der Arteriosklerose. Ox-LDL, die oxidierte Form von LDL, ist bekanntermaßen ein Autoantigen für die Entwicklung und

Progression der Arteriosklerose. OxLDL ist in hohem Maße mit der Schaumzell-Bildung und der daraus resultierenden Arteriosklerose assoziiert.

In dieser Arbeit haben wir uns mit der Aufnahme von oxLDL durch DCs, den beteiligten Scavenger-Rezeptoren, der Reifung, der Differenzierung, dem Zytokinspektrum der DC und dem verantwortlichen Transkriptionspathways beschäftigt.

Für alle Experimente wurden aus Monozyten kultivierte DCs verwendet.

Ergebnisse: Durch Phagozytoseassays konnte gezeigt werden, dass die FITC-Dextran-Aufnahme (Marker für die Makropinozytose) und die Lucifer-Gelb-Aufnahme (Marker für die rezeptorabhängige Phagozytose) der DCs durch die Vorinkubation mit oxLDL herunterreguliert werden (-14±1% respektive -15±2%; beides p<0.05). Die Analysen der Scavenger-Rezeptoren DEC205, LOX-1, CD36 und des MR auf DCs ergaben eine oxLDL-abhängige, gesteigerte Expression bei den Rezeptoren CD205 (+77%; p<0.05) und CD36 (+30%; p<0.05), wohingegen die Expression von LOX-1 unverändert blieb, und die Expression des MR (-36%; p<0.05) durch oxLDL vermindert wurde. Da sich diese Arbeit mit der Interaktion der DC mit oxLDL beschäftigt, war es wichtig zu erfahren, ob die DC oxLDL aufnimmt, und über welche Rezeptoren dies geschieht. Anhand von Durchflußzytometrie, Fluoreszenzmikroskopie und konfokaler Mikroskopie haben wir gezeigt, dass oxLDL von der DC aufgenommen wird. Durch Blockierungsversuche der einzelnen Scavenger-Rezeptoren konnte festgestellt werden, dass CD205 den größten Anteil an der oxLDL-Aufnahme hat (-53% Aufnahme von oxLDL bei Blockierung des Rezeptors; p<0.01). Auch LOX-1 und CD36 scheinen sehr großen Anteil an der oxLDL-Aufnahme zu haben (-48% respektive -36% Aufnahme bei Blockierung; beide

$p<0.01$), wohingegen die Blockierung des MR zu keiner signifikanten Abnahme der oxLDL-Aufnahme in die DC geführt hat.

Die Analyse des Reifemarkers CD83 zeigte, dass oxLDL dessen Expression um 71% steigern kann ($p<0.05$). Darüber hinaus vermag oxLDL die Expression von CD11a/LFA-1, einem Reifemarker und Adhäsionsmolekül, um 39% zu steigern ($p<0.05$). DC-sign, das neben anderen Eigenschaften auch ein Adhäsionsmolekül ist, zeigte keine Hochregulation durch oxLDL. CD80, CD86, und HLA-DR hatten eine hohe Basisexpression, die durch oxLDL nicht signifikant gesteigert werden konnte.

Experimente zur Differenzierung der DCs ergaben, dass sowohl die Differenzierung in BDCA-1 (DC-1; +115%, $p<0.05$) als auch die Differenzierung in BDCA-2 (DC-2; +454%, $p<0.01$) durch oxLDL signifikant gesteigert werden konnten.

Um den Einfluß von oxLDL auf die Zytokinexpression der DC zu beleuchten, wurden die Zytokinspiegel von IL-6, IL-12, TNF- α und IL-10 im Überstand der Kultur mit ELISA gemessen. Dabei konnte man sehen, dass die Sekretion von IL-6 durch den Einfluss von oxLDL um 80 ± 12 pg/ml (27%; $p<0.05$) gesteigert wurde, wohingegen die Sekretion von IL-10, einem anti-inflammatorischen Zytokin, um $1,2\pm0,15$ pg/ml (34%, $p<0.05$) gesenkt wurde. Die Sekretion von IL-12 und TNF- α wurde von oxLDL nicht signifikant beeinflusst.

Zusätzlich konnte ein intrazellulärer Protein-assay für die pro-inflammatorischen Zytokine/Chemokine IL-4, IL-12, IL13, IP-10, Osteoprotegerin und Oncostatin-M etabliert werden. Der Assay zeigte, dass die Stimulation mit oxLDL dazu führt, dass Osteoprotegerin um +60% und IL-13 um +47% stärker exprimiert werden als in der Negativkontrolle (beide $p<0.05$).

Bei der Analyse des Transkriptionspathways haben wir uns vor allem auf den NF- κ B Transkriptionsfaktor konzentriert, da er eine wichtige Rolle bei Entzündungsvorgängen, die durch DCs vermittelt werden, spielt. Mit Hilfe eines

ELISAs konnte gezeigt werden, dass oxLDL in einer Konzentration von 10µg/ml die totale NF-κB Aktivität um 73±47% ($p<0.01$) steigert. Eine Konzentration von 100µg/ml oxLDL und natives LDL in beiden Konzentrationen änderte die NF-κB-Aktivität in DCs jedoch nicht.

