
**Charakterisierung dendritischer Zellen und deren
Chemokinrezeptoren und -Liganden im
atherosklerotischen Plaque -
Relevanz proatherogener Faktoren**

Claudia Sabrina Summo



München 2013

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Ludwig-Maximilians-Universität
Direktor: Professor Dr. med. Steffen Massberg

**Charakterisierung dendritischer Zellen und deren Chemokinrezeptoren
und -Liganden im atherosklerotischen Plaque -
Relevanz proatherogener Faktoren**

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

vorgelegt von
Claudia Sabrina Summo
aus
München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Weis

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ludger Klein
Priv. Doz. Dr. Michael Lehrke

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:
Priv. Doz. Dr. Thomas Nickel

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

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2013

Für meine Eltern

Vincenzo und Lucia Summo

in Dankbarkeit und Liebe

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	5
1.1	Epidemiologie und Definition der Atherosklerose	5
1.2	Aufbau der Arterienwand	6
1.3	Die Atherogenese.....	7
1.4	Risikofaktoren der Atherosklerose	9
1.4.1	ADMA – ein Marker der endothelialen Dysfunktion.....	9
1.4.2	oxLDL in der Atherosklerose	10
1.5	Dendritische Zellen.....	11
1.6	Chemokine	13
1.7	Interaktion zwischen Chemokinen und Dendritischen Zellen	15
1.8	Die Rolle der DZ und ihrer Chemokine in der Atherosklerose	17
1.9	Fragestellung und Ziel der Arbeit	18
2.	MATERIAL	19
2.1	Geräte	19
2.2	Chemikalien	19
2.2.1	Substanzen für Zellkulturmedien und Immunfluoreszenz.....	19
2.2.2	Antikörper.....	20
2.2.3	Zytokine.....	20
2.2.4	Lösungen	20

2.3	Sonstige Substanzen und Kits	20
3.	Methoden	22
3.1	In vivo	22
3.1.1	Studiendesign	22
3.1.2	Isolierung und Präzipitation von RNS	23
3.1.3	Bestimmung von Reinheit und Konzentration der RNS	24
3.1.4	Herstellung von cDNS aus RNS durch reverse Transkription	24
3.1.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
3.1.6	Immunfluoreszenz: Gefäßabschnitte der Aorta ascendens und ACI	27
3.1.7	ELISA	28
3.2	In vitro	29
3.2.1	Kultivierung Monozyten generierter Dendritischer Zellen (MGDZ)	29
3.2.2	Kultivierung humaner mikrovaskulärer Endothelzellen	30
3.2.3	LDL-Oxidation	30
3.2.4	Isolierung der RNS aus MGDZ und hmEZ und rt-PCR	31
3.2.5	Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)	31
3.2.6	Immunfluoreszenz: CCL21 auf hmEZ	32
3.2.7	Inkubation von hmEZ mit einer Plaque- und Aortensuspension	33
3.3	Statistische Analyse	33
4.	ERGEBNISSE	35
4.1	In vivo	35
4.1.1	Allgemeine Patienten-Daten	35

4.1.2	Klinische Parameter der Atherosklerose-Patienten	36
4.1.3	Analyse der Laborwerte.....	39
4.1.4	PCR von Plaque und PBL	40
4.1.5	Immunfluoreszenz: Analyse der CCL21-Expression im atherosklerotischen Plaque und im Aortengewebe.....	44
4.1.6	ELISA: oxLDL, ADMA und CCL21 im peripheren Blut.....	47
4.2	in vitro Experimente	48
4.2.1	Stimulation von Zellkulturen mit oxLDL und ADMA	48
4.2.2	Inkubation mit Plaque- und Aortensuspension.....	54
5.	DISKUSSION	55
5.1	Die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst	55
5.2	CD83 als Marker für reife DZ	56
5.3	CCR7 – der Homingrezeptor	58
5.4	CCR7 im Zusammenspiel mit seinen Liganden CCL21/CCL19.....	60
5.5	Der Einfluss von oxLDL.....	61
5.6	Der Einfluss von ADMA	64
6.	ZUSAMMENFASSUNG	66
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	69
8.	LITERATURVERZEICHNIS	70
9.	ANHANG	76
9.1	Anamnesebogen.....	76
9.2	Patienteninformation.....	77

9.3	Einverständniserklärung	78
10.	DANKSAGUNG	79
11.	LEBENSLAUF.....	80
12.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	82

1. EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie und Definition der Atherosklerose

Bereits seit Jahren wird die Todesursachenstatistik - laut statistischem Bundesamt – von Herz-Kreislaufkrankungen angeführt. Im Jahr 2010 starb in der Bundesrepublik Deutschland von allen Gestorbenen fast jeder zweite (41,1%) an den Folgen einer Herz-Kreislaufkrankung. In den entwickelten Ländern sind sie für mehr als 40% der Mortalität und für einen Großteil der Morbidität jenseits des 50. Lebensjahres verantwortlich (www.americanheart.org). Im Vergleich dazu wurde nur bei jedem viertem Sterbefall (25,3%) eine bösartige Neubildung als Todesursache ausgemacht (Bundesamt 2010).

Diese Zahlen machen schnell klar, wie wichtig das Verständnis dieser häufigen Erkrankung ist, wobei der Komplex der Herz-Kreislaufkrankungen als eine Folgeerscheinung bzw. Komplikation der Atherosklerose begriffen werden muss.

Der Begriff der Atherosklerose wurde erstmals von Jean Lobstein, einem deutsch-französischen Chirurgen im Jahre 1829 verwendet (Lobstein 1833) und später von Marchand (Marchand 1904) wieder aufgegriffen. Ursprünglich stammt das Wort aus dem Griechischen („athära“ = Grütze, „skleros“ = hart).

Die Atherosklerose ist eine chronisch progrediente, fokale oder diffuse Veränderung der Arterienwand, die von der Gefäßintima ausgeht.

Häufig wird der Begriff der Atherosklerose als Synonym für die Arteriosklerose benutzt. Letztere ist aber weniger spezifisch und beschreibt ganz allgemein die Verhärtung von Arterienwänden wie z.B. auch die kalzifizierende Mediasklerose oder die proliferative und hyaline Verhärtung der Wände kleiner Arterien und Arteriolen. Die fortgeschrittene Atherosklerose ist durch typische atheromatöse Läsionen gekennzeichnet, die auch als Atherom oder atherosklerotischer Plaque bezeichnet werden. Diese manifestieren sich besonders an Prädilektionsstellen mit hämodynamischer Belastung (Millonig, Niederegger et al. 2001).

1.2 Aufbau der Arterienwand

Um die Pathogenese der Atherosklerose zu verstehen, muss man sich zunächst den Aufbau einer Arterienwand verdeutlichen. Diese besteht aus drei konzentrischen Schichten, die je nach Arterientyp unterschiedlich ausgeprägt sind:

- Tunica intima, kurz Intima
- Tunica media, kurz Media
- Tunica adventitia, kurz Adventitia

Die Atherosklerose ist vor allem eine Erkrankung der Intima, welche das Arterienlumen auskleidet und aus Gefäßendothel, einer dünnen Membran aus Kollagen und feinen, netzförmigen elastischen Fasern besteht.

Die Media hingegen besteht aus langen ringförmig verlaufenden glatten Gefäßmuskelzellen und elastischen Faserlamellen. Je nach Arterientyp sind Muskelzellen und Faserlamellen unterschiedlich stark ausgeprägt. Die sich nach außen anschließende Adventitia setzt sich aus einem kollagenen und elastischen Netz zusammen, deren Bindegewebe nahtlos in das Bindegewebe der Umgebung übergeht.

1.3 Die Atherogenese

Es gibt eine Vielzahl an Hypothesen zur Atherogenese, die sich nur schwer zu einer widerspruchsfreien Gesamthypothese zusammen fassen lassen. Dies zeigt, dass sich die Atherogenese wohl kaum durch einen einzigen pathogenetischen Prozeß erklären lässt.

Carl von Rokitansky fand 1827 in der Gefäßwand von Arterien abgelagerte Cholesterin-Granula und postulierte, dass die so gebildeten weichen Plaques rupturieren können und zu weiteren Fibrinauflagerungen führen. Die so entstandene Entzündungsreaktion war für ihn dabei von sekundärer Bedeutung. Für seinen Zeitgenossen und größten Kritiker Rudolf Virchow war hingegen die Entzündungsreaktion die primäre Ursache für die Entstehung der Atherosklerose. Eine entzündliche Verletzung der Arterienwand induziert laut Virchow eine zelluläre Proliferation, wobei Plaques entstehen, die anschließend von Plasmalipiden durchtränkt werden (Mayerl, Lukasser et al. 2006). Ein modernes Model der Atherogenese ist die Response to injury Hypothese. Eine Endothelschädigung führt zur Ablagerung von Thrombozyten, die PDGF (Platelet Derived Growth Factor) sezernieren, was wiederum zur Proliferation der Gefäßmuskelzellen in der Intima führt. Dabei entsteht eine Kollagen-Proteoglykan-Matrix, die eine Einlagerung von LDL Makrophagen begünstigt. Es kommt zur Bildung von Schaumzellen und somit zur Progression der Atherosklerose.

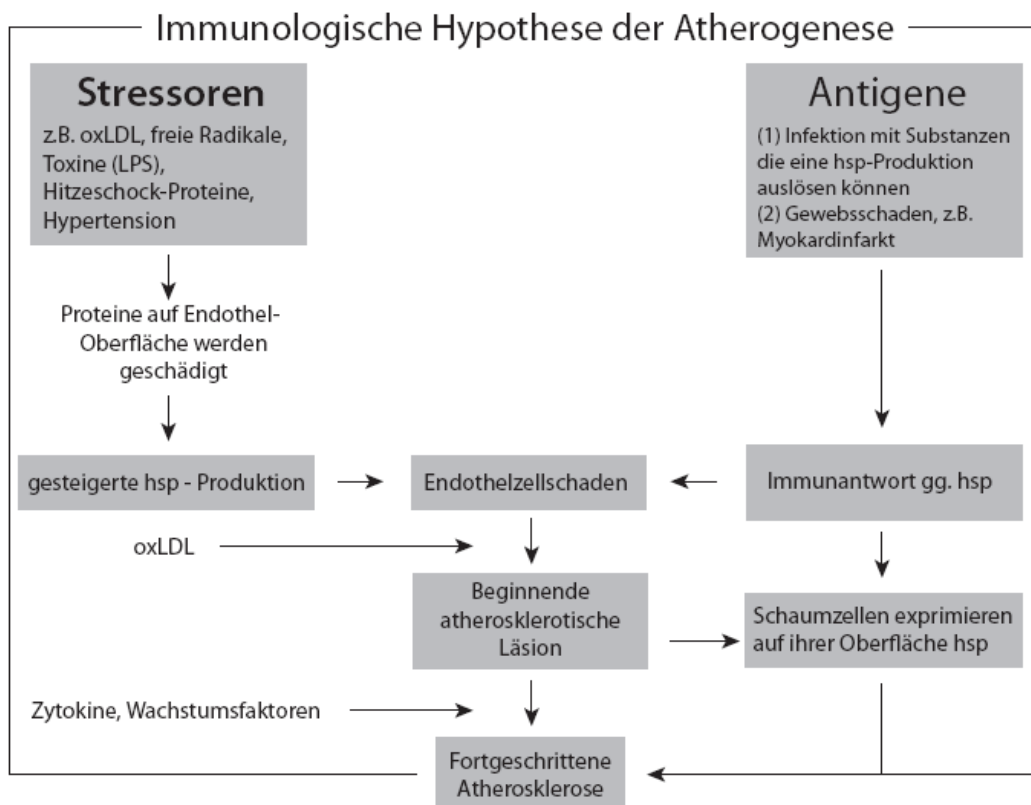


Abb. 1: nach Wick et al., American Heart Journal, 1999 (Wick, Perschinka et al. 1999)

Ein möglicher Auslöser für eine Endothelschädigung kann eine virale oder bakterielle Infektion sein und somit zur Atherosklerose führen. Bereits mehrfach ist postuliert worden, dass bei der Entstehung der Atherosklerose Autoimmunprozesse eine wichtige Rolle spielen (Ross 1993; Wick, Perschinka et al. 1999). Die Grafik von Wick et al. (Abbildung 1) verdeutlicht wie verschiedene Antigene bzw. Stressoren wie z.B. oxidiertes LDL (oxLDL) zu einer Immunantwort führen, Autoantikörper gegen Hitzeschock-Proteine (HSP) gebildet werden und es so zu einer Endothelzell-Schädigung kommt. Auch Weis et al. konnte nachweisen, dass oxLDL, HSP und Hypoxie zu einer Veränderung der Endothelfunktion führen (Weis, Schlichting et al. 2002).

1.4 Risikofaktoren der Atherosklerose

Schon lange ist bekannt, dass die klassischen Risikofaktoren die Entstehung der Atherosklerose begünstigen, wobei das Risiko einer beschleunigten Atherogenese bei mehreren gleichzeitig vorliegenden Risikofaktoren steigt. Das gemeinsame Auftreten bestimmter Risikofaktoren wurde als metabolisches Syndrom beschrieben (Vaidya, Szklo et al. 2007). Hierzu gehören: Hypertonie, Adipositas, Lipidstoffwechselstörungen und Insulinresistenz/Diabetes mellitus Typ II. Tiefenbacher und Kreuzer haben diese vier Risikofaktoren als „tödliches Quartett“ beschrieben, um ihre Bedeutung hervorzuheben (Tiefenbacher and Kreuzer 2003). Allerdings werden diese klassischen Risikofaktoren ergänzt durch einen bestimmten klinischen Phänotyp, verschiedene biochemische Marker und genetische Polymorphismen. Sowohl die klassischen, als auch die neuen Risikofaktoren führen zu einer endothelialen Dysfunktion.

1.4.1 ADMA – ein Marker der endothelialen Dysfunktion

Es konnte gezeigt werden, dass der oben genannte Mechanismus durch den endogenen Inhibitor der Stickstoffmonoxid (NO) – Synthetase (NOS), dem asymmetrischen Dimethylarginin (ADMA) vermittelt wird.

Die NOS ist ein Enzym, das die Oxidation von L-Arginin in Citrullin und NO katalysiert. NO ist der potenteste bekannte endogene Vasodilatator, inhibiert die Thrombozyten-Aggregation, reduziert das Anhaften der Leukozyten am Endothel und supprimiert die Prolifertation vaskulärer glatter Gefäßmuskulzellen (Cooke and Dzau 1997). In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Änderungen der vaskulären NO-Synthese die Progression der Atherosklerose und die Restenose-Rate deutlich beeinflussen (Cooke, Singer et al. 1992; Candipan, Wang et al. 1996). Diese experimentellen Beobachtungen weisen darauf hin, dass die NOS eine wichtige Rolle in der Atherogenese spielt.

Die Bedeutung des Inhibitors dieses Enzyms – ADMA – wurde erstmals von Vallance (Vallance, Leone et al. 1992) bei Patienten mit chronischem Nierenversagen untersucht. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein der bereits genannten Risikofaktoren, wie z.B. Hypertonus, Alter, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie mit erhöhten ADMA-Spiegeln positiv korreliert (Miyazaki, Matsuoka et al. 1999). Durch

eine Akkumulation von ADMA wird die vasodilatatorische Funktion des Endothels gehemmt (Cooke 2004).

1.4.2 oxLDL in der Atherosklerose

In vitro Experimente konnten zeigen, dass die Transmigration und Adhäsion deutlich gesteigert ist, nachdem Endothelzellen (EZ) Hypoxie, oxLDL (oxidiertes low density lipoproteine) und TNF- α (tumor necrosis factor α) ausgesetzt waren (Weis, Schlichting et al. 2002).

OxLDL hat aber nicht nur einen Einfluss auf die Endothelfunktion. Es ist nachgewiesen, dass oxLDL die Atherogenese auch beschleunigt, indem es als Auto-Antigen zu einer verstärkten Ausreifung von DZ führt und die Akkumulation von Schaumzellen fördert (Alderman, Bunyard et al. 2002; Weis, Schlichting et al. 2002; Nickel, Schmauss et al. 2009).

Zu einer Anhäufung von oxLDL kommt es, wenn LDL-Cholesterin im subendothelialen Raum akkumuliert, mit Proteoglykanen der Intima interagiert, von ansässigen Immunzellen über Scavenger-Rezeptoren aufgenommen wird und von der 15-Lipoxygenase zu oxLDL oxidiert wird. Die im oxLDL vorhandene Arachnidonsäure katalysiert die Bildung von Radikalen und führt so zu einer direkten Zellschädigung (Alderman, Bunyard et al. 2002; Nickel, Schmauss et al. 2009).

In Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) konnten im atherosklerotischen Plaque und im Serum erhöhte oxLDL-Spiegel gemessen (Ehara, Ueda et al. 2001) und oxLDL-spezifische T-Zellen und Autoantikörper nachgewiesen werden (Hansson 2005). Somit konnte gezeigt werden, dass es auch zu einer systemischen Veränderung des oxLDL-Gehaltes bei Patienten mit Atherosklerose kommt.

Somit führen also verschiedene Faktoren zu einem gemeinsamen Endpunkt: der Plaqueformation und –progression, der Atherogenese.

1.5 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DZ) bilden eine sehr heterogene Gruppe von Zellen, die sich in vielen Punkten unterscheiden, wie z.B. in ihren Oberflächenmolekülen, der anatomischen Lokalisation, dem Reifestadium und schließlich auch in ihrer Funktion. Wie alle Zellen des Knochenmarks stammen DZ von $CD34^+$ - Stammzellen ab, wandern über den Blutstrom in das Gewebe ein und haben dabei eine Art Sentinel-Funktion (engl.: sentinel = Wächter) inne (McColl 2002). In diesem zunächst unreifen Stadium können sie Antigene phagozytieren, diese innerhalb endozytischer Vesikel prozessieren und über MHC-II-Moleküle präsentieren. Währenddessen reifen DZ aus und verändern sich dabei auch in ihrer Morphologie. So verlieren sie einerseits ihre Phagozytose-Rezeptoren, andererseits werden verschiedene Co-Faktoren wie CD40, CD58, CD80 und CD83 hochreguliert (Banchereau and Steinman 1998; Banchereau, Briere et al. 2000). Letzterer gilt als charakteristischstes Merkmal maturer DZ (Prechtel and Steinkasserer 2007) und hat sowohl immunstimulierende als auch immuninhibierende Fähigkeiten.

Als mature DZ wandern sie zu drainierenden Lymphknoten und präsentieren hier die Antigene den $CD4^+$ -T-Zellen. Nur DZ sind in der Lage T-Zellen zu primen und eine spezifische Immunantwort zu induzieren. Somit sind DZ die potentesten Antigen-präsentierenden-Zellen (APZ) (Banchereau, Briere et al. 2000). Die Interaktion zwischen DZ und T-Zellen wird durch T-Zell-Rezeptoren vermittelt. Die Effizienz dieser „immunologischen Synapse“ ist allerdings unter anderem von membrangebunden Liganden – wie z.B. CD83 – abhängig (Prechtel and Steinkasserer 2007).

Auch wenn DZ viele Gemeinsamkeiten haben, unterscheidet man verschiedene Subtypen in Abhängigkeit von ihren immunologischen Aufgaben, ihrer Lokalisation und ihrem Ursprung (Li, McNamara et al. 1996; Naik, Sathe et al. 2007; Shortman and Naik 2007). Alle DZ haben ihren Ursprung im Knochenmark als hämatopoetische Stammzelle, weshalb man lange dachte, dass alle DZ myeloiden Ursprungs sind. Inzwischen konnten aber einige Studien zeigen, dass residente DZ im lymphatischen Gewebe verschiedene Marker exprimieren, die nur mit lymphatischen Zellen assoziiert werden, wie z.B. $CD8\alpha$, CD4, CD2 und CD25 (Vremec, Zorbas et al. 1992), aber keine typisch myeloiden Marker exprimieren. Mittels Transkriptionsfaktoren und Zytokinen können sich DZ in zwei verschiedene Populationen differenzieren: *myeloide DZ* (mDZ) und *lymphoide DZ*, die wegen ihres Aussehens auch *plasmazytoide DZ* (pDZ) genannt werden. In einer Arbeit von Dzionek et al. (Dzionek, Fuchs et al. 2000) konnte gezeigt werden, dass der Oberflächen-

Marker BDCA-1 (blood dendritic cell antigen 1) nur auf mDZ und BDCA-2 (blood dendritic cell antigen 2) exklusiv auf pDZ exprimiert wird.

Allerdings gibt es noch eine Vielzahl an weiteren membranständigen Rezeptoren, die je nach Aktivierungszustand der Zelle exprimiert werden und so die Zelle zu verschiedenen Stellen im Körper leiten können. Als Ligand für diese membranständigen Rezeptoren dienen eine Reihe von Proteinen, die sogenannten Chemokine, die die Grundlage für die Migration DZ sind.

1.6 Chemokine

Chemokine sind kleine, chemotaktische Proteine mit einem Molekulargewicht von bis zu 14 Kilodalton (kDa), einer Peptidlänge von 70 bis 130 Aminosäuren und interagieren über einen G-Protein gekoppelten Transmembranrezeptor. (Greaves and Schall 2000; Rossi and Zlotnik 2000; Zernecke, Shagdarsuren et al. 2008)

Gemein ist allen Chemokinen, dass sie zirkulierende Leukozyten zu den verschiedenen Inflammationsherden im Körper rekrutieren können (Charo and Ransohoff 2006) und somit unter anderem zur Wundheilung, der TH1-/TH2-Entwicklung, der Entwicklung lymphoider Organe, der Angiogenese und schließlich auch zur Atherogenese beitragen können (Abbildung 2) (Zlotnik, Morales et al. 1999; Greaves and Schall 2000; Rossi and Zlotnik 2000; Szekanecz and Koch 2001; Charo and Ransohoff 2006).

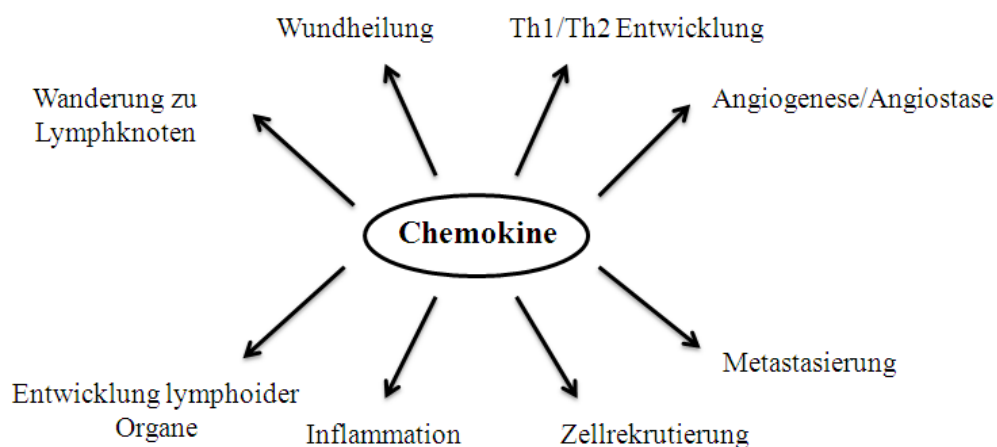


Abb.2: nach Rossi et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 2000 (Rossi and Zlotnik 2000)

Allerdings erfolgt eine Einteilung der Chemokine nicht nach den oben genannten Kriterien, sondern nach ihrer chemischen Struktur. So leitet sich die systematische Nomenklatur aus der Anzahl und Position der Cysteinreste am Amino-Terminus ab, wodurch sich vier Untergruppen unterscheiden lassen (Mantovani 1999; Zlotnik, Morales et al. 1999; Koenen and Weber 2011).

Die α - oder CXC-Chemokine haben zwischen ihren Cystein-Bausteinen eine Aminosäure, wohingegen die CC-Chemokine (oder β -Chemokine) keine Aminosäure zwischen sich binden und über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind.

Die Nomenklatur der Chemokin-Rezeptoren, die sich auf einer Vielzahl von Zellen wiederfinden lassen, richtet sich nach den Chemokinen. Das *L* für Ligand wird durch ein *R*

für Rezeptor ersetzt und die Nummerierung ist auch hier wieder fortlaufend, allerdings nicht simultan zu den Chemokinen.

Chemokine binden an einen Sieben-Transmembran-G-Protein gekoppelten Rezeptor. An einen Rezeptor können mehrere Chemokine mit unterschiedlicher Affinität als Liganden binden oder ein Ligand an mehrere unterschiedliche Rezeptoren. Das Mantovani-Model besagt, dass bei Vorhandensein mehrerer Chemokine ein additiver Effekt entsteht und eine exponierte Zelle somit auf einen Reiz differenzierter reagiert (Mantovani 1999; Greaves and Schall 2000). So bindet z.B. der Rezeptor CCR1, der auf T-Zellen, Monozyten, Eosinophilen und Basophilen zu finden ist, gleich elf verschiedene Chemokine. Umgekehrt kann das Chemokin CCL6 an die Rezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5 binden und ist somit ein Ligand für viele Zellen des Immunsystems.

1.7 Interaktion zwischen Chemokinen und Dendritischen Zellen

Aus funktioneller Sicht muss man zwischen *homöostatischen* und *inflammatorischen* Chemokinen unterscheiden. Letztere werden akut bei Krankheit oder Verletzung im betroffenen Gewebe synthetisiert, um so z.B. eine zielgerichtete Bewegung von Neutrophilen, Monozyten und unreifen DZ an den Ort der Verletzung zu dirigieren. Es konnte gezeigt werden, dass bei Anwesenheit des bakteriellen Endotoxins Lipopolysaccharid (LPS) bestimmte Chemokine von den Endothelzellen (EZ) am Ort der Verletzung sofort stark hochreguliert werden und somit Neutrophile und Monozyten angelockt werden (Greaves and Schall 2000).

Doch nicht nur das Endothel ist ein Syntheseort für Chemokine. Angelockte oder bereits vor Ort befindliche Makrophagen produzieren ihrerseits Chemokine bzw. Interleukine (Steinman, Witmer-Pack et al. 1993).

Über CCR6 und weitere Rezeptoren können zirkulierende unreife DZ die Liganden binden, an die Entzündungsstelle wandern und dort die Antigene aufnehmen (Vecchi, Massimiliano et al. 1999; Vanbervliet, Homey et al. 2002). Unreife DZ phagozytieren die Antigene und präsentieren sie anschließend über MHC-II-Moleküle an ihrer Oberfläche. Dabei maturieren DZ und verändern ihr Oberflächenprofil, indem die Expression der inflammatorischen Chemokin-Rezeptoren vermindert wird.

Allerdings können DZ nicht nur – je nach Reifestadium - auf unterschiedliche Chemokine reagieren, sondern selbst auch Chemokine produzieren. So gibt es einerseits Chemokine die von DZ konstitutiv exprimiert werden. Andererseits werden die inflammatorischen Chemokine, z.B. CCL19/MIP-3 β , CCL21/SLC hingegen erst nach Zugabe von LPS, TNF α oder einem Pathogen synthetisiert. Diese Chemokine wirken nun ihrerseits wieder auf weitere Zellen des Immunsystems, wie z.B. B- und T-Lymphozyten (Allavena, Sica et al. 2000).

Loetscher et al. haben bereits 1994 festgestellt, dass die meisten Gene für Chemokinrezeptoren konstitutiv exprimiert werden und immer auf der Zelloberfläche gefunden werden können. Eine verstärkte oder verminderte Expression erfolgt je nach Reifung der DZ (Loetscher, Geiser et al. 1994).

Homöostatische Chemokine, oder auch lymphatische Chemokine genannt, werden überwiegend in lymphatischen Organen exprimiert und spielen hier eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung lymphoider Organstrukturen, der Migration von Lymphozyten innerhalb des Thymus und auch der Migration DZ in sekundäre lymphatische Organe, wie

z.B. den Lymphknoten (Saeki, Moore et al. 1999; Ansel and Cyster 2001; Romani, Ratzinger et al. 2001).

Bei der Reifung DZ kommt es zu einer Herunterregulation der inflammatorischen Chemokinrezeptoren und einer gleichzeitig verstärkten Oberflächenexpression des homöostatischen Chemokinrezeptors CCR7 (McColl 2002). Somit erlangt die DZ die Fähigkeit auf die Liganden CCL19/MIP-3 β /ELC (ELC = EBI1 ligand chemokine) und CCL21/SLC (SLC = secondary lymphoid tissue chemokine, 6CKine), die konstitutiv in den T-Zell-Zonen des sekundären lymphatischen Gewebes, im lymphatischen Endothel verschiedener Gewebe und in HEV (HEV = high endothelial venules) exprimiert werden, chemotaktisch zu antworten (Gunn, Tangemann et al. 1998; McColl 2002).

Somit scheint also das Zusammenspiel zwischen der Herunterregulation inflammatorischer Chemokinrezeptoren einerseits und die verstärkte Expression homöostatischer Rezeptoren andererseits, notwendig für die Migration DZ zu drainierenden Lymphknoten.

Diese These konnte auch durch in vivo Experimente verdeutlicht werden. So konnten Förster et al. bei CCR7-defizienten Mäusen keine Wanderung reifer DZ zum Lymphknoten feststellen. Wurden diese Mäuse mit anti-CCL21 Antikörpern behandelt, konnte keine Migration der Antigen-beladenen DZ zum Lymphknoten beobachtet werden (Forster, Schubel et al. 1999). Versuche mit plt-Mäusen (paucity of lymph node T cells), bei denen kein CCL19 und CCL21 nachweisbar sind, zeigten im Gegensatz zum Wildtyp eine um 75% verringerte Migrationsrate von DZ zum Lymphknoten und innerhalb des Lymphknotens eine um bis zu 60% verringerte Anzahl an DZ (Mori, Nakano et al. 2001). Auch Studien mit ApoE⁻-defizienten Mäusen zeigten eine verringerte Expression von CCR7 als der Wildtyp. Gleichzeitig konnten sie eine verstärkte Atherogenese in den ApoE⁻-Mäusen nachweisen, die regredient war, wenn die Atherosklerose-Plaques in Wildtyp-Mäuse transplantiert wurden (Trogan, Feig et al. 2006).

Zusammenfassend wird deutlich, dass die CCR7/CCL21-Achse eine wesentliche Rolle im Migrationsverhalten der DZ - insbesondere auch im atherosklerotischen Plaque - spielt.

1.8 Die Rolle der DZ und ihrer Chemokine in der Atherosklerose

Bobryshev identifizierte 1995 DZ in der Arterienwand, die vorwiegend entlang des Endothels in einer subendothelialen Schicht der Intima lokalisiert und auch in gesunden Arterien zu finden sind (Bobryshev and Lord 1995; Waltner-Romen, Falkensammer et al. 1998; Bobryshev 2005). Da sich in der Intima das VALT (vascular-associated lymphoid tissue) befindet, welches als Analogon zum MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) fungiert und DZ die Peripherie als Sentinels auf der Suche nach Antigenen durchwandern, ist es durchaus physiologisch T-Zellen, residente Makrophagen und DZ vorzufinden. Unreife DZ reagieren chemotaktisch auf Chemokine, welche vom Endothel synthetisiert werden und wandern in die Intima ein (McColl 2002).

In der Intima einer gesunden Aorta finden sich in Regionen, die einem hohen hämodynamischen Stress ausgesetzt sind, mehr vaskuläre DZ, wobei sie sich als Cluster in der subendothelialen Schicht formieren (Lord and Bobryshev 1999). Bei einer verstärkten Scherspannung, welche in Regionen mit erhöhter Flussgeschwindigkeit zu messen ist (Hagihara, Higuchi et al. 2004), können Thrombozyten eine DZ-Maturation induzieren, indem sie Chemokine produzieren. Somit tragen auch Thrombozyten zur vaskulären Dysfunktion mit neointimaler Hyperplasie und Atherosklerose bei (Koenen and Weber 2010).

Bereits bei gesunden Kindern kommt es zu einer vermehrten Anzahl DZ in der Intima in Regionen mit erhöhter Flussgeschwindigkeit (Millonig, Niederegger et al. 2001). In einer normalen, atherosklerosefreien Intima finden sich in der Nähe des Endothels niedrigdifferenzierte vaskuläre DZ. Bereits in frühen Stadien der Atherosklerose ist eine verstärkte Aktivierung der DZ zu beobachten. Bei einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion wandern in den Plaque zusätzlich zu den bereits vorhandenen vaskulären DZ, zirkulierende DZ ein (Bobryshev and Lord 1998; Bobryshev 2000). Die Adhäsion von DZ und ihre Migration werden moduliert durch Veränderungen der Endothelfunktion. Desweiteren konnte bereits gezeigt werden, dass in einer stabilen Plaqueregion weniger DZ zu finden sind, als in instabilen Regionen (Yilmaz, Lochno et al. 2004).

1.9 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es die Maturierung von Dendritischen Zellen (CD83), die Expression und Modulation des Homing-Rezeptors CCR7 (auf Dendritischen Zellen) und dessen Liganden CCL21 und CCL19 (exprimiert von Endothelzellen) im atherosklerotischen Plaque zu charakterisieren und die Relevanz proatherogener Faktoren zu bestimmen.

Hierzu untersuchten wir zunächst *in vivo* die genannten Parameter in insgesamt 47 humanen atherosklerotischen Plaques sowie im Serum dieser Patienten und korrelierten diese Daten mit 14 humanen atherosklerosefreien aortalen Gefäßabschnitten und dem Serum von 10 gesunden Probanden.

Im zweiten Teil der Arbeit untersuchten wir *in vitro* den Einfluss der Stressfaktoren oxLDL und ADMA auf das Expressionsmuster von Dendritischen Zellen und humanen mikrovaskulären Endothelzellen.

Folgende Fragestellungen wurden dabei konkret untersucht:

- Haben klassische Risikofaktoren einen Einfluss auf das Homing der DZ bzw. deren relevantes Chemokin-Profil (CCR7, CCL19/21) im atherosklerotischen Plaque?
- Gibt es Hinweise auf eine Veränderung von CCR7 und dessen korrespondierenden Liganden CCL21 im atherosklerotischen Plaque verglichen mit gesundem Gewebe?
- Lassen sich anhand der Serumkonzentrationen von oxLDL, ADMA und löslichem CCL21 Rückschlüsse auf die Expression von CCR7 und CCL21 im Plaque schließen?
- Können oxLDL und ADMA die Expression von CCR7 bzw. CCL21/19 auf DZ bzw. EZ beeinflussen?

2. MATERIAL

2.1 Geräte

Durchflußzytometer (FACScan):	BD Biosciences Pharmingen, Deutschland
Zentrifugen:	
Centrifuge 5804	Eppendorf , Deutschland
Rotina 46 R	Hettich Zentrifugen, Deutschland
Mikro 22 R	Hettich Zentrifugen, Deutschland
Chemilumineszenz Detektor	Tecan Genios Multireader, Tecan, Österreich
PD10 Säule	Pharmacia, Österreich
Floureszenzmikroskop	Zeiss, Deutschland
Konfokales Mikroskop	Zeiss LSM 5, Deutschland
Ultraschallgerät	Bandelin SonoPlus, Berlin, Deutschland
Spektralphotometer	Eppendorf BioPhotometer
ABI PRISMTM 7700 System	Applied Biosystems, Deutschland

2.2 Chemikalien

2.2.1 Substanzen für Zellkulturmedien und Immunfluoreszenz

MCDB 131 Medium	c.c.pro GmbH, Neustadt, Deutschland
Fetales Kalbserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
VLE RPMI-1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ham´s F-10 Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Hydrokortison	Sigma GmbH, Taufkirchen, Deutschland
epidermaler Wachstumsfaktor	Sigma GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Mowiol Einbettmedium	Calbiochem, San Diego, USA
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Vector Laboratories, Kalifornien, USA

2.2.2 Antikörper

CD1c (BDCA1)	Miltenyi Biotech, Deutschland
CD83 FITC	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD 303 (BDCA2)	Miltenyi Biotech, Deutschland
Anti-goat IgG	R&D Systems, Minneapolis, USA
CCL19	R&D Systems, Minneapolis, USA
CCL21	R&D Systems, Minneapolis, USA
von Willebrandt Faktor (Clone F8/86)	Dako Cytomation, Hamburg, Germany
Anti-Mouse PE	BD Biosciences Pharmingen, Deutschland
α -PECAM-Cy3	BD Biosciences Pharmingen, Deutschland

2.2.3 Zytokine

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

2.2.4 Lösungen

FACS Puffer	eigene Herstellung,
NaN ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Rabbit-Serum	eigene Herstellung

2.3 Sonstige Substanzen und Kits

Alkalinphosphatase	DAKO Cytomation, Hamburg, Germany
Ficoll Paque Plus	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden
γ -Globuline	Octapharma Deutschland GMBH
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Cholesterin Assay	Boehringer Mannheim, Deutschland
Limulus amoebocyte lysate Assay	Labortechnik Peter Schultz, Deutschland
Kinetic-QCL-Test	BioWhittaker, Deutschland

RNAeasy RNA Isolierungskit	Qiagen, Hilden, Deutschland
On-Column DNase Digestion	Qiagen, Hilden, Deutschland
Omniscript	Qiagen, Hilden, Deutschland
Omniscript Reverse Transcription	Qiagen, Hilden, Deutschland
SYBER green primers	Qiagen, Hilden, Deutschland
ELISA-Kit	Immundiagnostik, Hamburg, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Peroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
DAKO pen	Dako, Kalifornien, USA

3. Methoden

3.1 In vivo

3.1.1 Studiendesign

3.1.1.1 Ethikantrag

Zu Beginn wurde den Mitgliedern der Ethikkommission (EK) der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität die Studie (*Projekt-Nr.: 342-06*) zur Prüfung vorgelegt und die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkannt. Die schriftliche Aufklärung bestand aus Patienteninformation und Einverständniserklärung, die jeweils den Kopfbogen der Klinik, Name und Telefonnummer des verantwortlichen Arztes und den vollständigen Titel der Studie tragen. Die Studie ist auf einer DIN A4 Seite unter Vermeidung von Fachausdrücken erklärt, wobei explizit darauf hingewiesen wird, dass dem Patienten kein zusätzliches Material entnommen wird, sondern nur das Gewebe Verwendung findet, welches nicht zur weiteren Diagnostik notwendig ist und deshalb verworfen werden würde. Der datenschutzrechtliche Passus entspricht den Richtlinien der EK und die Patienten wurden darauf hingewiesen, dass sie jederzeit ohne Angabe von Gründen von der Studienteilnahme zurücktreten können. Am Ende der Einverständniserklärung ist eine Unterschriftenzeile sowohl für den Patienten als auch für den aufklärenden Arzt vorgesehen. Ein Anamnesebogen wurde erstellt, um eine ausführliche Medikamentenliste zu erstellen und die Risikofaktoren zu erfassen (Anamnesebogen, Patienteninformation und Einverständniserklärung siehe Anhang, Punkt 9).

3.1.1.2 Patientenrekrutierung

Im September 2006 wurde mit der Rekrutierung der Patienten begonnen und wurde ein Jahr später im Mai 2008 abgeschlossen. Insgesamt wurden 47 Patienten in die Studie eingeschlossen, die sich in der chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums München-Großhadern zur elektiven Thrombendarteriektomie (TEA) bei hochgradiger atherosklerotischer Stenose der Arteria carotis interna (ACI) vorstellten. Die Indikation zur

TEA wurde bei zerebral symptomatischen Patienten bei einer Stenose der ACI von 70% und bei asymptomatischen Patienten bei einer Stenose von 85% sonographisch gestellt. Als Ausschlusskriterium galt eine floride, maligne Erkrankung oder Autoimmunerkrankung.

3.1.2 Isolierung und Präzipitation von RNS

3.1.2.1 Isolierung und Präzipitation von RNS aus Gewebe

Die RNS aus dem Plaquegewebe wurde mittels „RNAeasy RNA Isolierungskit“ (Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert und präzipitiert. Es ist darauf zu achten, nicht mehr als 100 mg Gewebe zu verwenden, um keine verfälschten Ergebnisse zu erhalten. Nach dem Schneiden in möglichst kleine Teile wurde 1 ml QIAzol Lysis Reagenz hinzugegeben, anschließend in einem Rotor (Rotina 46 R, Hettich Zentrifugen, Deutschland) homogenisiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Um die anschließende Phasentrennung zu ermöglichen, wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben, für einige Sekunden stark geschüttelt und schließlich wieder für zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde das Homogenisat bei 12000 x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert, wobei sich drei Phasen ergaben: Eine obere, farblose, wässrige Phase, die RNS enthält, eine milchige Zwischenphase, bestehend aus DNS und schließlich eine untere, organische Phase. Die wässrige Phase (ca. 600µl) wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Ethanol (70%) versetzt, um die RNS auszufällen. Der Probe wurde 700µl entnommen, in die „RNeasy Mini Spin Column“ gegeben und bei Raumtemperatur für 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Nach Zugabe von 700 µl Kit-Puffer wurde der Zentrifugierungsschritt wiederholt. Zwar filtern die „Mini Spin Column“ die RNS bereits gut heraus, doch um den Reinheitsgrad noch zu erhöhen wurde DNase nach Angaben des Herstellers hinzugegeben („On-Column DNase Digestion with RNase-free DNase“-Set von Qiagen, Kat. #: 79254). Die Probe wurde in ein neues 2 ml Gefäß überführt. Auf die Säule wurden 500 µl Kit-Puffer pipettiert und wieder für 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Um die RNS stabil zu lagern wurde sie bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C unter Ethanol aufbewahrt. Die Ausbeute an Gesamt-RNS lag pro 10⁶ Lymphozyten bei durchschnittlich 1 µg RNS.