Blockierungsversuche mit dem NF-κB-Blocker Bay11-7082 konnten den Reifungsprozess (CD83-Expression) um -35% ($p<0,01$) und den Differenzierungsprozess (BDAC-1/-2-Expression) um -37% bzw. -29% (beide $p<0,05$) reduzieren. Darüber hinaus verringerte sich auch die Expression von CD205 durch die Blockierung um -31% ($p<0,01$). Es konnte keine signifikante Änderung in der Expression von CD36 und CD11a erzielt werden.

Zusammenfassung: Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die oxLDL-Aufnahme durch DCs durch die Scavenger-Rezeptoren LOX-1, CD36, und CD205 erfolgt. OxLDL verursacht ein pro-inflammatorisches Zytokin-Profil in humanen DCs und verursacht eine Reifung und Differenzierung der DCs; dies läuft zumindest teilweise über den NF-κB-Pathway. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die vaskuläre Entzündung durch oxLDL-induzierte Aktivierung von DCs getriggert werden könnte.

Ausblicke und Bedeutung für die Pathogenese

Es gibt zunehmend wissenschaftliche Hinweise, dass sowohl DCs mit ihrer einzigartigen Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren, wie auch oxLDL, eine wichtige Rolle in der Pathogenese und Progression der Arteriosklerose spielen. Die oxLDL-vermittelte, herabgesetzte Endozytosekapazität der DCs führt zu einer Akkumulation von Debris und einer Vergrößerung der Lipidbelastung im subendothelialen Raum. Dies ist mit Sicherheit ein entscheidender Faktor in der Progression der Erkrankung.

Die reifungsabhängige Konzentrationserhöhung an Adhäsions- und Kostimulationsmolekülen führt zu einer gesteigerten Akkumulation reifer DCs im atherosklerotischen Plaque. Dies wiederum führt zu einer vermehrten Ausschüttung von Zytokinen, die, wie hier gezeigt wurde, vor allem pro-inflammatorischer Natur sind. Die Entzündungsreaktion und damit die Progression der Arteriosklerose wird dadurch verstärkt. Alle Ergebnisse unserer Experimente deuten darauf hin, dass die Interaktion von DCs und oxLDL für die Pathogenese der Atherosklerose von Bedeutung zu sein scheint.

Die Erkenntnisse über die Aufnahme von oxLDL durch die DC, wie auch die Effekte von oxLDL auf die Reifung, die Differenzierung und das Cytokinspektrum der DC, und vor allem der Pathway, in der Vermittlung dieser Effekte, könnten wichtig sein, um in Zukunft pharmakologische Angriffspunkte für Prophylaxe und Therapie der Atherosklerose zu finden.

Asgary et al haben zum Beispiel den Effekt einer Immunisierung gegen oxLDL an einem Hasen-Tiermodell untersucht (Asgary S et al., 2007). Sie fanden dabei heraus, dass eine Immunisierung der Tiere mit Maldon-dialdehyd-modified LDL (MDA-LDL) und gleichzeitiger hochkalorischer Diät mit einer signifikanten Abnahme der Cholesterin-, LDL-Cholesterin-, Triglycerid-, und Blutglukosespiegel einhergeht. Auch die „Fatty-streak lesions“ in der Aorta und in der rechten und linken Koronararterie waren in der immunisierten Gruppe signifikant geringer als in der nicht-immunisierten, hochkalorisch-gefütterten Gruppe. Dieses Prozedere könnte ein erster viel versprechender Schritt sein, die oxLDL-Effekte in der Atherosklerose zu verhindern.

Nichtsdestotrotz sind weitere wissenschaftliche Untersuchungen zur Pathogenese der Atherosklerose dringend erforderlich, um zu einem besseren Verständnis dieser komplexen Erkrankung zu kommen.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ak	Antikörper
APZ	Antigen präsentierende Zellen
BDCA	Blood-Dendritic-Cell-Antigen
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
DC	Dendritic Cell, Dendritische Zelle
DEC-205	CD-205, Lektinrezeptor
Dil	1,1`-dioctadecyl-3.3.3`,3`-tetramethy-lindocarbocyanine perchlorate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometer
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-Stimulierender-Faktor
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HRP	Horse-Radish-Peroxidase
HSP-60	Hitzeschockprotein-60
ICAM-1	Intercellular cell adhesion molecule 1
IP-10	Gamma interferon-inducible protein 10
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
IP-10	Gamma interferon-inducible protein 10
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
LOX-1	lectin-like oxidized low-density lipoprotein type 1
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPS	Lipopolysaccharid
MDA-LDL	Maldon-dialdehyd-modified LDL
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MGDZ	Monozyten generierte Dendritische Zellen
MHC	Major Histocompatibility Complex
MR	Mannoserezeptor
NBT/BCIP	Nitro-Blue Tetrazolium Chloride/5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphate p-Toluidine Salt
NF-κB	nukleärer Transkriptionsfaktors-kappa B
nm	Nanometer
oxLDL	oxidiertes Low-Density Lipoprotein
pAVK	periphere arterielle Verschlußkrankheit
PBMZ	aus peripherem Blut entnommene Mononukleäre Zellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
pg	Picogramm
PG	Prostaglandine
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ
RLU	Relative Light Units