3.1.2.2 Isolierung und Präzipitation von RNS aus peripherem Blut

Zunächst wurden aus den 50ml Blutproben der Patienten die mononukleären Zellen durch einen Ficoll Dichtegradienten nach dem Protokoll von Boyum et al. (Boyum 1983) wie bereits beschrieben isoliert. Um anschließend aus den PBMZ die RNS zu isolieren, wurde das „RNAeasy Mini Kit“ (Kat. #: 74104) von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.1.3 Bestimmung von Reinheit und Konzentration der RNS

Die Ausbeute und Reinheit der RNA Präparationen wurde durch Messungen ihrer optischen Dichte (OD) bei 260nm in einem Spektralphotometer (Eppendorf BioPhotometer) bestimmt. Der Quotient der bei 260nm und 280nm ($OD_{260}/280$) gemessenen Absorptionskoeffizienten der Nukleinsäurelösungen gibt Aufschluss über die Reinheit der Präparation. Bei sehr reinen RNS-Lösungen liegt der Quotient zwischen 1,9 und 2,0. Eine OD_{260} entspricht 37 $\mu\text{g/ml}$ RNS oder 20 $\mu\text{g/ml}$ kurzkettiger Oligonukleotide (Sambrook and Gething 1989).

Für die Sequenzierungen wurde die RNS-Konzentration der Proben durch Vergleich mit einer Referenz-RNS bekannter Länge und Konzentration (z.B.: 1 kb-Ladder, RNA-Mass Ladder) nach dem Elektrophoreselauf optisch abgeschätzt.

3.1.4 Herstellung von cDNS aus RNS durch reverse Transkription

Das Enzym Reverse Transkriptase kann RNS in DNS umschreiben. Für die reverse Transkription wurde die gesamte RNS eingesetzt. Als Primer für die Erststrangsynthese wurde Omniscript Reverse Transcription (Kat. #: 205113) von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet, mittels dessen die gesamte prozessierte mRNA in cDNS umgeschrieben werden konnte. Als Template wurde 1 μg RNS verwendet. Folgendes wurde dabei jedem Ansatz zugesetzt:

<i>Master mix</i>	<i>Volume/reaction</i>	<i>Final concentration</i>
10x Buffer RT	2µl	1x
dNTP Mix	2µl	0,5mM pro dNTP
Oligo dT primer (µM)	2µl	1µM
RNase Inhibitor (10 U/µl)	1µl	10U
Omniscript RT	1µl	4U

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Substanzen für die Herstellung von cDNS

Der gesamte Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die reverse Transkriptase bei 70°C für 15 Minuten inaktiviert. Die cDNS wurde mit 80 µl H₂O bidest auf 100 µl verdünnt und bis zur PCR bei -20°C gefroren. Für die anschließende PCR-Reaktion wurde 1 µl cDNS eingesetzt.

3.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wird eingesetzt, um einen kurzen, genau definierten Teil eines DNS-Stranges zu vervielfältigen. Dabei kann es sich um ein Gen oder auch nur um einen Teil eines Gens handeln oder auch um nicht kodierende DNS-Sequenzen. Es binden jeweils zwei Oligonukleotidstartermoleküle (Primer) in vitro an die komplementären DNS Stränge und flankieren so die zu amplifizierende Region in der Ziel DNS. Die vielfache Wiederholung des gleichen Reaktionszyklus von Denaturierungs-, Primeranlagerungs- und Polymerisationsschritten führt zu einer spezifischen, theoretisch exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNS Fragments. Im Gegensatz zur DNS-PCR wird bei der RT-PCR (Reverse-Transkriptase-PCR) cDNS als Template verwendet. Dadurch konnte in dieser Arbeit die mRNS bestimmter Chemokine in Blut auf PBMZ und im Carotisplaque nachgewiesen werden. Um die cDNS zu amplifizieren wurde Omniscript (Kat. #: 205113) von Qiagen (Hildesheim, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Als Primer wurden in der quantitativen RT-PCR die SYBER Green primers von Qiagen (Kat. #: 204143) hergenommen und im ABI PRISMTM 7700 System (Applied Biosystems, Deutschland) durchgeführt.

<i>Master mix</i>	<i>Volumen/Reaktion</i>
SYBER Green (Qiagen)	12,5µl
Primer (Fow/rev)	1µl
Rnase freies Wasser	10,5µl
cDNA (~ 50 pg)	1µl

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Substanzen für PCR

Die initiale Denaturierung bei 95°C dauerte 15 Minuten. Der anschließende Reaktionszyklus lief wie folgt ab:

	<i>Zeit:</i>	<i>Temperatur:</i>	<i>Anmerkung:</i>
Denaturierung:	15 Sek.	95°	
Annealing:	30 Sek.	60°	40 Zyklen
Extension:	30 Sek.	72°	
Final extension:	10 Min.	72°	

Tabelle 3: Ablauf Reaktionszyklus

Folgende Primersequenzen wurden analysiert:

GAPDH	5'- CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3' 5'- AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'
CCL19	5'- CTG TGA CCC AGA AAC CCA TC-3' 5'- GCT TCA TCT TGG CTG AGG TC-3'
CCL21	5'- CCC AGC TAT CCT GTT CTT GC-3' 5'- TCA GTC CTC TTG CAG CCT TT-3'
CCR7	5'- TGG AGG CCT TTA TCA CCA TC-3' 5'- TGT AGG GCA GCT GGA AGA CT -3'
CD83	5'- CGG TCT CCT GGG TCA AGT TA-3' 5'- AGA ACC ATT TTG CCC CTT CT-3'
BDCA1	5'- AGG AGC AAC TGG GCA CTA AA-3' 5'- GAT GAT GTC CTG GCC TCC TA -3'
BDCA2	5'- ACT GGG ATG CAA TCT TGG AC-3' 5'- GAT CTG ACA GCC CAG AAA A-3'

Tabelle 4: Übersicht Primersequenzen

Die Datenanalyse erfolgte mittels der Delta-Delta-ct-Methode (Livak and Schmittgen 2001), wobei als Referenzgen hGAPDH (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet wurde. Der ct-Wert eines Gens ist die n-fache Expression in der rt-PCR. Zunächst ermittelt man den Δ ct-Wert, indem man die Differenz von Ziel- und Referenzgen bildet. Anschließend wird von diesem Δ ct-Wert der Δ ct-Wert der Kontrolle (gesunde Spender) subtrahiert und erhält so den $\Delta\Delta$ ct-Wert. Das Verhältnis zwischen Patienten und gesunder Kontrolle erhält man mittels folgender Formel: $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$

Bei der graphischen Darstellung der Daten beschreibt die y-Achse (Ordinatenachse) die logarithmischen Werte der n-fachen Expression eines ct-Wertes eines Gens. Die x-Achse (Abszissenachse) schneidet die Ordinate bei 1 (= Kontrolle), um eine Zu- bzw. Abnahme des untersuchten ct-Wertes eines Gens darzustellen.

3.1.6 Immunfluoreszenz: Gefäßabschnitte der Aorta ascendens und ACI

Die Schnitte (Aorta ascendens: n = 6; ACI: n = 15), die bei -80° Celsius trocken eingefroren waren, wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und trockneten für 20 Minuten. Anschließend wurden sie mit einem Aceton - Methanol - Gemisch (1:1), welches bei -20°C gelagert wurde, für 90 Sekunden gewaschen. Das Aceton – Methanol – Gemisch wurde abgeschüttet und die Präparate mit PBS dreimal je drei Minuten gewaschen.

Um eine unspezifische Bindung zu verhindern, wurde für eine Stunde eine 2%-ige BSA/0,2% Tween20 Lösung aufgetragen und anschließend erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden mit einem Cy3-gelabelten anti-Pecam Antikörper (5µg/ml AbD Serotec) inkubiert, um die Vasa vasorum sichtbar zu machen.

Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Schnitte mit einem Atto594-gelabelten anti-human CCL21/6CKine Antikörper (5µg/ml, R&D Systems Inc.) inkubiert. Die Spezifität der CCL21/6CKine Färbung wurde mittels eines Kontroll Antikörpers sichergestellt, der mit demselben Fluorophor gelabelt war. Die Analyse der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops (LSM 510 META, Zeiss, Plan-Neofluar 40x/1.30 Öl beschichtetes Objektiv). Die CCL21-gelabelten Plaqueabschnitte wurden mit einem Konfokalmikroskop (Zeiss LDM 5, Deutschland) untersucht und mit einem LSM 510 Image Browser 4.2 (Zeiss, Deutschland) quantifiziert. Die Auszählung erfolgte als Anzahl eines Fluoreszenzsignals/mm². Die Ergebnisse wurden zur anschaulicheren Darstellung in Prozentränge umgerechnet, wobei der Mittelwert der untersuchten histologischen Präparate der humanen Aorta ascendens = 100% gesetzt wurde.

3.1.7 ELISA

Ein ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ist ein verbreitetes Verfahren, um bestimmte Proteine mittels Antigen-Antikörper-Reaktion nachweisen zu können. In dieser Arbeit wurden die oxLDL-, ADMA- und CCL21-Level der entnommenen Blutproben durch dieses klassische „Sandwich“-Immunoassay ermittelt. Hierfür wurden die entnommenen Blutproben zentrifugiert und das so gewonnene Plasma bzw. Serum bei -80° Celsius eingefroren.

Um die *oxLDL*-Werte aus dem Plasma zu ermitteln, wurde ein Zytokin-spezifisches ELISA Kit (ImmunDiagnostik, Bensheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Proben wurden mit einem Puffer mehrmals gewaschen, um alle ungebundenen Substanzen zu entfernen. Nach Zugabe der im Kit vorhandenen Substanzen wurden die Proben für vier Stunden bei Raumtemperatur im Horizontalmixer inkubiert. Dabei wird das Chemokin von immobilisierten polyklonalen Antikörpern gebunden. Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein Konjugat zugegeben und erneut für eine Stunde inkubiert. Nach Zugabe des Peroxidasesubstrats Tetramethylbenzidin (TMB) wurde die Probe für 25 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dabei direkt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten. Anschließend wird eine Standardkurve erstellt, aus der die Konzentrationen der einzelnen Proben ermittelt werden können.

Um die *ADMA*-Spiegel im Plasma zu messen, wurde das Protokoll von Schulze et al. (Schulze, Wesemann et al. 2004) verwendet. Die Sensitivität des ELISA liegt bei 0,05 – 5,0 µM ADMA (DLD Diagnostika, Hamburg, Deutschland).

Die *CCL21*-Spiegel wurden im Serum bestimmt, nachdem die Proben wie bereits beschrieben aufbereitet worden sind. Der Immunoassay wurde nach Angaben des Herstellers (R&D Systems, USA) durchgeführt.

3.2 In vitro

3.2.1 Kultivierung Monozyten generierter Dendritischer Zellen (MGDZ)

Mononukleäre Zellen wurden durch einen Ficoll Dichtegradienten nach dem Protokoll von Boyum et al. (Boyum 1983) aus dem Blut von männlichen gesunden Spendern isoliert. Dafür wurde den Spendern 100 ml peripheres Blut entnommen und zu 100 ml RPMI Medium (Biochrom AG) 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°C 25 Minuten lang bei 2500 x g zentrifugiert (Bodenzentrifuge).

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 (Firma?) verdünnt, daraufhin ein Mal bei 1500 x g für 10 Minuten und zwei Mal bei 1500 x g für fünf Minuten gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in 24 ml RPMI-Medium, das Penicillin/Streptomycin, 4 ml Glutamin (200mmol/L) und 50 ml FCS (Biochrom AG) (Kulturmedium) enthielt, aufgenommen. 12 Petrischalen wurden mit je 1,5 ml eines 1:3 Gemisches aus Gamma-Globulin und PBS (Biochrom AG) beschichtet. Nach 30 Minuten wurde der Überstand entfernt und die Zellen wurden auf die Petrischalen ausgesät (2 ml pro Petrischale). Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C wurden die Platten mit dem RPMI-Kulturmedium abgewaschen. Nur die adhärennten 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 DZ erfolgte nach dem Protokoll von Romani et al. (Romani, Ratzinger et al. 2001). So wurden 3 ml RPMI-Kulturmedium, das zusätzlich 3 µl GM-CSF (20 µl/ml) (PeproTech, Inc.) und 3 µl IL 4 (20 µg/ml) (PeproTech, Inc.) enthielt, zu den Zellen jeder Platte dazugegeben. Jeweils 1 ml des Mediums wurde alle 3 Tage durch frisches Medium ersetzt.

Für die Versuche wurden die Zellen am gewünschten Kulturtag folgendermaßen geerntet: Jede 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 in ein 15- oder 50 ml-Falcon (je nach Anzahl der Platten) überführt. So wurde mit allen Platten verfahren und die Suspensionen von Platten gleicher Art (z.B. Negativkontrolle) gesammelt. Daraufhin wurden die Falcons fünf Minuten bei 1500

Umdrehungen gewaschen, der Überstand wurde, falls er für Experimente (z.B. ELISA) benötigt wurde, abgenommen, andernfalls wurde er verworfen. Die Zellen wurden ein Mal in PBS gewaschen (1500 x g für 5 Minuten), in 1 ml PBS resuspendiert, anschließend wurden davon 10µl in eine Neubauer Zählkammer überführt und die lebenden Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt.

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

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

3.2.2 Kultivierung humaner mikrovaskulärer Endothelzellen

Die Experimente wurden mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen (hmEZ) durchgeführt, die uns von dem „Center for Disease Control and Prevention and the National Center for Infectious Disease“ (Atlanta, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Die Zellen wurden in MCDB 131 (ohne Phenol rot; cc pro, Neustadt, Germany) kultiviert und mit 10%-igem fetalem Kalbserum (FCS, PAA, Pasching, Österreich), 2 mM L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 1µg/ml Hydrokortison (Sigma GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und 10 ng/ml epidermalen Wachstumsfaktor (Sigma GmbH, Taufkirchen, Deutschland) supplementiert. Die Zellen wurden nur bis zu zehn Tage nach dem Auftauen und für maximal 20 Durchläufe verwendet.

3.2.3 LDL-Oxidation

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 EDTA enthielt, gelagert (Brand, Banka et al. 1994). Unmittelbar vor der Oxidierung wurde das EDTA aus LDL isoliert, indem es über eine PD-10 Säule (Pharmacia, Austria) gegeben wurde. Das LDL wurde in Ham's F-10 Medium (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) durch die Zugabe von 5 µmol/L CuSO₄ bei 37°C oxidiert (Brand, Banka et al. 1994). Für die beschriebenen Experimente wurde das Präparat dialysiert bevor es zu den kultivierten Zellen gegeben wurde. Die Proteinkonzentration wurde durch die Lowry-Methode und der Cholesteringehalt durch den Cholesterinassay von Boehringer Mannheim (Deutschland) bestimmt. Thiobarbituratsäure-reaktive

Substanzen (TBARS) wurden wie beschrieben gemessen; der initiale TBARS-Wert lag unter 0,1 nmol Malondialdehyd-Equivalente/mg Protein.

Alle verwendeten Reagenzien, Wasser und auch das Kulturgeschirr waren pyrogenfrei und steril, um eine Kontamination mit Endotoxinen während der Lipoproteinisolierung und –oxidation zu vermeiden. Mittels *limulus amoebocyte lysate* Assay (Labortechnik Peter Schultz, Deutschland) und dem Kinetic-QCL-Test (BioWhittaker, Deutschland) wurden Endotoxinkontaminationen entdeckt und nur Lipoprotein-Präparate mit einem Endotoxin-Gehalt < 10 pg/ml wurden für die Experimente verwendet. Eine solche Konzentration ähnelt den oxLDL-Konzentrationen im Plaque und wurde in vorausgegangenen Studien ebenfalls angenommen (Nishi, Itabe et al. 2002; Weis, Schlichting et al. 2002; Coutant, Agaugue et al. 2004).

3.2.4 Isolierung der RNS aus MGDZ und hmEZ und rt-PCR

Um die mRNA von hmEZ und MGDZ zu isolieren, wurde das „RNAeasy RNA Isolierungskit“ von Qiagen (Hilden, Deutschland, Kat. # 74104) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die Herstellung von cDNA aus RNS durch reverse Transkription wurde ausgeführt, wie bereits unter 4.1.4 erwähnt. Auch die quantitative rt-PCR wurde nach Angaben des Herstellers wie oben (4.1.5) beschrieben durchgeführt.

3.2.5 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 fünf Minuten lang bei 1500 g zentrifugiert, und das entstandene Zellpellet wurde in einer so großen Menge FACS-Puffer (ca. 4°C) aufgenommen, dass sich 1×10^5 Zellen in 100 µl FACS-Puffer befanden. Aus der entstandenen Suspension wurden jeweils 100 µl bzw. 1×10^5 Zellen entnommen und in ein FACS-Röhrchen überführt.

Als nächster Schritt erfolgte die Inkubation der DZ mit dem bzw. den jeweiligen FACS-Antikörper(n). Hierbei ist darauf zu achten, dass die Zellen keiner unnötigen Erwärmung oder Lichteinstrahlung ausgesetzt werden. So wurden die FACS-Röhrchen auf Eis gestellt und die FACS-Antikörper 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 (ca. 4°C) gestellt

wurden. Abbildung 5 zeigt die verwendeten Mengen an Antikörper und die benötigte Inkubationszeit:

Antikörper	Konzentration	Inkubationszeit
ISO-FITC Mouse IgG1	1 : 100	30 min
CD 83 FITC	1 : 100	30 min
BDCA-1 FITC	1 : 100	30 min
BDCA-2 FITC	1 : 100	30 min

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Antikörper

Die DZ eines Ansatzes wurden entweder mit nur einem Antikörper (FITC- oder PE-gelabelt; Einfachfärbung), oder mit zwei Antikörpern inkubiert, wobei der eine FITC-gelabelt war und der andere PE-gelabelt (Doppelfärbung). Einige der Antikörper sind weder FITC- noch PE-gelabelt und benötigten deshalb einen sogenannten Sekundärantikörper, der nach der Inkubation der Zellen mit dem Primärantikörper an diesen bindet.

Nach der Inkubation musste der nicht-gebundene Antikörper aus der Lösung ausgewaschen werden. Dazu wurden 500 µl FACS-Puffer in jedes Röhrchen gegeben und diese fünf Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und falls erforderlich wurde ein zweiter Antikörper oder ein Sekundärantikörper in das betreffende Röhrchen pipettiert. Nach der letzten Inkubation wurden 300 µl PBS nach dem Waschvorgang in jedes Röhrchen gegeben; somit waren die Proben analysebereit.

3.2.6 Immunfluoreszenz: CCL21 auf hmEZ

Die Kultivierung der hmEZ erfolgte wie bereits oben beschrieben auf gekammerten Objektträgern. Die Kulturen wurden für jeweils 48 Stunden mit 10 µg/ml oxLDL bzw. ADMA stimuliert.

Die monoklonalen Antikörper für CCL21/6Ckine (R&D Systems, USA) wurden mit Hilfe des „Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit“ (Invitrogen, USA) nach Angaben des Herstellers aufbereitet. Mit einer Konzentration von 1:20 wurden die Zellkulturen für 30 Minuten mit den gelabelten Antikörpern inkubiert. Um die Plasmamembran zu markieren wurde anschließend Vybrant DiD (Invitrogen, USA) verwendet.

Sowohl die unstimulierten Kontrollen, als auch die mit oxLDL bzw. ADMA behandelten Kulturen wurden mit einem Konfokalmikroskop (Zeiss LDM 510 Meta, Plan-Apochromat 63x/1,40 Ölobjektiv) untersucht. Die mit CCL21-gelabelten hmEZ konnten mit Hilfe eines LSM 510 Image Browser 4.2 (Zeiss, Deutschland) quantifiziert werden. Die Auszählung erfolgte als Anzahl eines Fluoreszenzsignals/mm². Die Ergebnisse wurden zur anschaulicheren Darstellung in Prozentränge umgerechnet, wobei der Mittelwert der jeweiligen unstimulierten Kontrollgruppe = 100% gesetzt wurde.

3.2.7 Inkubation von hmEZ mit einer Plaque- und Aortensuspension

Um zu bestimmen, inwiefern die Umgebung der Endothelzellen die Expression von Chemokinen beeinflusst, wurden zwei Versuchsansätze entwickelt:

Zunächst wurde eine Suspension aus Plaquematerial hergestellt, wobei das Gewebe eines Patienten mit einer hochgradigen Carotisstenose ohne höhergradige Verkalkungen ausgewählt wurde. Es wurden 0,9 g Plaquematerial in 8 ml Phosphate Buffered Saline (PBS) mittels Ultraschall (Bandelin Sonoplus, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurden 600 µl dieser Suspension in 2400 µl PBS verdünnt. Ebenso wurde mit dem atherosklerosefreien Aortenmaterial verfahren.

Je 3 ml Suspension wurden vorsichtig in eine 12,5 mm² Flasche mit hmEZ gegeben und für 48 Stunden inkubiert. Die mRNA der hmEZ wurde wie bereits beschrieben isoliert und eine rt-PCR konnte durchgeführt werden.

3.3 Statistische Analyse

Alle Ergebnisse sind im laufenden Text als Mittelwert mit \pm Standardabweichung (standard deviation of the mean) angegeben. Mittels Kolmogorov-Smirnov-Test wurde untersucht, ob die Daten normalverteilt waren. In diesem Fall wurde der ungepaarte T-Test verwendet, um zwei Gruppen vergleichen können. Daten, die nicht normalverteilt waren, wurden mittels Wilcoxon-Signed-Rank- oder Mann-Whitney-U- Test ausgewertet.

Für die graphische Darstellung der Graphen wurden teilweise Boxplots verwendet. Hier sind Median, unteres bzw. oberes Quartil sowie die jeweiligen Extremwerte dargestellt. Sind die Werte nicht symmetrisch verteilt entsteht eine Diskrepanz zwischen den im laufenden Text erwähnten Mittelwerten und den im Boxplot dargestelltem Median. Trotzdem habe ich mich – auch in Rücksprache mit Frau Dr. biol. hum. Dipl.-Math. Eva

Hoster (Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie, LMU München) – teilweise für die Darstellung mittels Boxplot entschieden, da hierdurch im Gegensatz zum Balkendiagramm nicht der Eindruck entstehen kann, dass Werte über den gesamten Bereich eines Balkens verteilt sind.

Bei $p < 0,05$ (graphisch mit einem „*“ gekennzeichnet) wurde ein signifikanter und bei $p < 0,01$ (graphisch mit „**“ gekennzeichnet) ein hochsignifikanter Unterschied angenommen.

Alle in vitro Experimente wurden mindestens vier Mal, jeweils mit neuen Zellkulturen und Lösungen durchgeführt. Für die statistische Berechnung der Daten wurde SPSS (Version 11, Leibniz Rechenzentrum München) verwendet.

4. ERGEBNISSE

4.1 In vivo

4.1.1 Allgemeine Patienten-Daten

Im Zeitraum von September 2006 bis Mai 2008 sind insgesamt 47 Patienten rekrutiert worden, die sich im Rahmen einer Thrombendarteriektomie aufgrund einer hochgradigen Stenose der Arteria carotis interna (ACI) in der chirurgischen Klinik Großhadern vorgestellt haben. Als Kontrolle der Serum-Daten konnten Blutproben von zehn altersentsprechenden Probanden verwendet werden, bei denen mittels Ultraschall-Diagnostik eine hämodynamisch relevante Stenose ausgeschlossen werden konnte und des Weiteren klinisch kein Anhalt auf eine relevante Atherosklerose bestand. Das Material von 14 mikroskopisch gesunden Aorten von Patienten, die sich einem operativen Klappenersatz unterzogen, wurde freundlicherweise von der chirurgischen Klinik Großhadern zur Verfügung gestellt und diente somit als Vergleichsmaterial der Carotis-Plaques.

Klinische Daten:

	Carotis-Gruppe (n = 47)	Kontrolle-PBL (n = 10)	Kontrolle-Plaque (n = 14)
Alter	70 ± 8	68 ± 4	54 ± 5
Männer % (n)	77 (36)	30 (3)	71 (10)
TIA / CI % (n)	32 (15)	0 (0)	14 (2)
Diabetiker % (n)	26 (12)	20 (2)	28 (4)
Hypertension % (n)	92 (43)	80 (8)	85 (12)
Hyperlipidämie % (n)	85 (40)	80 (8)	78 (11)
Nikotinabusus % (n)	38 (18)	10 (1)	35 (5)
ASS / Clopidogrel % (n)	92 (43)	10 (1)	43 (6)
β-Blocker % (n)	60 (28)	60 (6)	43 (6)
Statine % (n)	79 (37)	80 (8)	78 (11)

Tabelle 6: Übersicht klinische Daten

4.1.2 Klinische Parameter der Atherosklerose-Patienten

Die 47 rekrutierten Patienten waren im Durchschnitt 70 ± 8 Jahre alt mit einem Anteil von 77% Männern (Tabelle 6). Präoperativ erhielten alle Patienten eine Sonographie der ACI mit Bestimmung der Durchflußgeschwindigkeit und Abschätzung des Stenosegrades. Die Indikation zur TEA wurde bei zerebral symptomatischen Patienten bei einer Stenose der ACI von 70% und bei asymptomatischen Patienten bei einer Stenose von 85% gestellt.

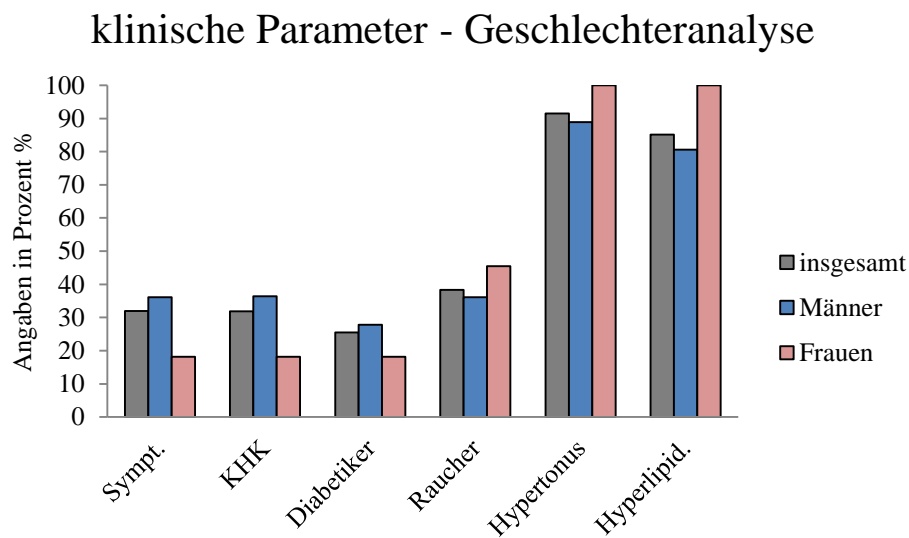


Abb3: klinische Parameter in Abhängigkeit vom Geschlecht

Abbildung 3 gibt einen Überblick der Risikofaktoren in Abhängigkeit vom Geschlecht. 32% der Studienpatienten hatten vor der Operation eine TIA (= transitorische ischämische Attacke) oder einen Apoplex (CI = cerebrale Ischämie). Im Folgenden werden diese Patienten „Symptomatisch“ genannt im Gegensatz zu den präoperativ zerebral unauffälligen „asymptomatischen“ Patienten (Abbildung 4). Anamnestisch war bei ebenfalls 32% der Patienten eine KHK (= koronare Herzkrankheit) bekannt, allerdings ergab sich bei der Analyse der Daten keine positive Korrelation zwischen präoperativer zerebraler Auffälligkeit und dem Bestehen einer KHK (Pearson’s Korrelationskoeffizient $r = -0,285$ bei $p = 0,06$).

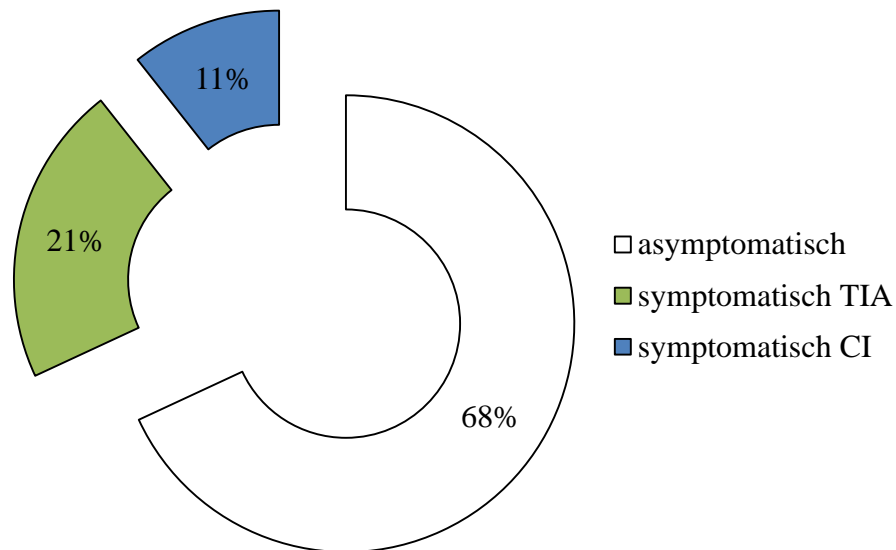


Abb.4: Übersicht zerebrale Auffälligkeit (symptomatisch TIA, symptomatisch CI, asymptomatisch, jeweils prä-operativ)

Die an Diabetes mellitus (DM) erkrankten Patienten litten alle an DM Typ II, wobei im DM-Kollektiv nicht zwischen Insulinabhängigen- und Nicht-Insulinabhängigen-Diabetes-mellitus unterschieden wurde. Für Deutschland liegt eine Gesamtprävalenz für DM von 6% vor, allerdings steigt die Prävalenz mit dem Alter an und liegt bei über 60-jährigen bei knapp 30%. Im vorliegenden Patientenkollektiv befanden sich 25,5% Diabetiker. Somit entspricht diese Verteilung ungefähr dem bundesweiten Durchschnitt (Bundesamt 2005).

Als „Nichtraucher“ wurden nur Patienten gewertet, die noch nie oder seit mindestens zehn Jahren nicht mehr geraucht hatten. In dieser Arbeit waren 38% der Patienten Raucher, allerdings ist der Anteil der Raucher unter den rekrutierten Patienten prozentual unter den Frauen (45,5%) höher als unter den Männern (36%). Dies wiederum entspricht nicht der Verteilung in Deutschland, bei der die Frauen in jeder Altersstufe weniger rauchen als die Männer (Bundesamt 2005).

Um das Gewicht der Patienten zu beurteilen wurde bei der Anamnese der Body Mass Index (= BMI) erhoben. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) stuft einen BMI > 25 kg/m² als übergewichtig und einen BMI > 30 kg/m² als adipös ein. Laut diesen Angaben erfolgte die Bezeichnung der rekrutierten Patienten in normalgewichtig, übergewichtig und adipös. Insgesamt waren 46% der Patienten als normalgewichtig (BMI < 25 kg/m²), 49% als übergewichtig und 5% als adipös einzuordnen.

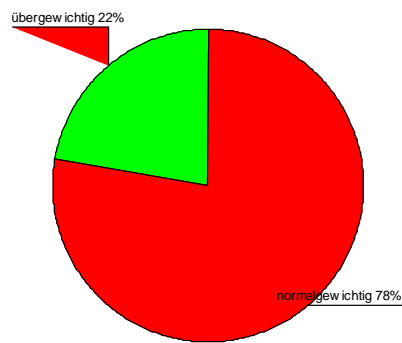


Abb.5a: BMI Gruppe: Frauen

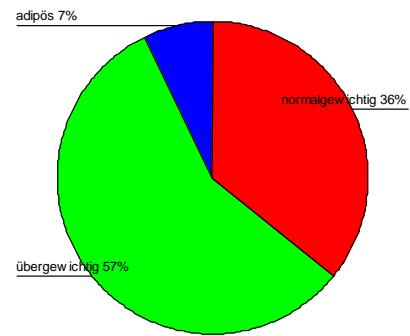


Abb.5b: BMI Gruppe: Männer

Wie aus den Tortendiagrammen zu erkennen ist, sind mehr als zwei Drittel (78%) der Frauen normalgewichtig und keine der Patientinnen adipös. Im Gegensatz dazu sind mehr als die Hälfte (57%) aller Männer übergewichtig und 7% fettleibig (Abbildung 5a und 5b). Bei der Anamnese der Patienten wurde auch die aktuelle Medikation erhoben. Mehr als 90% der Patienten nahmen seit mindestens zwei Jahren Thrombozytenaggregationshemmer, wie Acetylsalicylsäure (= ASS) oder Clopidogrel. Statine und β -Blocker waren bei mehr als der Hälfte fester Medikationsbestandteil. Allerdings nahmen nur die Hälfte der Patienten den CSE-Hemmer länger als zwei Jahre (Abbildung 6).

Medikation Carotis-Patienten

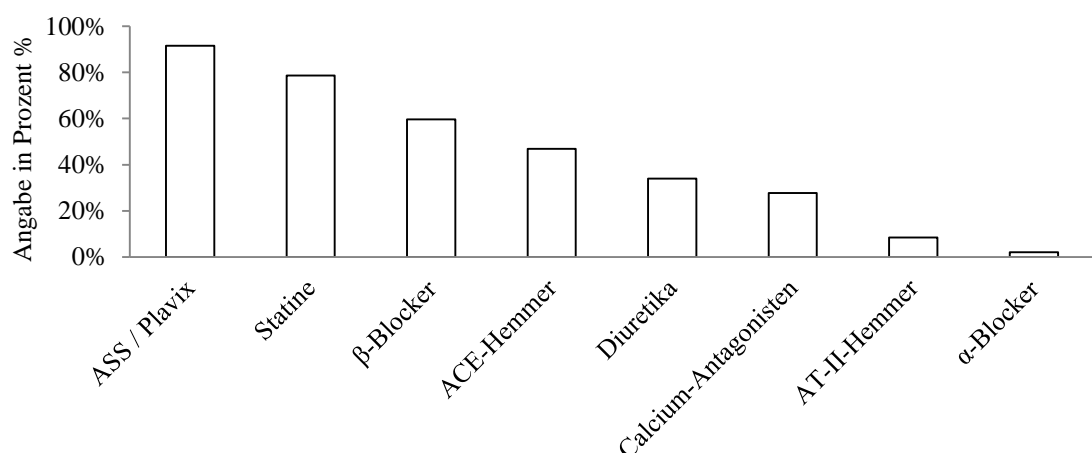


Abb.6: regelmäßige Medikation der Carotis-Patienten in %

4.1.3 Analyse der Laborwerte

Präoperativ wurde den Patienten Blut entnommen und bestimmte Laborparameter wie Cholesterin, HDL/LDL, TSH, Kreatinin, HbA1c bei den Diabetikern, Leukozyten und CRP bestimmt.

Bei einer Analyse der Laborwerte konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Kollektiv „Symptomatische“ (n = 15)/„Asymptomatische“ (n = 32) einerseits und dem Kollektiv „Diabetiker“ (n = 12)/„Nicht-Diabetiker“ (n = 35) festgestellt werden.

Unterschiede fanden sich aber im Geschlechtervergleich. Wie zu erwarten hatten Männer (Mittelwert 1,06 mg/dl \pm 0,25 mg/dl, p = 0,035) signifikant höhere Kreatinin-Werte als Frauen (0,91 mg/dl \pm 0,24 mg/dl). Dieses Ergebnis spiegelt die stärkere Muskelmasse der Männer wieder.

Zum anderen fällt bei Betrachtung des Laborparameters HDL-Cholesterin (High-Density-Lipoprotein-Cholesterin) auf, dass Frauen signifikant (Mittelwert 54,6mg/dl \pm 16,1mg/dl vs. 68,4mg/dl \pm 16,7mg/dl, p = 0,024) höhere Werte als Männer haben.

Die Diabetiker aus dem rekrutiertem Kollektiv mit einem HbA1c \leq 7,0% und somit als „gut eingestellt“ (n=5) zu werten sind, haben einen signifikant höheren (Mittelwert 64,6mg/dl \pm 10,9mg/dl vs. 42,0mg/dl \pm 8,8mg/dl, p<0,01) HDL-Wert, als „schlecht eingestellte“ Diabetiker (n=7, Abbildung 7).

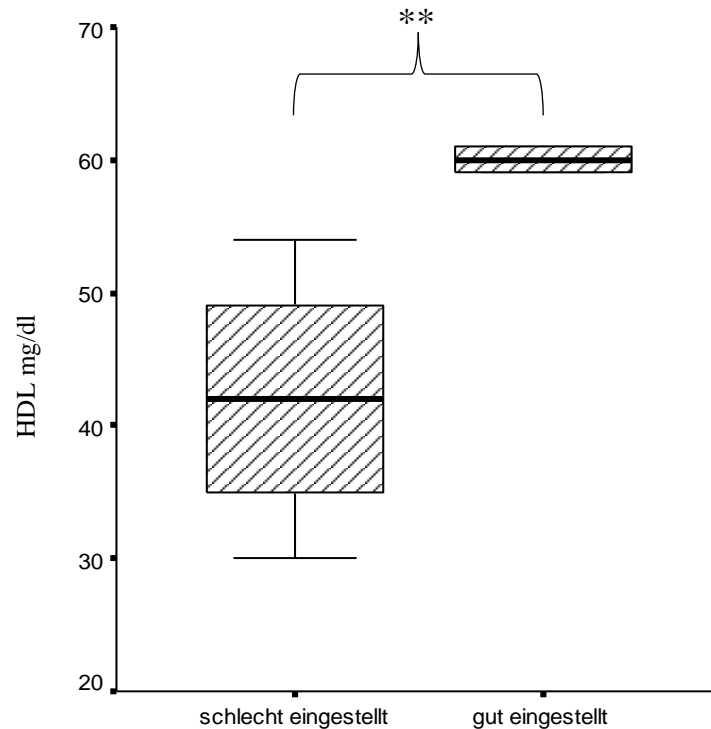


Abb.7: Einfluss der Güte der Diabetes-Einstellung (schlecht eingestellt n=7 vs. gut eingestellt n=5) auf HDL-Werte (Darstellung mittels Boxplot als Median, **= $p < 0,01$)

4.1.4 PCR von Plaque und PBL

Mittels rt-PCR konnte die mRNA aus Plaque und PBL bestimmt werden. Als Vergleich für die erhobenen Daten diente gesundes Aortenmaterial ($n = 14$) und das Blut von altersgematchten Probanden ($n = 10$). Die $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ermöglicht einen direkten Vergleich zwischen den rekrutierten Patienten und dem Kontroll-Material, wobei die Kontrolle jeweils als eins angegeben wird.

4.1.4.1 Analyse der mRNA von CCL19/21 und CCR7/CD83 im atherosklerotischen Plaque

Folgende Ergebnisse fanden sich zusammenfassend im atherosklerotischen Plaque:

- CD83, als Marker für reife DZ ist im Plaque erhöht
- CCR7, als Homing-Rezeptor und dessen Liganden sind weniger häufig im Plaque zu finden

Im Vergleich zu der Kontrollgruppe war bei den Patienten mit hämodynamisch relevanter Carotisstenose der Oberflächenmarker *CD83*, der bei reifen DZ vermehrt exprimiert wird (Yilmaz, Lochno et al. 2004; Erbel, Sato et al. 2007; Yilmaz, Lipfert et al. 2007), im Plaque ($1,95 \pm 1,53 \Delta\Delta\text{ct}$) signifikant hochreguliert ($p < 0,01$, Abbildung 8). Bei einer Subgruppenanalyse konnte gezeigt werden, dass sich bei Männern signifikant mehr mRNA-Kopien von *CD83* finden lassen, als bei Frauen ($2,23 \pm 1,59 \Delta\Delta\text{ct}$ vs. $1,02 \pm 0,85 \Delta\Delta\text{ct}$, $p < 0,05$).