rpm	rotations per minute
SMC	Smooth muscle cell
STAT-3	Signal Transducers and Activators of Transcription-3
Streptavidin-HRP	Streptavidin-Horse-Radish-Peroxidase
TBARS	Thiobarbituratsäure-reaktive Substanzen
Th	T-Helfer
TMB	Tetramethyl-benzidine
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TLR	Toll-like receptor
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VE-Cadherin	Vascular endothelial-Cadherin
VEGF	Vascular endothelial growth factor
µm	Mikrometer

7. Literaturverzeichnis

- Alderman CJ**, Bunyard PR, Chain BM, Foreman JC, Leake DS, Katz DR. Effects of oxidised low density lipoprotein on dendritic cells: a possible immunoregulatory component of the atherogenic micro-environment? *Cardiovasc Res.* Sep 2002;55:806-819.
- Asgary S**, Saberi SA, Azampanah S. Effect of immunization against ox-LDL with two different antigens on formation and development of atherosclerosis. *Lipids Health Dis.* 2007;6:32.
- Banchereau J**, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* Mar 19 1998;392:245-252.
- Barton BE**. STAT3: a potential therapeutic target in dendritic cells for the induction of transplant tolerance. *Expert Opin Ther Targets.* Jun 2006;10:459-470.
- Bellinghausen I**, Brand P, Bottcher I, Klostermann B, Knop J, Saloga J. Production of interleukin-13 by human dendritic cells after stimulation with protein allergens is a key factor for induction of T helper 2 cytokines and is associated with activation of signal transducer and activator of transcription-6. *Immunology.* Feb 2003;108:167-176.
- Bengtsson AK**, Ryan EJ, Giordano D, Magaletti DM, Clark EA. 17beta-estradiol (E2) modulates cytokine and chemokine expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* Sep 1 2004;104:1404-1410.
- Bertho N**, Adamski H, Toujas L, Debove M, Davoust J, Quillien V. Efficient migration of dendritic cells toward lymph node chemokines and induction of T(H)1 responses require maturation stimulus and apoptotic cell interaction. *Blood.* Sep 1 2005;106:1734-1741.

Bluml S, Kirchberger S, Bochkov VN, Kronke G, Stuhlmeier K, Majdic O, Zlabinger GJ, Knapp W, Binder BR, Stockl J, Leitinger N. Oxidized phospholipids negatively regulate dendritic cell maturation induced by TLRs and CD40. *J Immunol*. Jul 1 2005;175:501-508.

Bobryshev YV, Lord RS. Expression of heat shock protein-70 by dendritic cells in the arterial intima and its potential significance in atherogenesis. *J Vasc Surg*. Feb 2002;35:368-375.

Bobryshev YV, Lord RS. Mapping of vascular dendritic cells in atherosclerotic arteries suggests their involvement in local immune-inflammatory reactions. *Cardiovasc Res*. Mar 1998;37:799-810.

Bobryshev YV, Lord RS. S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions. *Cardiovasc Res*. May 1995;29:689-696.

Bobryshev YV, Lord RS. 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*. Aug 1995;58:307-322.

Bobryshev YV. Dendritic cells and their involvement in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. Oct 2000;11:511-517.

Bobryshev YV. Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance. *Eur Heart J*. Sep 2005;26:1700-1704.

Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol*. Jun 1976;Suppl 5:9-15.

Brand K, Eisele T, Kreusel U, Page M, Page S, Haas M, Gerling A, Kaltschmidt C, Neumann FJ, Mackman N, Baeurele PA, Walli AK, Neumeier D. Dysregulation of monocytic nuclear factor-kappa B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Oct 1997;17:1901-1909.

Buono C, Come CE, Witztum JL, Maguire GF, Connelly PW, Carroll M, Lichtman AH. Influence of C3 deficiency on atherosclerosis. *Circulation.* Jun 25 2002;105:3025-3031.

Caligiuri G, Nicoletti A, Zhou X, Tornberg I, Hansson GK. Effects of sex and age on atherosclerosis and autoimmunity in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* Aug 1999;145:301-308.

Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, de Bouteiller O, Dieu-Nosjean MC, Homey B, Massacrier C, Vanbervliet B, Zlotnik A, Vicari A. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin Immunopathol.* 2000;22:345-369.

Cho HJ, Shashkin P, Gleissner CA, Dunson D, Jain N, Lee JK, Miller Y, Ley K. Induction of dendritic cell-like phenotype in macrophages during foam cell formation. *Physiol Genomics.* Apr 24 2007;29:149-160.

Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med.* Jan 3 2000;191:189-194.

Coutant F, Agaigue S, Perrin-Cocon L, Andre P, Lotteau V. Sensing environmental lipids by dendritic cell modulates its function. *J Immunol.* Jan 1 2004;172:54-60.

Coutant F, Perrin-Cocon L, Agaigue S, Delair T, Andre P, Lotteau V. Mature dendritic cell generation promoted by lysophosphatidylcholine. *J Immunol.* Aug 15 2002;169:1688-1695.

Davis JN, Kucuk O, Djuric Z, Sarkar FH. Soy isoflavone supplementation in healthy men prevents NF-kappa B activation by TNF-alpha in blood lymphocytes. *Free Radic Biol Med.* 2001 Jun 1;30:1293-302.

de Baey A, Lanzavecchia A. The role of aquaporins in dendritic cell macropinocytosis. *J Exp Med.* Feb 21 2000;191:743-748.

Delneste Y, Magistrelli G, Gauchat J, Haeuw J, Aubry J, Nakamura K, Kawakami-Honda N, Goetsch L, Sawamura T, Bonnefoy J, Jeannin P. Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity.* Sep 2002;17:353-362.

Dzionaek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol.* Dec 1 2000;165:6037-6046.

Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, Komatsu R, Matsuo T, Itabe H, Takano T, Tsukamoto Y, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Becker AE. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation.* Apr 17 2001;103:1955-1960.

Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Matsuo T, Ogami M, Ikura Y, Itabe H, Komatsu R, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J. Pathophysiological role of oxidized low-density lipoprotein in plaque instability in coronary artery diseases. *J Diabetes Complications*. Jan-Feb 2002;16:60-64.

Folcik VA, Aamir R, Cathcart MK. Cytokine modulation of LDL oxidation by activated human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Oct 1997;17:1954-1961.

Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. Jul 1999;145:33-43.

Frostegard J, Wu R, Giscombe R, Holm G, Lefvert AK, Nilsson J. Induction of T-cell activation by oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb*. Apr 1992;12:461-467.

Guo M, Gong S, Maric S, Misulovin Z, Pack M, Mahnke K, Nussenzweig MC, Steinman RM. A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells. *Hum Immunol*. Aug 2000;61:729-738.

Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest*. Jun 1 1997;99:2752-2761.

Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol*. Jul 1989;135:169-175.

Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*. Aug 23 2002;91:281-291.

Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. Jul 2006;6:508-519.

Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Dec 2001;21:1876-1890.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. Apr 21 2005;352:1685-1695.

Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*. Nov 1 1997;90:3245-3287.

Hausser G, Ludewig B, Gelderblom HR, Tsunetsugu-Yokota Y, Akagawa K, Meyerhans A. Monocyte-derived dendritic cells represent a transient stage of differentiation in the myeloid lineage. *Immunobiology*. Nov 1997;197:534-542.

Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev*. Jun 2004;199:9-26.

Hohlfeld R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain*. May 1997;120:865-916.

Iruretagoyena MI, Sepulveda SE, Lezana JP, Hermoso M, Bronfman M, Gutierrez MA, Jacobelli SH, Kalergis AM. Inhibition of nuclear factor-kappa B enhances the capacity of immature dendritic cells to induce antigen-specific tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pharmacol Exp Ther*. Jul 2006;318:59-67.

Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. Mar-Apr 1986;6:131-138.

Jordan NJ, Watson ML, Williams RJ, Roach AG, Yoshimura T, Westwick J. Chemokine production by human vascular smooth muscle cells: modulation by IL-13. *Br J Pharmacol*. Oct 1997;122:749-757.

Kamthong PJ, Wu M. Inhibitor of nuclear factor-kappaB induction by cAMP antagonizes interleukin-1-induced human macrophage-colony-stimulating-factor expression. *Biochem J*. Jun 1 2001;356:525-530.

Kawahara I, Kitagawa N, Tsutsumi K, Nagata I, Hayashi T, Koji T. The expression of vascular dendritic cells in human atherosclerotic carotid plaques. *Hum Pathol*. Sep 2007;38:1378-1385.

Kiechl S, Schett G, Wenning G, Redlich K, Oberholzer M, Mayr A, Santer P, Smolen J, Poewe W, Willeit J. Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation*. May 11 2004;109:2175-2180.

Kofler S, Nickel T, Weis M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clin Sci (Lond)*. Mar 2005;108:205-213.

Koski GK, Lyakh LA, Cohen PA, Rice NR. CD14+ monocytes as dendritic cell precursors: diverse maturation-inducing pathways lead to common activation of NF-kappab/RelB. *Crit Rev Immunol*. 2001;21:179-189.

Kovanen PT, Kaartinen M, Paavonen T. Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation*. Sep 1 1995;92:1084-1088.

Krebs B, Kohlmannsperger V, Nolting S, Schmalzbauer R, Kretzschmar HA. A method to perform Western blots of microscopic areas of histological sections. *J Histochem Cytochem*. May 2006;54:559-565.

Li Y, Chu N, Rostami A, Zhang GX. Dendritic cells transduced with SOCS-3 exhibit a tolerogenic/DC2 phenotype that directs type 2 Th cell differentiation in vitro and in vivo. *J Immunol*. Aug 1 2006;177:1679-1688.

Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev*. Jan 2002;82:97-130.

Llodra J, Angeli V, Liu J, Trogan E, Fisher EA, Randolph GJ. Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Aug 10 2004;101:11779-11784.

Lord RS, Bobryshev YV. Clustering of dendritic cells in athero-prone areas of the aorta. *Atherosclerosis*. Sep 1999;146:197-198.

Ludewig B, Laman JD. The in and out of monocytes in atherosclerotic plaques: Balancing inflammation through migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Aug 10 2004;101:11529-11530.

Luo Y, Liang C, Xu C, Jia Q, Huang D, Chen L, Wang K, Wu Z, Ge J. Ciglitazone inhibits oxidized-low density lipoprotein induced immune maturation of dendritic cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* Sep 2004;44:381-385.

MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionaek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood.* Dec 15 2002;100:4512-4520.

Maier W, Altwegg LA, Corti R, Gay S, Hersberger M, Maly FE, Sutsch G, Roffi M, Neidhart M, Eberli FR, Tanner FC, Gobbi S, von Eckardstein A, Luscher TF. Inflammatory markers at the site of ruptured plaque in acute myocardial infarction: locally increased interleukin-6 and serum amyloid A but decreased C-reactive protein. *Circulation.* Mar 22 2005;111:1355-1361.

Martin-Fuentes P, Civeira F, Recalde D, Garcia-Otin AL, Jarauta E, Marzo I, Cenarro A. Individual variation of scavenger receptor expression in human macrophages with oxidized low-density lipoprotein is associated with a differential inflammatory response. *J Immunol.* Sep 1 2007;179:3242-3248.

Mayerl C, Lukasser M, Sedivy R, Niederegger H, Seiler R, Wick G. Atherosclerosis research from past to present--on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Arch.* Jul 2006;449:96-103.

Maziere C, Auclair M, Djavaheri-Mergny M, Packer L, Maziere JC. Oxidized low density lipoprotein induces activation of the transcription factor NF kappa B in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells. *Biochem Mol Biol Int.* Aug 1996;39:1201-1207.

Millonig G, Malcom GT, Wick G. Early inflammatory-immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY)-study. *Atherosclerosis*. Feb 2002;160:441-448.

Morel PA, Feili-Hariri M, Coates PT, Thomson AW. Dendritic cells, T cell tolerance and therapy of adverse immune reactions. *Clin Exp Immunol*. Jul 2003;133:1-10.

Murray PJ. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol*. Aug 2006;6:379-386.

Nicoletti A, Paulsson G, Caligiuri G, Zhou X, Hansson GK. Induction of neonatal tolerance to oxidized lipoprotein reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Mol Med*. Apr 2000;6:283-290.

Nishi K, Itabe H, Uno M, Kitazato KT, Horiguchi H, Shinno K, Nagahiro S. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Oct 1 2002;22:1649-1654.

O'Garra A, Murphy K. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr Opin Immunol*. Jun 1994;6:458-466.

Ohashi R, Mu H, Yao Q, Chen C. Atherosclerosis: immunopathogenesis and immunotherapy. *Med Sci Monit*. Nov 2004;10:RA255-260.

Perrin-Cocon L, Coutant F, Agaugue S, Deforges S, Andre P, Lotteau V. Oxidized low-density lipoprotein promotes mature dendritic cell transition from differentiating monocyte. *J Immunol*. Oct 1 2001;167:3785-3791.

Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity*. Dec 1999;11:753-761.

Randolph GJ. Is maturation required for Langerhans cell migration? *J Exp Med*. Aug 19 2002;196:413-416.

Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kämpgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G.

Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *Journal of Immunological Methods*. 1996; 196:137-151.

Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol*. Jul 2000;85:9-18; quiz 18, 21.

Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. Jan 14 1999;340:115-126.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. Apr 29 1993;362:801-809.

Schoppet M, Hensler S, Ruppert V, Stubig T, Al-Fakhri N, Maisch B, Hofbauer LC. Osteoprotegerin expression in dendritic cells increases with maturation and is NF-kappaB-dependent. *J Cell Biochem*. Apr 15 2007;100:1430-1439.

Seifert PS, Kazatchkine MD. The complement system in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. Oct 1988;73:91-104.

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of

atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. Sep 1 1995;92:1355-1374.

Steinberg D, Witztum JL. Lipoproteins and atherogenesis. Current concepts. *Jama*. Dec 19 1990;264:3047-3052.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. May 1 1973;137:1142-1162.

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:685-711.

Szatmari I, Rajnavolgyi E, Nagy L. PPARgamma, a lipid-activated transcription factor as a regulator of dendritic cell function. *Ann N Y Acad Sci*. Nov 2006;1088:207-218.

Szeles L, Torocsik D, Nagy L. PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochim Biophys Acta*. Aug 2007;1771:1014-1030.

Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*. Apr 2006;86:515-581.

Tertov VV, Kaplun VV, Orekhov AN. In vivo oxidized low density lipoprotein: degree of lipoprotein oxidation does not correlate with its atherogenic properties. *Mol Cell Biochem*. Jun 1998;183:141-146.