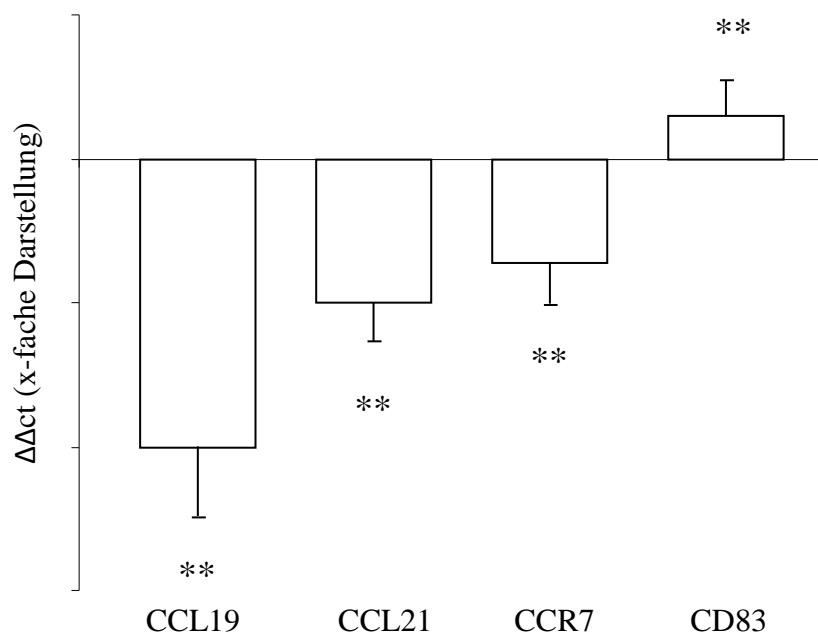


Abb.8: mRNA-Kopien im atherosklerotischen Plaque im Vergleich zum Kontroll-Kollektiv (dargestellt als Mittelwerte mittels Balkendiagramm der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Werte, Signifikanzen (** = $p < 0,01$) bezogen auf das Kontroll-Kollektiv

Der Chemokinrezeptor *CCR7*, der ebenfalls bei reifen DZ verstärkt exprimiert wird und wichtig für das Homing der DZ zu lymphatischem Gewebe ist, war im Plaque um 81% weniger häufig zu finden als im Kontrollkollektiv ($0,19 \Delta\Delta\text{ct}$, $p < 0,01$). Allerdings konnte kein geschlechterspezifischer Unterschied nachgewiesen werden.

Mehr als die Hälfte der für die Studie rekrutierten Patienten nahmen regelmäßig einen β -Blocker. Bei diesen Patienten ist *CCR7* im Plaque zwar nicht so häufig nachzuweisen wie im Kontroll-Kollektiv, allerdings signifikant häufiger ($0,22 \pm 0,17 \Delta\Delta\text{ct}$) als bei Patienten ohne Medikation mit einem β -Blocker ($0,14 \pm 0,18 \Delta\Delta\text{ct}$; $p < 0,05$).

Es konnte gezeigt werden, dass *CCL19* ($0,01 \Delta\Delta\text{ct}$, $p < 0,01$) als auch *CCL21* ($0,1 \Delta\Delta\text{ct}$, $p < 0,1$) im Plaque von Patienten mit hämodynamisch relevanter Carotis-Stenose um den Faktor 10^{-4} verringert vom Endothel synthetisiert werden. Im Plaque findet sich in der Risikogruppe der präoperativ cerebral symptomatischen Patienten weniger als die Hälfte ($0,05 \pm 0,02 \Delta\Delta\text{ct}$) der mRNA des Liganden *CCL21* als in der Gruppe der zerebral unauffälligen Patienten ($0,12 \pm 0,1 \Delta\Delta\text{ct}$; $p < 0,05$, Abbildung 9).

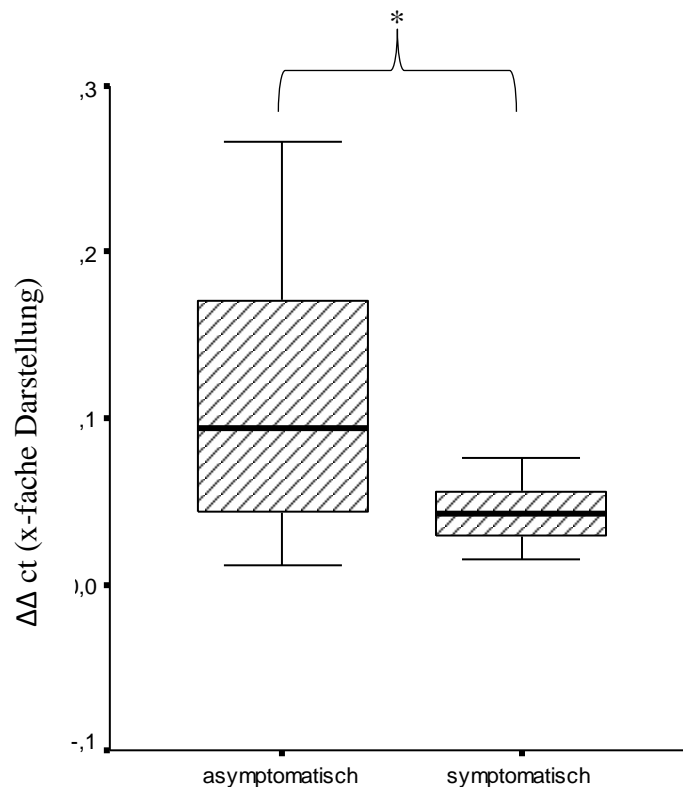


Abb.9: mRNA-Kopien im atherosklerotischen Plaque von *CCL21*, sympt. ($n=15$) vs. asympt. Patienten ($n=32$), dargestellt als Median mittels Boxplot der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Werte, $*= p < 0,05$

4.1.4.2 Analyse der mRNA von *CCL19/21* und *CCR7/CD83* von PBMZ

Kurz gefasst fand sich im peripheren Blut folgendes Chemokin-Profil:

- Patienten mit Atherosklerose exprimieren peripher vermehrt reife DZ (CD83)
- *CCR7* ist erniedrigt, wohingegen dessen Liganden erhöht sind

Ebenso wie im Plaque, so fand sich auch im Serum auf isolierten PBMZ, als Hinweis auf das Vorhandensein von reifen DZ, die mRNA von *CD83* circa vier Mal häufiger ($4,07 \pm 5,9 \Delta\Delta\text{ct}$, $p < 0,01$, Abb.10) im Gegensatz zum Serum, dass von gesunden Spendern stammte.

Gleichsinnige Ergebnisse in Bezug auf Serum bzw. Plaque fanden sich auch bei dem Homingrezeptor *CCR7*: die mRNA dieses Rezeptors war im Serum der Patienten mit hochgradiger Carotisstenose um 64% reduziert nachweisbar ($0,36 \pm 0,43 \Delta\Delta\text{ct}$, $p < 0,01$).

Dagegen zeigte sich, dass die mRNA der Liganden dieses Homingrezeptor – *CCL19* und *CCL21* – im Serum der rekrutierten Patienten vermehrt nachgewiesen werden konnte. Allerdings ließ sich ein signifikanter Unterschied nur für den Liganden *CCL21* ($7,49 \pm 19,14 \Delta\Delta\text{ct}$) dokumentieren, dessen mRNA im Durchschnitt mehr als siebenmal so häufig belegt werden konnte ($p < 0,01$, Abbildung 10).

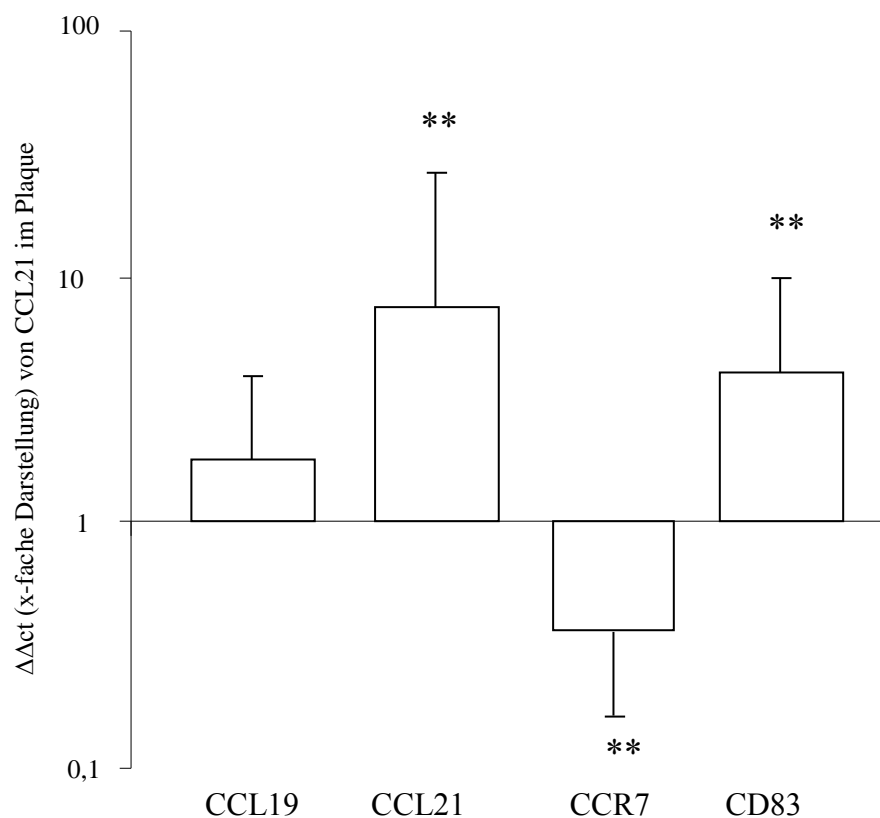


Abb.10: mRNA-Kopien von PBMZ der Carotis-Patienten im Vergleich zum Kontroll-Kollektiv (dargestellt als Mittelwerte mittels Balkendiagramm der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Werte, Signifikanzen (** = $p < 0,01$) bezogen auf das Kontroll-Kollektiv

Die beiden Liganden von CCR7 korrelieren untereinander mit einer Signifikanz von $p < 0,01$. Der positive Korrelationskoeffizient nach Pearson von $r = 0,6$ zeigt, dass je mehr mRNA des einen Liganden zu finden ist, desto mehr mRNA des Anderen lässt sich im Serum nachweisen.

4.1.5 Immunfluoreszenz: Analyse der CCL21-Expression im atherosklerotischen Plaque und im Aortengewebe

Um die Ergebnisse der PCR-Analyse auf Proteinebene zu bestätigen, führten wir eine Immunfluoreszenz mit histologischen Schnitten von ausgewählten Präparaten humaner Aorta ascendens und den gesammelten atherosklerotischen Gefäßabschnitten der ACI durch.

Die Auszählung erfolgte als Anzahl eines Fluoreszenzsignals/mm². Die Ergebnisse wurden zur anschaulicheren Darstellung in Prozentränge umgerechnet, wobei der Mittelwert der untersuchten histologischen Präparate der humanen Aorta ascendens = 100% gesetzt wurde.

In jeder der insgesamt sechs ausgewählten Aortenstücke ließ sich mittels eines erhöhten Fluoreszenzsignals des gebundenen Antikörpers eine höhere CCL21-Expression (als 100% gesetzt) nachweisen, als in dem atherosklerotischen Gewebe des Plaquematerials der Arteria carotis interna ($n=15$, Mittelwert 64%, $p<0,01$, repräsentative Bilder siehe Abbildung 11, Graphik Abbildung 12).

In einem zweiten Versuchsansatz färbten wir die EZ der Aorten-Schnitte, indem wir zusätzlich einen PECAM-Antikörper (α -PECAM-Cy3), einem Antikörper der gegen ein Adhäsionsmolekül auf EZ gerichtet ist, verwendeten. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von CCL21 hauptsächlich in der Gefäßwand der vasa vasorum befindet (Abbildung 13).

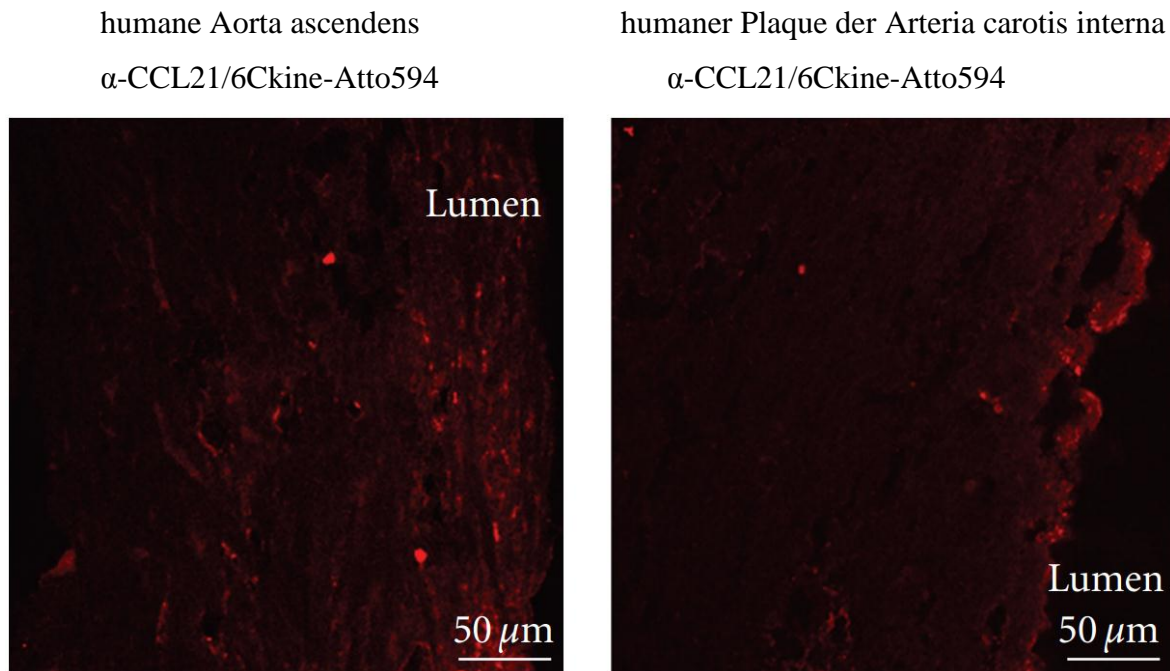


Abb.11: CCL21-Expression mittels Immunfluoreszenz, humaner Carotis-Plaque und humanes Aortengewebe

Diese repräsentativen Bilder zeigen die unterschiedliche Expression von CCL21 (rot, α -CCL21/6Ckine-Atto594) in humaner Aorta ascendens und dem Plaquematerial der Arteria carotis interna. Die CCL21-Expression ist im Gewebe der humanen Aorta ascendens verstärkt zu finden. Maßstab 50 μ m.

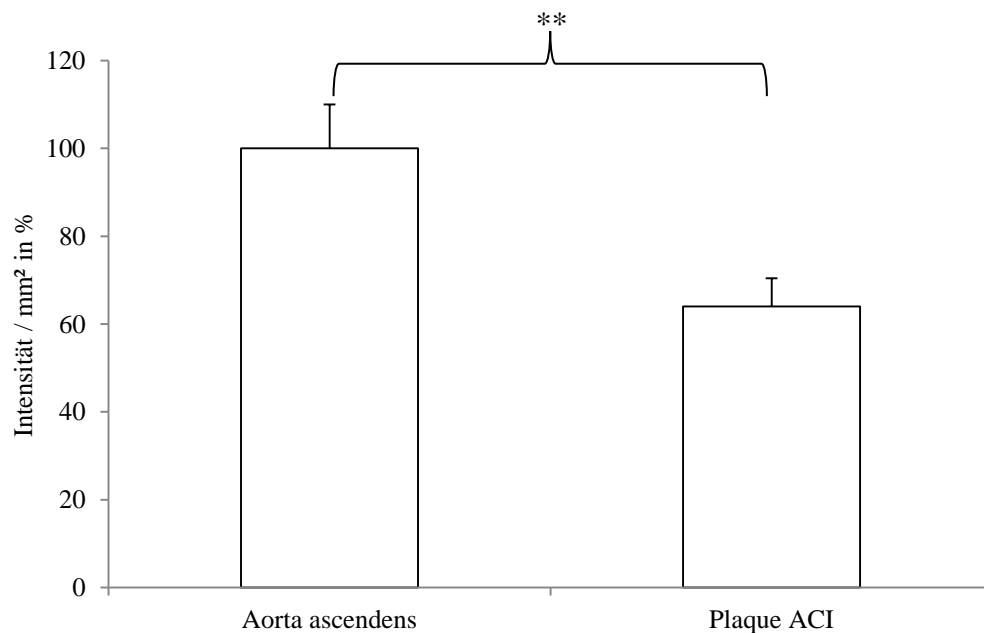


Abb.12: Intensität des Fluoreszenzsignals/mm² in %, humane Aorta ascendens (n=6) im Vergleich zum atherosklerotischen Plaque der Arteria carotis interna, n=15, ** = $p < 0,01$

humane Aorta ascendens

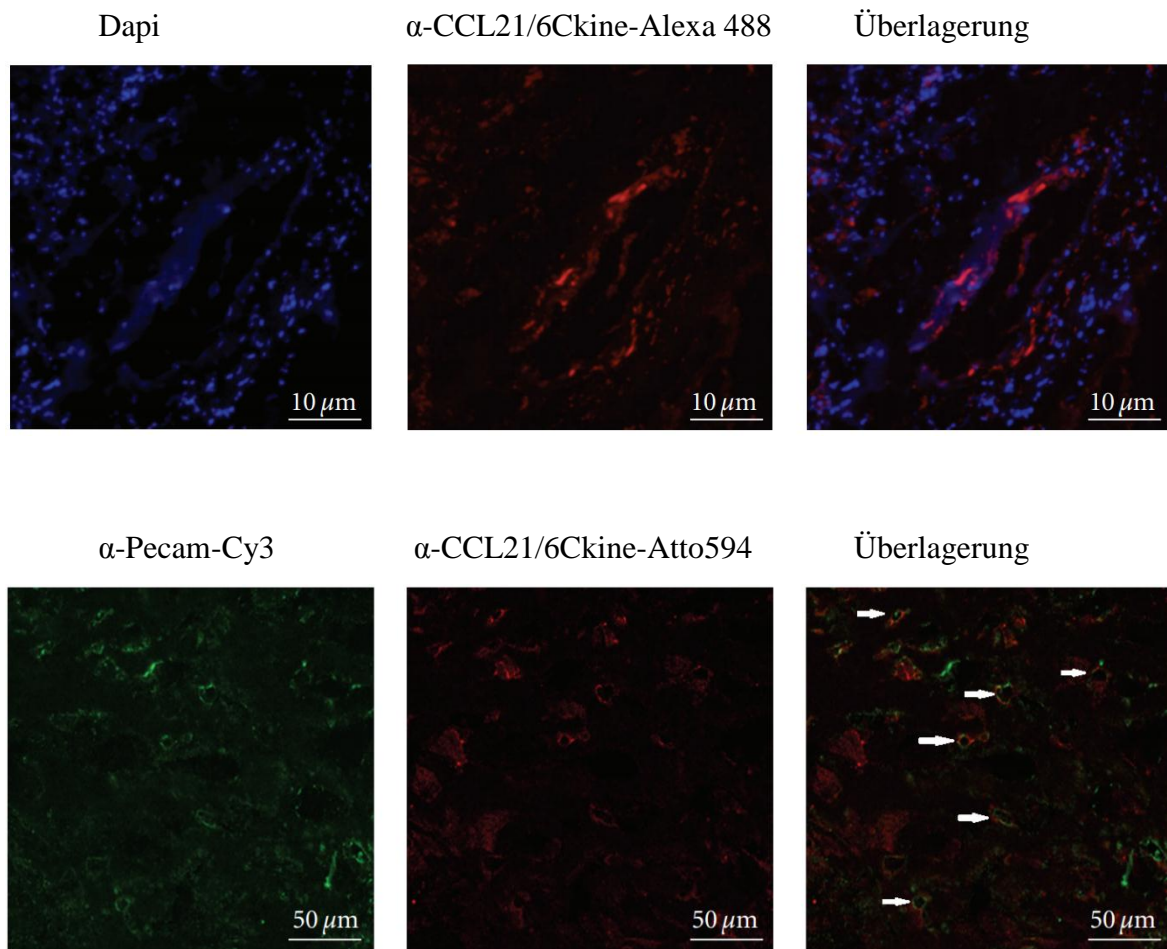


Abb.13: Analyse der CCL21-Expression, humanes Aortengewebe.

Obere Reihe: Die blaue Färbung zeigt die Zellkerne (DAPI), die rote Färbung zeigt CCL21-positive Strukturen (α-CCL21/6Ckine-Alexa488). Maßstab 10 μm.

Untere Reihe: Um die Gefäßwand der vasa vasorum als CCL21 exprimierende Struktur im humanen Aortengewebe zu identifizieren, verwendeten wir einen PECAM-Antikörper (grün, α-PECAM-Cy). Die rote Färbung zeigt CCL21-positive Strukturen (α-CCL21/6Ckine-Atto594). Die Überlagerung der beiden Bilder zeigt eine Co-Lokalisation von CCL21 und PECAM-Antikörpern in der Gefäßwand von humanem Aortengewebe. Maßstab 50 μm.

4.1.6 ELISA: oxLDL, ADMA und CCL21 im peripheren Blut

Ein ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ist ein verbreitetes Verfahren, um bestimmte Proteine mittels Antigen-Antikörper-Reaktion nachweisen zu können. In dieser Arbeit wurden die oxLDL-, ADMA- und CCL21-Serumspiegel der entnommenen Blutproben durch dieses klassische „Sandwich“-Immunoassay ermittelt.

Im Serum des Kontroll-Kollektivs fand sich im Durchschnitt ein oxLDL-Spiegel von $99,4 \pm 20,3$ ng/ml ($n=27$). Im Gegensatz dazu fanden sich bei den Patienten aus der Carotis-Gruppe signifikant höhere oxLDL-Werte ($207,3 \pm 240,2$ ng/ml, $n=10$, $p < 0,05$).

Für ADMA fand sich im Blut der Patienten mit Carotis-Stenose eine Konzentration von $1,24 \pm 0,97$ ng/ml und war somit leicht erhöht im Vergleich zum Kontroll-Kollektiv ($0,97 \pm 0,3$ ng/ml, $p < 0,05$).

Im Serum des Kontroll-Kollektivs fanden sich signifikant geringere CCL21-Spiegel als bei den Carotis-Patienten ($1335,1 \pm 771,5$ pg/ml vs. $961,2 \pm 210,9$ pg/ml, $p < 0,05$).

Sowohl für ADMA, als auch für CCL21 konnte keine Korrelation zwischen dem gemessenen Spiegel und der Medikation der Patienten festgestellt werden. Weitere Analysen in Bezug auf Geschlecht, Anamnese und Laborwerte ergaben ebenso keine signifikanten Unterschiede oder Korrelationen.

Eine Übersicht über die gemessenen Spiegel im Serum der Carotis-Patienten und dem Kontroll-Kollektiv gibt Tabelle 7.

	<i>Carotis-Patienten</i>	<i>Kontroll-Kollektiv</i>
oxLDL	$207,3 \pm 240,2$ ng/ml	$99,4 \pm 20,3$ ng/ml
ADMA	$1,24 \pm 0,97$ ng/ml	$0,97 \pm 0,3$ ng/ml
CCL21	$1335,1 \pm 771,5$ pg/ml	$961,2 \pm 210,9$ pg/ml

Tabelle 7: Konzentration von oxLDL, ADMA und CCL21 im peripheren Blut

4.2 in vitro Experimente

4.2.1 Stimulation von Zellkulturen mit oxLDL und ADMA

4.2.1.1 Stimulation von humanen mikrovaskulären Endothelzellen

Humane mikrovaskuläre Endothelzellen (hmEZ) wurden mit 10 µg/ml oxLDL und 1 µg/ml ADMA für 48 Stunden stimuliert. Anschließend wurde mittels rt-PCR die Genexpression und mittels Immunfluoreszenz die Proteinexpression von CCL19 und CCL21 untersucht.

oxLDL:

Unter dem Einfluss von 10µg/ml *oxLDL* war bei hmEZ eine signifikant (-50%; 0,05 $\Delta\Delta\text{ct}$, $p < 0,05$, Abbildung 13) verringerte Genexpression von CCL21 nachweisbar.

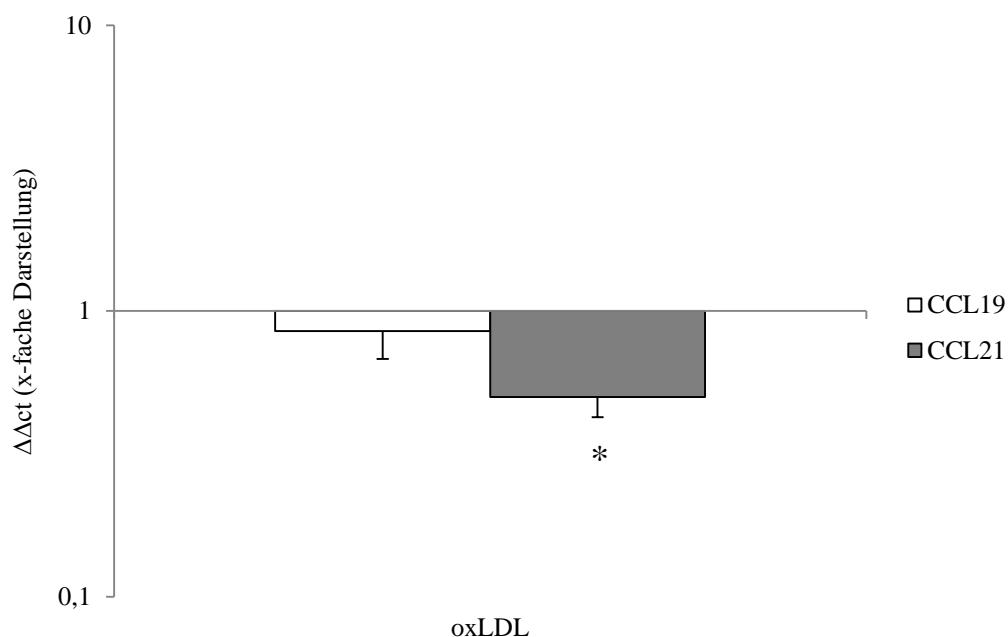


Abb.14: mRNA-Expression von CCL19 und CCL21 nach Stimulation von hmEZ mit oxLDL, dargestellt als Mittelwerte mittels Balkendiagramm der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Werte, Signifikanzen (* = $p < 0,05$) bezogen auf die unstimulierten Kontrollen

Auf Proteinebene fand sich für CCL21 mittels Immunfluoreszenz eine Herunterregulation des Liganden um 23,66% ($n = 8$, $34,00 \pm 8,53$ Intensität/mm² bzw. 76,34% vs. $44,54 \pm$

6,23 Intensität/mm² bzw. 100%, $p < 0,05$, Abbildung 14 und Abbildung 15). Für CCL19 ergab sich zwar die gleiche Tendenz, aber keine Signifikanz.

α -CCL21/6Ckine-Alexa 488

Vybrant DiD

Überlagerung

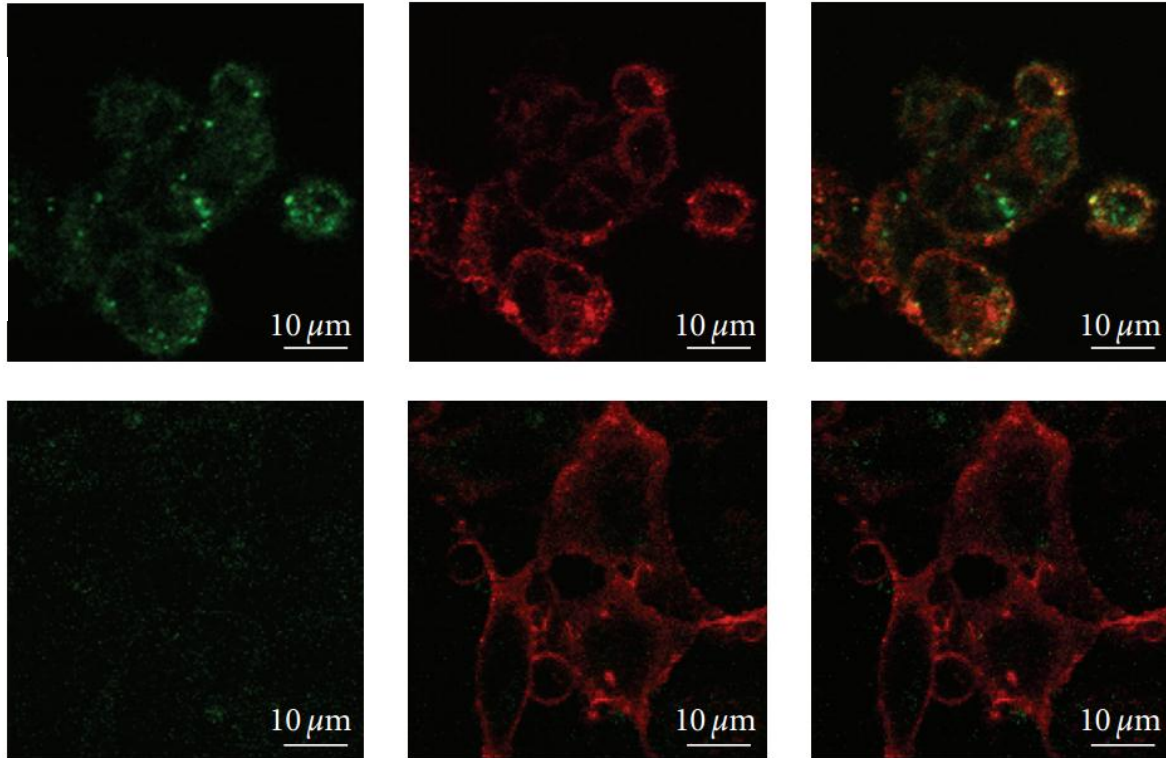


Abb.15: Expression von CCL21 auf hMEZ mittels Immunfluoreszenz

Korrespondierend: Repräsentative Protein Expression von CCL21 auf EZ mittels Immunfluoreszenz. Die CCL21-positiven Strukturen sind grün gefärbt (α -CCL21/6Ckine-Alexa488), die Plasmamembran mittels „Vybrant® DiD cell-labeling solution“ ist rot gefärbt. Obere Reihe: Kontrolle, untere Reihe: nach Stimulation mit 10 µg/ml, n=8, Maßstab 10 µm.

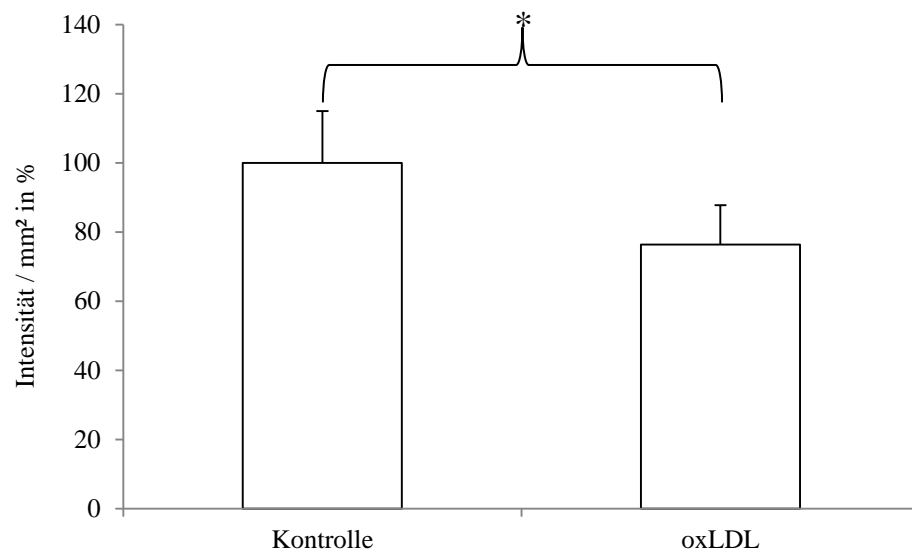


Abb.16: Intensität des Immunfluoreszenz-Signals in % der CCL21-Expression nach Stimulation von hmEZ mit oxLDL im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, $n=9$, $* = p < 0,05$

ADMA:

Die Zugabe von 1 µg/ml ADMA hatte weder einen Einfluss auf die gemessene mRNA-Menge von CCL19 noch von CCL21 (Abbildung 17). Ebenso konnte durch die Zugabe von 1 µg/ml ADMA keine Veränderung der CCL21-Expression mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.

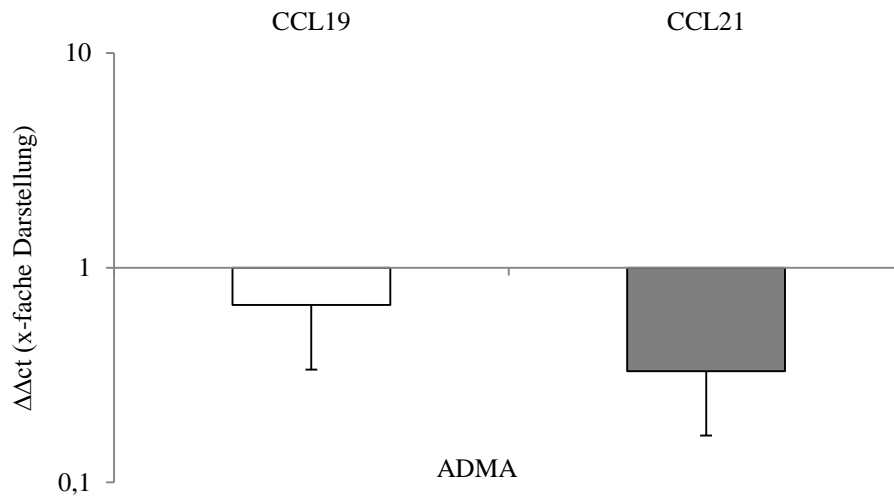


Abb.17: mRNA-Expression von CCL19 und CCL21 nach Stimulation von hmEZ mit ADMA, dargestellt als Mittelwerte mittels Balkendiagramm der $\Delta\Delta ct$ -Werte, keine Signifikanz mittels Wilcoxon-signed-Ranks Test nachweisbar.

4.2.1.2 Stimulation von MGDZ

Die bereits o.g. Substanzen (oxLDL und ADMA) gaben wir in gleicher Konzentration auf eine Kultur mit humanen Monozyten generierten DZ (MGDZ) und verwendeten nach 48 Stunden einen Teil der Kultur für die rt-PCR, um die Genexpression von CCR7 zu bestimmen. Den anderen Teil verwendeten wir für die Durchflußzytometrie und ermittelten hier die Oberflächenexpression des Homingrezeptors CCR7 und des Oberflächenmarkers CD83.

Der für das Homing wichtige Rezeptor CCR7 war unter oxLDL-Einfluss mittels rt-PCR signifikant weniger häufiger nachweisbar (-30%, n=8, $0,7 \pm 0,2 \Delta\Delta\text{ct}$, $p < 0,05$, Graphik nicht dargestellt).

Auch mittels Durchflußzytometrie fand sich auf DZ signifikant weniger häufig der Rezeptor CCR7 (um 46% verringert, wenn Kontrolle als 100% angenommen wird; $25,7 \pm 1,06\%$ vs. Kontrolle $47,6 \pm 19,3\%$ positive Zellen, n=8, $p < 0,05$, Abbildung 18).

Im Gegensatz dazu ermittelten wir mittels der Durchflußzytometrie für CD83 eine signifikant hochregulierte Proteinexpression unter oxLDL-Einfluss (+60%, $46,9 \pm 11,3\%$ vs. Kontrolle $29,3 \pm 17,7\%$ positive Zellen, $p < 0,05$, Abbildung 18).

Unter dem Einfluss der weiteren Streßsubstanz ADMA kam es zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zum Kontrollversuch.

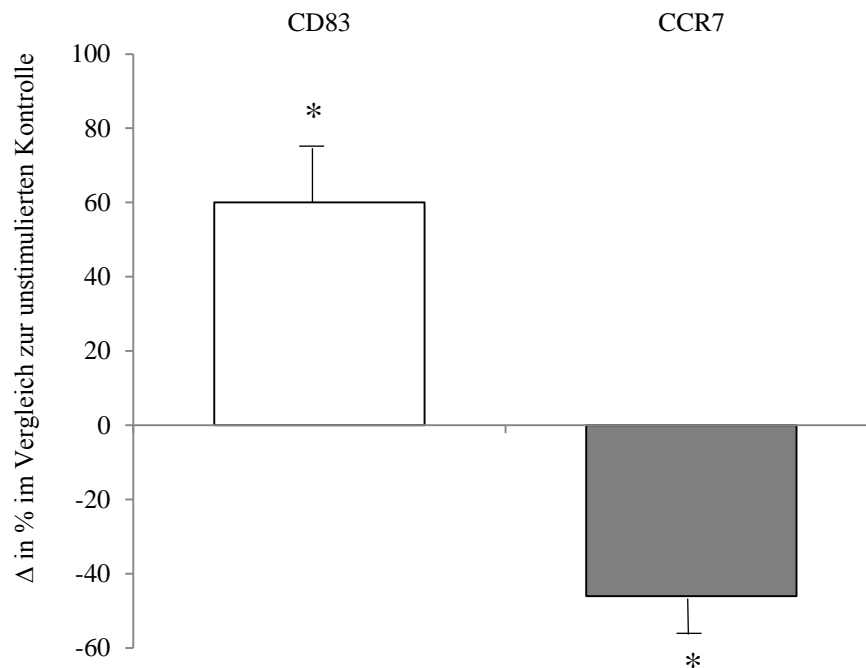


Abb.18: Proteinexpression von CCR7 und CD83 nach Stimulation mit oxLDL

Nach Stimulation der DZ mit 10 µg/ml oxLDL konnten CD83-positive Zellen häufiger nachgewiesen werden, der Rezeptor CCR7 dagegen weniger häufig. Jeweils in Bezug auf die unstimulierten Kontrollen. Die positiven Zellen wurden mittels Durchflußzytometrie gemessen. Die Angabe bezieht sich auf den Unterschied der positiven Zellen in %, wobei die unstimulierten Kontrollen als 100% angenommen werden, $n=8$, * = $p<0,05$.

4.2.2 Inkubation mit Plaque- und Aortensuspension

Des Weiteren wurden hmEZ mit Plaquematerial bzw. mit nicht atherosklerotisch verändertem Aortengewebe für 48 Stunden stimuliert, um festzustellen welche Umgebung für die Produktion von Chemokinen notwendig ist. Die Genexpression der Chemokine CCL19 und CCL21 wurden im Anschluss mittels rt-PCR bestimmt.

Mittels der $\Delta\Delta$ -ct-Methode, lässt sich errechnen, dass in der relativ atherosklerosefreien Aortensuspension 465-mal so viele mRNA-Kopien von CCL21 gefunden wurden als in der unstimulierten Kontrolle. Unter dem Einfluss des Plaquematerials kam es nur zu einem fünffachen Anstieg der CCL21-mRNA. Daraus lässt sich schließen, dass es bei einer relativ atherosklerosefreien Umgebung, zu einer ca. 85-fachen vermehrten Genexpression von CCL21 kommt (Abbildung 19). Sowohl im Vergleich zur instimulierten Kontrolle, als auch zwischen Plaque- und Aortensuspension findet sich ein signifikanter Unterschied bei der Genexpression von CCL21.

Die Inkubation von hmEZ mit Plaque- und Aortensuspension zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression von CCL19.

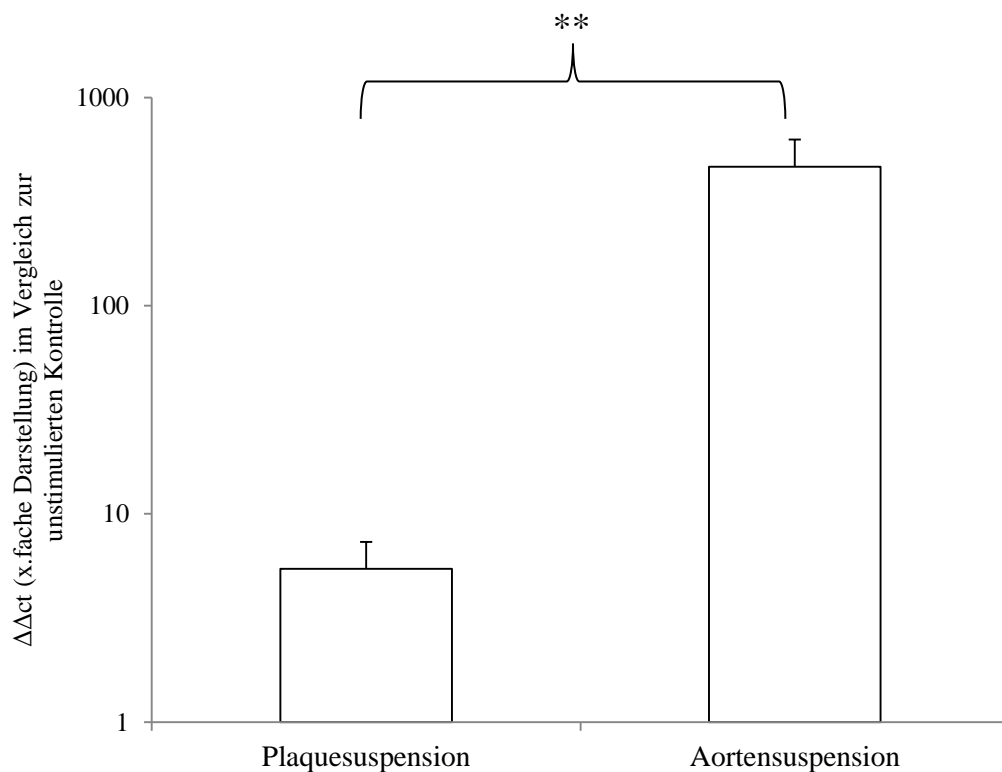


Abb.19: Genexpression von CCL21 auf hmEZ nach Inkubation mit Plaque- bzw. Aortensuspension, dargestellt als Mittelwerte mittels Balkendiagramm der $\Delta\Delta$ ct-Werte, Signifikanzen (** = $p < 0,01$) bezogen auf das unstimulierte Kontroll-Kollektiv als auch als signifikanter Unterschied zwischen Plaque- und Aortensuspension

5. DISKUSSION

Die traditionellen Risikofaktoren wie Rauchen, Hypertonus, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Adipositas sind zur Einschätzung des atherogenen Risikos wichtig und aus Populationsstudien nicht wegzudenken, trotzdem ist es für ein besseres Verständnis der Atherogenese wichtig, das morphologische Korrelat dazu – den atherosklerotischen Plaque und dessen Zusammensetzung – zu begreifen.