Thiery J, Teupser D, Walli AK, Ivandic B, Nebendahl K, Stein O, Stein Y, Seidel D.

Study of causes underlying the low atherosclerotic response to dietary hypercholesterolemia in a selected strain of rabbits, *Atherosclerosis*, 1996, 121: 63-73.

Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. Apr 17 1998;93:241-252.

van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology.

Circulation. Jan 1994;89:36-44.

Van Vre EA, Hoymans VY, Bult H, Lenjou M, Van Bockstaele DR, Vrints CJ, Bosmans JM. Decreased number of circulating plasmacytoid dendritic cells in patients with atherosclerotic coronary artery disease. *Coron Artery Dis*. May 2006;17:243-248.

Weis M, Schlichting CL, Engleman EG, Cooke JP. Endothelial determinants of dendritic cell adhesion and migration: new implications for vascular diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Nov 1 2002;22:1817-1823.

Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. IFN-gamma deficiency exerts gender-specific effects on atherogenesis in apolipoprotein E-/- mice. *J Interferon Cytokine Res*. Jun 2002;22:661-670.

Wick G, Knoflach M, Xu Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:361-403.

Wissler RW, Strong JP. Risk factors and progression of atherosclerosis in youth.

PDAY Research Group. Pathological Determinants of Atherosclerosis in Youth. *Am J Pathol*. Oct 1998;153:1023-1033.

Yilmaz A, Lochno M, Traeg F, Cicha I, Reiss C, Stumpf C, Raaz D, Anger T, Amann K, Probst T, Ludwig J, Daniel WG, Garlichs CD. Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques. *Atherosclerosis*. Sep 2004;176:101-110.

Yilmaz A, Weber J, Cicha I, Stumpf C, Klein M, Raithel D, Daniel WG, Garlichs CD. Decrease in circulating myeloid dendritic cell precursors in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. Jul 4 2006;48:70-80.

Yoshida H, Quehenberger O, Kondratenko N, Green S, Steinberg D. Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD36, and macrosialin in resident mouse peritoneal macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. May 1998;18:794-802.

Zaguri R, Verbovetski I, Atallah M, Trahtemberg U, Krispin A, Nahari E, Leitersdorf E, Mevorach D. 'Danger' effect of low-density lipoprotein (LDL) and oxidized LDL on human immature dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. Sep 2007;149:543-552.

Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Mar 19 1996;93:2588-2592.

Zhu CH, Ying DJ, Mi JH, Zhu XH, Sun JS, Cui XP. Low shear stress regulates monocyte adhesion to oxidized lipid-induced endothelial cells via an $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ dependent pathway. *Biorheology*. 2004;41:127-137.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniel Schmauß
Geboren am: 29.06.1982
Geburtsort: Augsburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Prof. Dr. med Max Schmauß, Ärztlicher Direktor Bezirkskrankenhaus Augsburg
Jutta Schmauß, Gymnasiallehrerin
Geschwister: Verena Schmauss, Jhg. 1985, Physiotherapeutin
Adresse: Reitmorstraße 12, 80538 München
Immatrikulationsnr.: 68201580
Telefon: +49 (0)89 / 21269756
Mobil: +49 (0)160/7801458
Email: Daniel.Schmauss@med.uni-muenchen.de

Schulausbildung

1988 – 1992 Grundschule Hochzoll, Augsburg
1992 – 1999 Peutinger-Gymnasium Augsburg
1999 – 2001 Paul-Klee Gymnasium Augsburg
Mai 2001 Allgemeine Hochschulreife, Durchschnittsnote 1,6

Zivildienst

06/2001 – 04/2002 Zivildienst auf der onkologischen Station der Kinderklinik Augsburg

Studium

04/2002 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
03/2004 Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung
06/2009 Ablegen des Staatsexamens mit der Note „Sehr gut“
07/2009 Approbation als Arzt

Wissenschaftliche Erfahrungen / Lehrtätigkeiten

- 04 – 05 / 2004 Studentische Hilfskraft im Neurobiologischen Kopfkurs,
Sommersemester 2004, Anatomische Anstalt I, LMU München,
Dir.: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Putz
- 03 – 12 / 2005 Wissenschaftliche Hilfskraft Munich Lung-Transplant-Group
- seit 08 / 2005 Wissenschaftliche Hilfskraft der Herzchirurgischen Klinik u. Poliklinik,
Klinikum Großhadern, LMU München, Dir.: Prof. Dr. med. B. Reichart

Extracurriculäre Kurse / Famulaturen

- 08 – 09 / 2004 Famulatur Gefäßchirurgie Hopital Générale, St Pierre, Ile de la
Réunion, France
- 02 -03 / 2005 Famulatur Klinik für Psychiatrie, LMU München,
Dir.: Prof. Dr. med. H.-J. Möller
- 03– 04 / 2005 Famulatur Internistische Notaufnahme, Zentralklinikum Augsburg
- 02 – 03 / 2006 Famulatur Medizinische Klinik und Poliklinik I, Klinikum Großhadern,
LMU München, Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck ,
- 08 / 2006 Famulatur Herzchirurgische Klinik und Poliklinik,
Transplantationsambulanz, Klinikum Großhadern, LMU München,
Dir.: Prof. Dr. med. B. Reichart