5.1 Die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst

In dieser Arbeit konnte nicht nachgewiesen werden, dass die klassischen Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie und Adipositas einen Einfluss auf CCR7 und CCL21/19 haben. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der Chemokin-Rezeptor CCR7 als auch dessen Liganden CCL21/CCL19 im atherosklerotischen Plaque herunter reguliert sind und es gleichzeitig zu einer Akkumulation maturer DZ (Hochregulation von CD83) im atherosklerotischen Plaque kommt.

Außerdem fanden sich im Serum der Patienten mit Carotis-Stenose eine Hochregulation von CCL21 und gleichzeitig eine verringerte Expression des Homingrezeptor CCR7.

Des Weiteren ist oxLDL im Serum von Patienten mit Carotis-Stenose vermehrt nachweisbar und führt zu einer verminderten Expression von CCL21 auf Endothelzellen.

5.2 CD83 als Marker für reife DZ

Eine Expression von CD83 ist bislang nur auf ausgereiften DZ nachzuweisen (Zhou and Tedder 1996) und somit sehr spezifisch.

Bei Patienten mit einer Carotis-Stenose war die Anzahl maturer DZ sowohl im Serum, als auch im atherosklerotischen Plaque vermehrt nachzuweisen. Auch Erbel et al. (Erbel, Sato et al. 2007) und Yilmaz et al. (Yilmaz, Lipfert et al. 2007) konnten im Plaque der A. carotis eine vermehrte Anzahl DZ nachweisen. In jeweils beiden Arbeiten wurden die meisten maturen DZ bei Patienten entdeckt, bei denen präoperativ eine cerebrale Ischämie anamnestiziert werden konnte. Wie bereits erwähnt, finden sich in Gefäßabschnitten, die einer vermehrten Scherspannung und somit einem hohen dynamischen Stress ausgesetzt sind, vermehrt reife DZ. Yilmaz, dessen Arbeitsgruppe die Plaques mittels IHC untersuchte, unterteilte das Untersuchungsmaterial in zwei verschiedene Regionen, abhängig von der Flussrichtung. Im „upstream“-Bereich der Plaques – ein Bereich der besonders hohen Scherspannungen ausgesetzt ist - konnten deutlich mehr mature DZ detektiert werden.

In der hier vorliegenden Studie konnte bei der geschlechtsspezifischen Analyse bei Männern im Plaque mehr als doppelt so viel mRNA von CD83 gemessen werden als bei Frauen. Klinisch waren mehr als zwei Drittel der Männer vor der Operation zerebral auffällig, wohingegen nur 18,2% der Frauen präoperativ symptomatisch waren bei insgesamt vergleichbarem Risikoprofil. Die Framingham Heart Studie prognostiziert Männern bei gleichem Risikoprofil ein höheres kardiovaskuläres Risiko (Govindaraju, Cupples et al. 2008), welches durch den mangelnden Östrogen-Schutz und einer insgesamt proatherogenen Lebensweise zu erklären ist.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit einer signifikanten Atherosklerose höhere oxLDL-Werte im peripheren Blut messbar sind. Bereits in vorangegangenen Studien konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass oxLDL eine DZ-Maturierung bewirkt, die teilweise über eine Aktivierung der NF- κ B-Signalübertragung erfolgt (Nickel, Schmauss et al. 2009). DZ phagozytieren im subendothelialen Raum Antigene, wie z.B. oxLDL. Während der Maturierung kommt es zu einer Hochregulation von CD83. Die in dieser Arbeit gemessenen erhöhten Werte für CD83 bei Patienten mit Atherosklerose, als Ausdruck einer verstärkten Maturierung, können somit auch die

erhöhten oxLDL-Werte widerspiegeln. Reife DZ sind wiederum in der Lage T-Zellen zu aktivieren, hierbei spielt CCR7 eine wichtige Rolle.

5.3 CCR7 – der Homingrezeptor

Wie bereits erwähnt sind DZ die potentesten Antigen präsentierenden Zellen (APZ) der Immunabwehr und sind als einzige Zellen in der Lage T-Zellen zu primen und zu aktivieren (Banchereau and Steinman 1998; Banchereau, Briere et al. 2000). Hierbei spielt der CC-Chemokin-Rezeptor 7 (CCR7) eine wichtige Rolle, da dieser Rezeptor als Antwort auf verschiedene Stimuli/Antigene bei der Maturierung hochreguliert wird (Sallusto, Schaerli et al. 1998; Sozzani, Allavena et al. 1998) und reifen DZ eine Emigration zu Lymphknotenstationen ermöglicht (Forster, Schubel et al. 1999; Forster, Davalos-Misslitz et al. 2008).

Zum einen konnten wir bereits zeigen, dass es bei Patienten mit signifikanter Atherosklerose zu einer verstärkten Aktivierung bzw. Maturierung der DZ kommt. Somit hätten wir zunächst eine verstärkte Expression des Homing-Rezeptors erwartet. Es zeigte sich allerdings, dass im Vergleich zum Kontroll-Kollektiv die mRNA des Homing-Rezeptors CCR7 im Serum als auch im Plaque weniger häufig nachgewiesen werden konnte. Eine Erklärung hierfür könnte der Funktionsverlust der DZ nach Aufnahme von oxLDL sein. Es kommt zwar zunächst zu einer Maturierung, dann aber zum Funktionsverlust. Die DZ exprimiert CCR7 nur noch ungenügend auf ihrer Oberfläche, kann somit nicht mehr aus dem Plaque auswandern und akkumuliert im subendothelialen Raum. Gestützt wird diese These, dass bereits gezeigt werden konnte, dass nach einer verstärkten oxLDL-vermittelten Endozytose-Fähigkeit es zu einer Herunterregulation der Endozytose-Rezeptoren und der Aquaporin-Kanäle (wichtig für die Makropinozytose) kommt (de Baey and Lanzavecchia 2000; Perrin-Cocon, Coutant et al. 2001). Wir konnten zeigen, dass der Homing-Rezeptor CCR7 im Plaque nur noch vermindert exprimiert wird. Der Verlust der Endozytose-Fähigkeit und die ungenügende Expressierung von CCR7 kann der Grund für die Akkumulation von Zelldetritus und Lipidbelastung im atherosklerotischen Plaque sein. Die Unfähigkeit zum Homing der maturierten DZ führt zur Akkumulation.

Die Reaktion auf eine akute Inflammation erfolgt schnell und die Homöostase ist bereits nach einigen Tagen bis wenigen Wochen wieder erreicht (DiPietro, Poverini et al. 1995). Dabei konnte in mehreren Studien beobachtet werden, dass das Ende der Inflammation gekennzeichnet ist durch ein Abwandern von *monocyte-derived cells* zu Lymphknoten und dort akkumulieren (Bellingan, Caldwell et al. 1996). Bei den hier akkumulierenden Zellen,

handelt es sich zum größten Teil um DZ (Randolph, Angeli et al. 2005). Eine Regression der Inflammation steht also in direktem Zusammenhang mit der Emigration von DZ. Bei einer chronisch inflammatorischen Erkrankung wie der Atherosklerose ist das Homing DZ während der Progression gestört (Llodra, Angeli et al. 2004; Randolph 2008). Dieses lässt sich aber nicht nur durch die ungewöhnliche Anatomie der Intima erklären, die teilweise nicht in Verbindung zu afferenten Lymphgefäßen steht und somit eine Barriere für die Migration sein kann (Dal Canto, Swanson et al. 2001).

Trogan et al. konnte in einem Tier-Modell mit ApoE⁻Mäusen zeigen, dass es bei Normolipidämie zu einem Anstieg des mRNA- und Proteinlevels im Serum von CCR7 und gleichzeitig zu einer Regression der Atherosklerose kommt. Bei Hyperlipidämie konnten dagegen nur sehr niedrige CCR7-Werte gemessen werden. Wurden Gefäßabschnitte der ApoE⁻-Mäuse in die Wildtyp-Mäuse transplantiert, kam es zu einem Anstieg von CCR7 im Plaque und zu einer Regression der Atherosklerose insgesamt (Trogan, Feig et al. 2006).

Im Durchschnitt hatten die rekrutierten Patienten dieser Studie ein Gesamt-Cholesterin von 186,37 mg/dl und liegen somit im – von der AHA (American Heart Association) geforderten – Normbereich. Allerdings nehmen fast 80% der Patienten täglich Statine, weshalb davon auszugehen ist, dass vor Beginn der medikamentösen Therapie längerfristig eine Hypercholesterinämie bestand. Außerdem erfolgte die Statin-Therapie bei mehr als der Hälfte der Patienten erst seit weniger als zwei Jahren. Ein normwertiger Cholesterinspiegel besteht bei den Meisten somit erst seit kurzem. Laut einer Studie von Damas et al. (Damas, Smith et al. 2007) kommt es nach einer hochdosierten Statin-Therapie (80mg Atorvastatin/Tag) nach sechs Monaten zu einem signifikanten Anstieg des mRNA-Levels von CCR7. Ein ähnlicher Effekt bei einer niedrigdosierten Therapie (20mg Simvastatin/Tag) blieb aus.

Der Anstieg von CCR7 unter Statin-Therapie war gekennzeichnet durch ein Absinken der Plasma-Spiegel der mRNA der korrespondierenden Liganden CCL19 und CCL21. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die zirkulierende mRNA der Liganden auf PBMZ und konnten zeigen, dass CCL21 im gesunden, längerfristig normolipämischen Kontrollkollektiv weniger häufig nachzuweisen war, als bei Patienten mit hochgradiger Atherosklerose der Carotiden. Diese Ergebnisse stimmen auch mit weiteren Studien überein, was nicht zuletzt an dem ähnlich gewählten Kontroll-Kollektiv liegen könnte (PBMZ von 10 altersentsprechenden Männern, bei denen eine signifikante Atherosklerose ausgeschlossen wurde).

Die beschriebene Datenlage und die Tatsache, dass die Patienten in dieser Studie zum größten Teil (84% der Statin-therapierten Patienten) 20 bzw. 40 mg Simvastatin/Tag erst über einen relativ kurzen Zeitraum genommen haben und im Serum der mRNA-Spiegel von CCR7 nur 36% des gesunden Kontroll-Kollektivs entspricht, lässt darauf schließen, dass die Medikation zwar erfolgreich in Hinsicht auf einen normwertig eingestellten Cholesterinspiegel war. Doch ist der Erfolg einer Statin-Therapie auch von der Dauer der Medikation abhängig. Die Dauer bei der eine niedrigdosierte Statin-Therapie zu einem Anstieg von CCR7 und einem Sinken der mRNA von dessen Liganden auf PBMZ führt, bleibt zu untersuchen.

5.4 CCR7 im Zusammenspiel mit seinen Liganden CCL21/CCL19

J. Damas veröffentlichte eine Studie mit ApoE⁻Mäusen (Damas, Smith et al. 2007). Mittels Immunhistochemie untersuchte er die murinen atherosklerotischen Plaques und stellte fest, dass die Immunfärbung von CCR7 und dessen Liganden (CCL19 und CCL21) positiv mit der Plaquegröße korreliert. Außerdem färbte er immunhistochemisch vier humane Carotis-Plaques, verglich diese mit vier humanen, nicht-atherosklerotischen Nierenarterien und zeigte, dass der Homing-Rezeptor und seine Liganden in den Carotis-Plaques stärker angefärbt werden konnte. Diese Ergebnisse sind nicht vereinbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Bei den 47 untersuchten Carotis-Plaques konnte nur knapp 20% der mRNA-Menge von CCR7 gemessen werden. Gleichzeitig war die mRNA der Liganden signifikant weniger häufig im Plaque zu finden. Hervorzuheben ist hierbei das valide Kontrollkollektiv, bestehend aus 14 nicht-atherosklerotischen, thorakalen Aortenstücken. Aorta und Arteria carotis interna sind herznahe Gefäße und ähneln sich in ihrem Wandaufbau. Ob ein Vergleich mit einem Widerstandsgefäß, wie der Arteria renalis möglich ist, ist fraglich. Eine Studie der Universität Heidelberg (Erbel, Sato et al. 2007) kam zu dem Ergebnis, dass CCL19/CCL21 vermehrt in Plaqueregionen vorzufinden ist, verglich ihre Ergebnisse aber mit sieben Koronararterien aus Sektionsgut. Auch hier ist die Validität, in diesem Fall aufgrund der Autolyse der Kontrollen, anzuzweifeln.

Insbesondere ist hier wieder auf das Tier-Model von Trogan (Trojan, Feig et al. 2006) zu verweisen, der zeigen konnte, dass zum einen normolipämische Mäuse höhere CCR7-Spiegel aufwiesen, zum anderen stellte er dar, dass ein Anstieg von CCR7 im Plaque zu

einer Regression der Atherosklerose führt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. G. Randolph fasst in ihrer Übersichtsarbeit zusammen, dass CCR7 benötigt wird, um zum afferenten Lymphknoten zu wandern. Aufgrund der mangelhaften Expression im Plaque kommt es zum sogenannten „Trapping“ der DZ im atherosklerotischen Plaque (Randolph 2008). Die DZ sind nicht mehr in der Lage zum Lymphknoten zu wandern. Die im Serum gemessenen erhöhten CCL19/21-Werte können eine vermehrte Expression der Endothelzellen im lymphatischen System widerspiegeln, die dadurch chemotaktisch DZ anlocken wollen, um ein T-Zell-Priming zu induzieren.

5.5 Der Einfluss von oxLDL

DZ exprimieren den Homingrezeptor CCR7, der es ihnen ermöglicht aus dem inflammatorischen Gewebe zu emigrieren. Unter oxLDL-Einfluss wird CCR7 von DZ um 46% weniger exprimiert als in der unstimulierten Kontrolle. Dieses Ergebnis stützt die *in vivo* gewonnen Daten und zeigt, dass eine Hochregulation von CCR7 unter pathologischen Bedingungen nicht bzw. nur noch eingeschränkt möglich ist.

Der Ligand CCL21 und in geringerem Umfang auch CCL19 (Forster, Davalos-Misslitz et al. 2008) werden hauptsächlich von EZ exprimiert, werden aber bei Patienten mit hochgradiger Carotisstenose im Plaque vermindert exprimiert. Da – wie bereits geschildert – bei den Patienten in der Vorgeschichte eine Dysregulation des Lipid-Haushalts anzunehmen ist, untersuchten wir *in vitro* den Einfluss von 10 µg/ml oxLDL auf EZ. Hierbei zeigte sich eine signifikant verringerte Gen- und Proteinexpression von CCL21. Der Ligand CCL19 war hingegen nicht signifikant weniger exprimiert im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. In einem zweiten Versuchsansatz stimulierten wir EZ zu einem mit einer Suspension aus atherosklerosefreien Aortenmaterial, zum anderen mit einer Plaquesuspension. Das Plaquematerial besteht zum größten Teil aus Zelldetritus und mit oxLDL beladenen Makrophagen (Simionescu, Vasile et al. 1986; Sary, Chandler et al. 1994). Diese Bestandteile hemmen signifikant die Produktion des Liganden CCL21. Allerdings kann durch diesen Versuch noch nicht geklärt werden, welcher explizite Bestandteil für die Down-Regulation des Liganden verantwortlich ist. Auffällig ist, dass es in beiden *in vitro* Versuchen zwar zu einer tendenziellen, aber keiner signifikanten Herunterregulation des Liganden CCL19 gekommen ist. Ein Grund könnte in der von

Förster und zuvor auch von Yoshida beschriebenen unterschiedlichen Struktur der beiden Liganden liegen. CCL21 hat im Gegensatz zu CCL19 ein C-terminales Ende, bestehend aus 32 Aminosäuren, das ihm eine starke Bindung an Glykosaminoglykane ermöglicht. Dies ist eine Voraussetzung für eine effiziente Präsentation von CCL21 an der Oberfläche von EZ (Yoshida, Nagira et al. 1998; Forster, Davalos-Missslitz et al. 2008).

Gleichzeitig konnten wir *in vitro* zeigen, dass oxLDL als Streßsubstanz eine Ausreifung der DZ bewirkt. Bereits in vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass oxLDL einen Einfluss auf die Maturierung hat (Nickel, Schmauss et al. 2009). So kommt es nicht nur zu einer Hochregulation von CD83 und CD11a als Marker für die Maturierung sondern auch zu einer vermehrten Expression von Scavenger-Rezeptoren, die die Aufnahme von Antigenen (z.B. oxLDL) vermitteln (Alderman, Bunyard et al. 2002; Weis, Schlichting et al. 2002; Nickel, Schmauss et al. 2009).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen bereits bestehende Theorien (Angeli, Llodra et al. 2004; Llodra, Angeli et al. 2004), dass es durch oxLDL zu einer Modulation des Chemokin-Rezeptor-Profiles im Sinne einer verstärkten Maturierung kommt, die dazu führt, dass die DZ im atherosklerotischen Plaque akkumulieren und somit nicht mehr in der Lage sind, T-Zellen zu primen.

Krupa et al. (Krupa, Dewan et al. 2002) stellte bei Patienten mit Arteriitis cranialis (Giant-cell-arteritis, GCA) in der Arterienwand eine vermehrte Ausreifung von DZ fest. Sowohl CCR7 als auch dessen Liganden CCL19 und CCL21 waren vermehrt nachweisbar. Hier entstand die These des sogenannten „Trapping“ von DZ: Laut W.M. Krupa sind DZ selbst in der Lage die Liganden zu exprimieren. Findet allerdings eine verstärkte Maturierung der DZ statt, werden auch verstärkt die Liganden exprimiert. Durch die lokale Anwesenheit der Liganden kommt es zu einer verstärkten Rezeptor-/Liganden-Bindung womit CCR7 seine Homing-Fähigkeit verliert und DZ im Plaque „getrappt“ sind.

Zum einen ist zu beachten, dass in der Literatur hauptsächlich EZ als die Liganden exprimierenden Zellen beschrieben werden (Forster, Davalos-Missslitz et al. 2008), zum anderen ist die GCA zwar eine inflammatorische Erkrankung, ist in ihrem Verlauf aber akut und somit abzugrenzen von der hier untersuchten chronischen Atherosklerose. *In vivo* konnten wir zeigen, dass diese Liganden nur noch vermindert exprimiert werden und konnten dies *in vitro* bestätigen. In der vorliegenden Studie fand sich keine Korrelation zwischen der Expression von CCR7, CCL21/CCL19 und dem oxLDL-Spiegel im Serum der Patienten, obwohl der Homing-Rezeptor und seine Liganden *in vivo* signifikant herunter reguliert waren im atherosklerotischen Plaque und wir auch *in vitro* einen Einfluss

von oxLDL auf die Expression von CCR7 belegen konnten. Dies könnte erklärt werden, durch die Tatsache, dass der oxLDL-Spiegel im Serum nicht stabil ist und einer großen Schwankungsbreite unterliegt. Im subintimalen Raum kann oxLDL aber akkumulieren und somit viel höhere Konzentrationen als im Serum erreichen.

5.6 Der Einfluss von ADMA

ADMA, als endogener Inhibitor der NO-Synthetase, senkt in vivo und in vitro den NO-Spiegel und ist somit ein direkter Gegenspieler des stärksten endogenen Vasodilatators. Darüber hinaus spielt NO in der intrazellulären Signaltransduktion eine wichtige Rolle, induziert anti-inflammatorische, anti-thrombotische und anti-apoptotische Effekte (Antoniades, Antonopoulos et al. 2009).