Praktisches Jahr

Chirurgie:

12/2007 – 02/2008 Herzchirurgische Klinik Großhadern

02 – 04/2008 Weill Cornell Medical College, New York City

Innere Medizin:

05 – 07/2008 University of Chicago Medical Center, Chicago (siehe unten)

07 – 08/2008 Centre Hospitalier Universitaire Fort-de-France, Martinique, France

Anästhesie :

09 – 12/2008 Zentralklinikum Augsburg

Stipendien

Stipendiat des PJ-Programms der **Harvard-Munich-Education-Alliance** an der Pritzker School of Medicine, Chicago 2008

USMLE (amerikanisches Staatsexamen)

- | | |
|---------|-------------------------------------------------------------|
| 12/2007 | Erfolgreiches Ablegen des USMLE Step 1 |
| 09/2009 | Erfolgreiches Ablegen des USMLE Step 2 (schriftlicher Teil) |
| 07/2010 | Geplantes Ablegen des USMLE Step 2 (praktischer Teil) |

Außeruniversitäre Interessen und Engagement

- | | |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Seit 1999 | Mittel und Langstreckenlauf, u.a. mehrmaliger schwäbischer Meister, mehrmalige Teilnahme an bayerischen und deutschen Meisterschaften. |
| Seit 2004 | Aktives Mitglied im Debattierclub München
Mitorganisation der deutschen Meisterschaft im Debattieren, München 2005. (Schirmherrschaft: Prof. Dr. Jutta Limbach) |
| Hobbies: | Literatur, Bergsteigen (aktives Mitglied im Deutschen Alpenverein) |
| Fremdsprachen: | Englisch und Französisch flüssig, sowohl in Sprache als auch in Schrift. (Toefltest in Englisch im Jahre 2000). |

München, den 10.10.2000

Daniel Schmauß

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Priv. Doz. Dr. med. Michael Weis, der meine Freude an wissenschaftlicher Arbeit geweckt hat, und dem ich sehr viel zu verdanken habe.

Danken möchte ich auch Dr. med. Thomas Nickel, der diese Arbeit immer kritisch und mit sehr viel Enthusiasmus begleitet hat.

Nicht zuletzt gilt mein ausgesprochener Dank meinen Eltern Jutta und Prof. Dr. med. Max Schmauß, die durch ihre große Unterstützung maßgeblich dazu beigetragen haben, dass ich diesen Weg gehen konnte.

10. Eigene Veröffentlichungen

Originalartikel:

1.) Kaczmarek I, Ertl B, **Schmauss D**, Sadoni S, Knez A, Daebritz S, Meiser B, Reichart B.

Preventing cardiac allograft vasculopathy: long-term beneficial effects of mycophenolate mofetil.

J Heart Lung Transplant. 2006 May;25(5):550-6. Ipf: 3,1

2.) Kaczmarek I, **Schmauss D**, Reichart B, Daebritz SH.

Complete autologous reconstruction of the aorta and the pulmonary bifurcation in truncus arteriosus communis.

Eur J Cardiothorac Surg. 2006 Oct;30(4):675-7. Ipf: 1,8

3.) **Schmauss D**, Kaczmarek I, Tenderich G, Groetzner J, Deutsch MA, Schulz U, Wahlers T, Koerfer R, Bigdeli AK, Reichart B.

Einfluss des Spender-Serumnatriumspiegels in der Herztransplantation - Erfahrungen einer multizentrischen Studie

The controversy of donor serum sodium levels in heart transplantation—a multicenter experience

Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie; 2006 Oct;20(5):189-194

4.) Kaczmarek I, **Schmauss D**, Sodian R, Beiras-Fernandez A, Oberhoffer M, Daebritz S, Schoenberg SO, Reichart B.

Late-onset tacrolimus-associated cerebellar atrophy in a heart transplant recipient.

J Heart Lung Transplant. 2007 Jan;26(1):89-92. Ipf: 3,1

5.) Kaczmarek I, Deutsch MA, Sadoni S, Brenner P, **Schmauss D**, Daebritz S, Weiss M, Meiser B, Reichart B.

Successful Management of Antibody-mediated Cardiac Allograft Rejection With Combined Immunoabsorption and Anti-CD 20 Monoclonal Antibody Treatment: Case Report and Literature Review.

J Heart Lung Transplant. 2007 May;26(5):511-5. Epub 2007 Mar 7. Review. Ipf: 3,1

6.) **Schmauss D**, Kaczmarek I, Sachweh J, Kozlik-Feldmann R, Sodian R, Deutsch MA, Reichart B, Daebritz SH.

Successful Single Lung Fontan Operation in two Children.

Heart Surg Forum. 2007;10(4):E331-3 Ipf: 0,84

7.) **Schmauss D**, Sodian R, Klopstock T, Deutsch MA, Kaczmarek I, Roemer U, Reichart B, Daebritz SH.

Cardiac transplantation in a 14-year-old patient with mitochondrial encephalomyopathy.

Pediatr Transpl 2007 Aug;11(5):560-2. Ipf: 2,04

8.) Deutsch MA, Kaczmarek I, Huber S, **Schmauss D**, Ochsenkuehn R, Schmoeckel M, Meiser B, Mueller-Hoecker J, Reichart B.

From Rats to Men- Sirolimus associated oligospermia. Literature Review and case report.

Am J Transplant. 2007 Oct;7(10):2414-21. Ipf: 6,1

9.) **Schmauss D**, Weis M.

Cardiac Allograft Vasculopathy: Recent developments.

Circulation. 2008 Apr 22;117(16):2131-41 Ipf: 11,6

10.) **Schmauss D**, Schmitz C, Malec E, Deutsch MA, Kaczmarek I, Beiras-Fernandez A, Loebe M, Reichart B, Sodian R.

Right-sided heart reperfusion in pediatric patients with left ventricular assist device.

J Thorac Cardiovasc Surg. 2008 Apr;135(4):953 Ipf.: 3,7

11.) Sodian R, **Schmauss D**, Markert M, Weber S, Nikolaou K, Haeberle S, Vogt F, Vicol C, Lueth T, Reichart B, Schmitz C.

Three-dimensional printing creates models for surgical planning of aortic valve replacement after previous coronary bypass grafting.

Ann Thorac Surg. 2008 Jun;85(6):2105-8. Ipf.: 2,2

12.) Nickel T, **Schmauss D**, Hanssen H, Sicic Z, Krebs B, Jankl S, Summo C, Fraunberger P, Walli AK, Pfeiler S, Weis M.

oxLDL uptake by dendritic cells induces upregulation of scavenger-receptors, maturation and differentiation.

Atherosclerosis. 2009 Aug;205(2):442-50. Epub 2009 Jan 9. Ipf.: 4,6

13.) **Schmauss D**, Kaczmarek I, Beiras-Fernandez A, Bigdeli AK, Eifert S, Christ F, Reichart B, Vicol C.

Tentacles: a novel device for exposing the heart for the insertion of left apical assist device cannulae.

Heart Surg Forum. 2009 Apr;12(2):E116-8. Ipf.: 0,84

14.) Sodian R, **Schmauss D**, Schmitz C, Bigdeli A, Haeberle S, Schmoeckel M, Markert M, Lueth T, Freudenthal F, Reichart B, Kozlik-Feldmann R.

3-dimensional printing of models to create custom-made devices for coil embolization of an anastomotic leak after aortic arch replacement.

Ann Thorac Surg. 2009 Sep;88(3):974-8. Ipf.: 2,02

15.) Deutsch MA, Kauke T, Sadoni S, Kofler S, **Schmauss D**, Bigdeli AK, Weiss M, Reichart B, Kaczmarek I.

Luminex-based virtual crossmatching facilitates combined third-time cardiac and de novo renal transplantation in a sensitized patient with sustained antibody-mediated cardiac allograft rejection.

Pediatr Transplant. 2009 Jul 7. [Epub ahead of print] Ipf.: 2,04

16.) Bigdeli Ak, Schmitz C, Bruegger D, Weis F, Michel S, **Schmauss D**, Reichart D, Reichart B, Sodian, R.

Heparin-induced Thrombosis without Thrombocytopenia causing fulminant Pulmonary Embolism after Off-pump Coronary Artery Bypass Grafting.

Heart Surg Forum. 2009 In Press Ipf.: 0,84

17.) Nickel T, **Schmauss D**, Sisic Z, Grimm C, Jankl S, Weis M.
Immunoregulatory effects of the flavonol quercetin in-vitro and in-vivo
Submitted 2009

Buchkapitel:

1.) Kaczmarek I und **Schmauss D**.

Was gibt es Neues in der Herztransplantation? in:

Was gibt es Neues in der Chirurgie? Jahresband 2007.

2.) **Schmauss D**, Bigdeli AK und Kaczmarek I.

Was gibt es Neues in der Herztransplantation? in:

Was gibt es Neues in der Chirurgie? Jahresband 2009.

Posterpräsentationen

1.) Nickel T, Grimm C, **Schmauss D**, Fraunberger P, Krebs B, Walli AK, Weis M.
Modulation of Dendritic Cells by oxLDL
Präsentiert von Schmauss D. Auf dem “World Congress of Cardiology”, Barcelona
2006.

2.) Nickel T , Kopp R, **Schmauss D**, Summo C, Grimm C, Weis M.
Inflammatory Chemokines in the artherosclerotic plaque
Präsentiert von Schmauss D. auf dem “World Congress of Cardiology”, Barcelona
2006.

3.) Nickel T, **Schmauss D**, Sisic Z, Weis M.
Immunoregulatorische Effekte des Flavonol Quercetin in vitro und in vivo
German Congress of Cardiology, Mannheim 2008