ADMA, als endogenes L-Arginin Analogon, ist assoziiert mit einer endothelialen Dysfunktion (Antoniades, Shirodaria et al. 2009) und klinische Studien konnten bereits mehrfach zeigen, dass ein erhöhter ADMA-Spiegel mit endothelialer Dysfunktion und somit mit einem erhöhten kardiovaskulärem Risiko einhergeht (Schulze, Lenzen et al. 2006). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Höhe des ADMA-Spiegels mit dem Schweregrad der kardiovaskulären Erkrankung positiv korreliert (Wilson, Shin et al. 2010). Darüber hinaus ist ADMA ein unabhängiger Prädiktor für das klinische Outcome und die Mortalität von Patienten mit signifikanter Atherosklerose.

Ebenso scheint ein Zusammenhang zwischen der Höhe der ADMA-Spiegel und der Anzahl der kardiovaskulären Risikofaktoren zu bestehen (Juonala, Viikari et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich im Plasma der Patienten mit signifikanter Atherosklerose ca. um ein Viertel (27,8%) höhere ADMA-Spiegel finden im Vergleich zum Kontroll-Kollektiv. Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe der ADMA-Konzentration und der Anzahl der Risikofaktoren gefunden werden. Limitierend ist in diesem Fall sicherlich die Fallzahl von 47 Patienten, verglichen mit 2096 Probanden in der Studie von Juonala et al.

Die Subfamilie der CC-Chemokine ist für die Rekrutierung von Monozyten in atherosklerotischen Läsionen wichtig (Spinetti, Wang et al. 2004). Nach unserer Literaturrecherche wurde bisher nicht der Einfluss von ADMA auf CD83, CCR7 und CCL21/CCL19 untersucht. Wir konnten bereits zeigen, dass der Stressfaktor oxLDL zu einer Reduktion von CCR7 auf Dendritischen Zellen und zu einer verminderten Expression von CCL21 von Endothelzellen führt.

In einem zweiten Schritt untersuchten wir deshalb den Einfluss von ADMA auf die Chemokin-Expression von Dendritischen Zellen (CCR7 und CD83) bzw. von Endothelzellen (CCL19 und CCL21). Allerdings konnten wir hier – im Gegensatz zu oxLDL – keinen Effekt nachweisen.

Cheng, Li et al. (2007) konnten zeigen, dass ADMA die Adhäsion von Monozyten über eine Hochregulation von Chemokinen (CCR2 und CXCR2) steigert. Beides Chemokine, die auf zirkulierenden Monozyten exprimiert werden und bei Patienten mit Hypercholesterinämie und Hypertension verstärkt exprimiert werden (Bush, Maeda et al. 2000).

In der Arbeit von Cheng et al. wurden 30 μM ADMA zur Stimulation der Monozyten verwendet. In der vorliegenden Arbeit inkubierten wir sowohl Dendritische Zellen als auch Endothelzellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ was ca. 5 μM ADMA entspricht.

Inwiefern kein signifikanter Effekt von ADMA gesehen werden konnte, weil die Konzentration zu gering war oder ob ADMA tatsächlich keinen Einfluss auf CD83, CCR7 und CCL21/CCL19 hat, wird Aufgabe weiterer Studien sein.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund und Arbeitskonzept:

Die Atherosklerose ist eine chronisch entzündliche Reaktion der Gefäßwand und wesentliche Ursache für die Progression kardiovaskulärer Erkrankungen. Um die Atherogenese zu verstehen, ist es neben der Risikofaktor-Darstellung entscheidend strukturelle und funktionelle (inflammatorische) Veränderungen im atherosklerotischen Plaque zu beurteilen.

Dendritische Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems und akkumulieren im atherosklerotischen Plaque.

Ziel dieser Arbeit war es die Maturierung von Dendritischen Zellen (CD83), die Expression und Modulation des Homing-Rezeptors CCR7 (auf Dendritischen Zellen) und dessen Liganden CCL21 und CCL19 (exprimiert von Endothelzellen) im atherosklerotischen Plaque zu charakterisieren und die Relevanz proatherogener Faktoren zu bestimmen.

Material und Methoden:

Wir charakterisierten zunächst *in vivo* die o.g. genannten Immun-Parameter in 47 humanen atherosklerotischen Plaques sowie im Serum dieser Patienten. Als Vergleichskollektiv dienten 14 humane, atherosklerosefreie aortale Gefäßabschnitte sowie das Serum von 10 gesunden Probanden.

Im zweiten Teil der Arbeit untersuchten wir *in vitro* den Einfluss der Stressfaktoren oxLDL und des endogenen NO-Inhibitors ADMA auf das entsprechende Chemokin-Expressionsmuster von Dendritischen Zellen und humanen mikrovaskulären Endothelzellen.

Mittels rtPCR bestimmten wir die mRNA-Level von CD83, CCR7 und dessen Liganden CCL19 und CCL21 in den Gefäßabschnitten sowie im Serum der beiden Gruppen.

Um unsere Ergebnisse auf Proteinebene zu bestätigen führten wir eine Immunfluoreszenz mit histologischen Schnitten der atherosklerotischen Plaques sowie der atherosklerosefreien Gefäßabschnitte durch. Mittels ELISA bestimmten wir die Serum-Spiegel von oxLDL, ADMA und CCL21.

Nach Stimulation von Endothelzellen mit oxLDL und ADMA ermittelten wir mittels rtPCR und Immunfluoreszenz die Aktivierbarkeit von CCL19 und CCL21. In einem parallel konzipierten Ansatz stimulierten wir mit den genannten Streßsubstanzen Dendritische Zellen und bestimmten mittels rtPCR und Durchflußzytometrie die Expression von CD83 und CCR7.

Ergebnisse:

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der Chemokin-Rezeptor CCR7 als auch dessen Liganden CCL21/CCL19 im atherosklerotischen Plaque herunter reguliert sind und es gleichzeitig zu einer Akkumulation maturer Dendritischer Zellen (Hochregulation von CD83) im atherosklerotischen Plaque kommt.

Im Serum der Patienten mit Carotis-Stenose fanden sich eine Hochregulation von CCL21 und gleichzeitig eine verringerte Expression des Homingrezeptor CCR7.

Des Weiteren ist oxLDL im Serum von Patienten mit Carotis-Stenose vermehrt nachweisbar und führt zu einer verminderten Expression von CCL21 auf Endothelzellen. Gleichzeitig stimuliert oxLDL die Ausreifung Dendritischer Zellen bei verminderter Expression von CCR7.

Obwohl im Serum der Patienten mit Carotis-Stenose höhere ADMA-Konzentrationen gemessen werden konnten, konnten wir *in vitro* keinen Einfluss von ADMA auf die entsprechende Chemokinexpression auf Endothelzellen und Dendritische Zellen nachweisen.

Es ergab sich keine Korrelation zwischen den klassischen Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Adipositas mit der Expression von CD83, CCR7 und CCL21/19.

Bedeutung und Ausblick:

Die Resultate dieser Arbeit zeigen *in vivo*, dass es bei Patienten mit signifikanter Atherosklerose zu einer verstärkten Maturierung Dendritischer Zellen kommt. Gleichzeitig ist es ihnen – aufgrund ungenügender Expression von CCR7 – wahrscheinlich nicht mehr möglich zum Lymphknoten zu emigrieren. Man muss daher davon ausgehen, dass es zum „Trapping der Dendritischen Zellen“ kommt: zur konsekutiven Akkumulation der Dendritischen Zellen im Plaque. Als möglichen Stressfaktor, welcher zu einer CCR7-Reduktion im Plaque (aber auch systemisch) führt, konnten wir das oxLDL identifizieren.

Ein therapeutischer Ansatzpunkt kann die Plaquestabilisierung und somit die Vermeidung einer Plaqueruptur sein, indem man die Maturierung Dendritischer Zellen im atherosklerotischen Plaque verhindert bzw. ein Auswandern ermöglicht.

Inwiefern die Expression von Chemokinrezeptoren und –Liganden im Plaque medikamentös beeinflusst werden kann bzw. inwiefern ein Auswandern bereits maturierter DZ möglich ist, wird Aufgabe weiterer Studien sein.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APZ	Antigen präsentierende Zellen
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
DZ	Dendritische Zellen
EZ	Endothelzellen
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
HEV	high endothelial venules
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	mucosa associated lymphoid tissue
MGDZ	Monozyten generierte Dendritische Zellen
MHC	Major Histocompatibility Complex
mDZ	myeloide Dendritische Zellen
mRNS	Messenger Ribonuklein Säure
oxLDL	oxidiertes low density lipoproteine
PBMZ	aus peripherem Blut entnommene Mononukleär
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	platelet derived growth factor
pDZ	plasmazytoide Dendritische Zellen
SCY	small secreted cytokines
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
VALT	vascular-associated lymphoid tissue

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Alderman, C. J., P. R. Bunyard, et al. (2002). "Effects of oxidised low density lipoprotein on dendritic cells: a possible immunoregulatory component of the atherogenic micro-environment?" Cardiovasc Res **55**(4): 806-19.
2. Allavena, P., A. Sica, et al. (2000). "The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues." Immunol Rev **177**: 141-9.
3. Angeli, V., J. Llodra, et al. (2004). "Dyslipidemia associated with atherosclerotic disease systemically alters dendritic cell mobilization." Immunity **21**(4): 561-74.
4. Ansel, K. M. and J. G. Cyster (2001). "Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development." Curr Opin Immunol **13**(2): 172-9.
5. Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
6. Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
7. Bellingan, G. J., H. Caldwell, et al. (1996). "In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes." J Immunol **157**(6): 2577-85.
8. Bobryshev, Y. V. (2000). "Dendritic cells and their involvement in atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **11**(5): 511-7.
9. Bobryshev, Y. V. (2005). "Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance." Eur Heart J **26**(17): 1700-4.
10. Bobryshev, Y. V. and R. S. Lord (1995). "Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of Vascular Dendritic Cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta." Arch Histol Cytol **58**(3): 307-22.
11. Bobryshev, Y. V. and R. S. Lord (1998). "Mapping of vascular dendritic cells in atherosclerotic arteries suggests their involvement in local immune-inflammatory reactions." Cardiovasc Res **37**(3): 799-810.
12. Boyum, A. (1983). "Isolation of human blood monocytes with Nycodenz, a new non-ionic iodinated gradient medium." Scand J Immunol **17**(5): 429-36.
13. Brand, K., C. L. Banka, et al. (1994). "Oxidized LDL enhances lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in human adherent monocytes." Arterioscler Thromb **14**(5): 790-7.

14. Bundesamt, S. (2005). "Leben in Deutschland - Haushalte, Familien und Gesundheit - Ergebnisse des Mikrozensus."
15. Bundesamt, S. (2010). "Sterbefälle ab 1998, Todesursachenstatistik."
16. Candipan, R. C., B. Y. Wang, et al. (1996). "Regression or progression. Dependency on vascular nitric oxide." Arterioscler Thromb Vasc Biol **16**(1): 44-50.
17. Charo, I. F. and R. M. Ransohoff (2006). "The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation." N Engl J Med **354**(6): 610-21.
18. Cooke, J. P. (2004). "Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker?" Circulation **109**(15): 1813-8.
19. Cooke, J. P. and V. J. Dzau (1997). "Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease." Annu Rev Med **48**: 489-509.
20. Cooke, J. P., A. H. Singer, et al. (1992). "Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit." J Clin Invest **90**(3): 1168-72.
21. Coutant, F., S. Agaugue, et al. (2004). "Sensing environmental lipids by dendritic cell modulates its function." J Immunol **172**(1): 54-60.
22. Dal Canto, A. J., P. E. Swanson, et al. (2001). "IFN-gamma action in the media of the great elastic arteries, a novel immunoprivileged site." J Clin Invest **107**(2): R15-22.
23. Damas, J. K., C. Smith, et al. (2007). "Enhanced expression of the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in clinical and experimental atherosclerosis: possible pathogenic role in plaque destabilization." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(3): 614-20.
24. de Baey, A. and A. Lanzavecchia (2000). "The role of aquaporins in dendritic cell macropinocytosis." J Exp Med **191**(4): 743-8.
25. DiPietro, L. A., P. J. Polverini, et al. (1995). "Modulation of JE/MCP-1 expression in dermal wound repair." Am J Pathol **146**(4): 868-75.
26. Dzionek, A., A. Fuchs, et al. (2000). "BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood." J Immunol **165**(11): 6037-46.
27. Ehara, S., M. Ueda, et al. (2001). "Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes." Circulation **103**(15): 1955-60.
28. Erbel, C., K. Sato, et al. (2007). "Functional profile of activated dendritic cells in unstable atherosclerotic plaque." Basic Res Cardiol **102**(2): 123-32.
29. Forster, R., A. C. Davalos-Missslitz, et al. (2008). "CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance." Nat Rev Immunol **8**(5): 362-71.

30. Forster, R., A. Schubel, et al. (1999). "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs." Cell **99**(1): 23-33.
31. Govindaraju, D. R., L. A. Cupples, et al. (2008). "Genetics of the Framingham Heart Study population." Adv Genet **62**: 33-65.
32. Greaves, D. R. and T. J. Schall (2000). "Chemokines and myeloid cell recruitment." Microbes and Infection **2**(3): 331-336.
33. Gunn, M. D., K. Tangemann, et al. (1998). "A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 258-63.
34. Hagihara, M., A. Higuchi, et al. (2004). "Platelets, after exposure to a high shear stress, induce IL-10-producing, mature dendritic cells in vitro." J Immunol **172**(9): 5297-303.
35. Hansson, G. K. (2005). "Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease." N Engl J Med **352**(16): 1685-95.
36. Koenen, R. R. and C. Weber (2010). "Platelet-derived chemokines in vascular remodeling and atherosclerosis." Semin Thromb Hemost **36**(2): 163-9.
37. Koenen, R. R. and C. Weber (2011). "Chemokines: established and novel targets in atherosclerosis." EMBO Mol Med **3**(12): 713-25.
38. Krupa, W. M., M. Dewan, et al. (2002). "Trapping of misdirected dendritic cells in the granulomatous lesions of giant cell arteritis." Am J Pathol **161**(5): 1815-23.
39. Li, Z., J. R. McNamara, et al. (1996). "Effects of gender and menopausal status on plasma lipoprotein subspecies and particle sizes." J Lipid Res **37**(9): 1886-96.
40. Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
41. Llodra, J., V. Angeli, et al. (2004). "Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(32): 11779-84.
42. Lobstein, J. (1833). Traité d'Anatomie Pathologique. Paris.
43. Loetscher, M., T. Geiser, et al. (1994). "Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes." J Biol Chem **269**(1): 232-7.
44. Lord, R. S. and Y. V. Bobryshev (1999). "Clustering of dendritic cells in athero-prone areas of the aorta." Atherosclerosis **146**(1): 197-8.
45. Mantovani, A. (1999). "The chemokine system: redundancy for robust outputs." Immunol Today **20**(6): 254-7.

46. Marchand, F. (1904). Über Gehirnzystizerken; Sammlung klinischer Vorträge. Leipzig.
47. Mayerl, C., M. Lukasser, et al. (2006). "Atherosclerosis research from past to present--on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow." Virchows Arch **449**(1): 96-103.
48. McColl, S. R. (2002). "Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance." Immunol Cell Biol **80**(5): 489-96.
49. Millonig, G., H. Niederegger, et al. (2001). "Network of vascular-associated dendritic cells in intima of healthy young individuals." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(4): 503-8.
50. Miyazaki, H., H. Matsuoka, et al. (1999). "Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis." Circulation **99**(9): 1141-6.
51. Mori, S., H. Nakano, et al. (2001). "Mice lacking expression of the chemokines CCL21-ser and CCL19 (plt mice) demonstrate delayed but enhanced T cell immune responses." J Exp Med **193**(2): 207-18.
52. Naik, S. H., P. Sathe, et al. (2007). "Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo." Nat Immunol **8**(11): 1217-26.
53. Nickel, T., D. Schmauss, et al. (2009). "oxLDL uptake by dendritic cells induces upregulation of scavenger-receptors, maturation and differentiation." Atherosclerosis **205**(2): 442-50.
54. Nishi, K., H. Itabe, et al. (2002). "Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(10): 1649-54.
55. Perrin-Cocon, L., F. Coutant, et al. (2001). "Oxidized low-density lipoprotein promotes mature dendritic cell transition from differentiating monocyte." J Immunol **167**(7): 3785-91.
56. Prectel, A. T. and A. Steinkasserer (2007). "CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells." Arch Dermatol Res **299**(2): 59-69.
57. Randolph, G. J. (2008). "Emigration of monocyte-derived cells to lymph nodes during resolution of inflammation and its failure in atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **19**(5): 462-8.
58. Randolph, G. J., V. Angeli, et al. (2005). "Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels." Nat Rev Immunol **5**(8): 617-28.
59. Romani, N., G. Ratzinger, et al. (2001). "Migration of dendritic cells into lymphatics-the Langerhans cell example: routes, regulation, and relevance." Int Rev Cytol **207**: 237-70.

60. Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." Nature **362**(6423): 801-9.
61. Rossi, D. and A. Zlotnik (2000). "The biology of chemokines and their receptors." Annu Rev Immunol **18**: 217-42.
62. Saeki, H., A. M. Moore, et al. (1999). "Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes." J Immunol **162**(5): 2472-5.
63. Sallusto, F., P. Schaerli, et al. (1998). "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." Eur J Immunol **28**(9): 2760-9.
64. Sambrook, J. and M. J. Gething (1989). "Protein structure. Chaperones, paperones." Nature **342**(6247): 224-5.
65. Schulze, F., R. Wesemann, et al. (2004). "Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay." Clin Chem Lab Med **42**(12): 1377-83.
66. Shortman, K. and S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." Nat Rev Immunol **7**(1): 19-30.
67. Simionescu, N., E. Vasile, et al. (1986). "Prelesional events in atherogenesis. Accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit." Am J Pathol **123**(1): 109-25.
68. Sozzani, S., P. Allavena, et al. (1998). "Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties." J Immunol **161**(3): 1083-6.
69. Stary, H. C., A. B. Chandler, et al. (1994). "A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Circulation **89**(5): 2462-78.
70. Steinman, R. M., M. Witmer-Pack, et al. (1993). "Dendritic cells: antigen presentation, accessory function and clinical relevance." Adv Exp Med Biol **329**: 1-9.
71. Szekanecz, Z. and A. E. Koch (2001). "Chemokines and angiogenesis." Curr Opin Rheumatol **13**(3): 202-8.
72. Tiefenbacher, C. P. and J. Kreuzer (2003). "Nitric oxide-mediated endothelial dysfunction--is there need to treat?" Curr Vasc Pharmacol **1**(2): 123-33.
73. Trogan, E., J. E. Feig, et al. (2006). "Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in ApoE-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(10): 3781-6.

74. Vaidya, D., M. Szklo, et al. (2007). "Agreement of two metabolic syndrome definitions and their association with subclinical atherosclerosis: multi-ethnic study of atherosclerosis cross sectional study." Metab Syndr Relat Disord **5**(4): 343-52.
75. Vallance, P., A. Leone, et al. (1992). "Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure." Lancet **339**(8793): 572-5.
76. Vanbervliet, B., B. Homey, et al. (2002). "Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces." Eur J Immunol **32**(1): 231-42.
77. Vecchi, A., L. Massimiliano, et al. (1999). "Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells." J Leukoc Biol **66**(3): 489-94.
78. Vremec, D., M. Zorbas, et al. (1992). "The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells." J Exp Med **176**(1): 47-58.
79. Waltner-Romen, M., G. Falkensammer, et al. (1998). "A previously unrecognized site of local accumulation of mononuclear cells. The vascular-associated lymphoid tissue." J Histochem Cytochem **46**(12): 1347-50.
80. Weis, M., C. L. Schlichting, et al. (2002). "Endothelial determinants of dendritic cell adhesion and migration: new implications for vascular diseases." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(11): 1817-23.
81. Wick, G., H. Perschinka, et al. (1999). "Autoimmunity and atherosclerosis." Am Heart J **138**(5 Pt 2): S444-9.
82. www.americanheart.org.
83. Yilmaz, A., B. Lipfert, et al. (2007). "Accumulation of immune cells and high expression of chemokines/chemokine receptors in the upstream shoulder of atherosclerotic carotid plaques." Exp Mol Pathol **82**(3): 245-55.
84. Yilmaz, A., M. Lochno, et al. (2004). "Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques." Atherosclerosis **176**(1): 101-10.
85. Yoshida, R., M. Nagira, et al. (1998). "Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7." J Biol Chem **273**(12): 7118-22.
86. Zernecke, A., E. Shagdarsuren, et al. (2008). "Chemokines in atherosclerosis: an update." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(11): 1897-908.
87. Zhou, L. J. and T. F. Tedder (1996). "CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2588-92.
88. Zlotnik, A., J. Morales, et al. (1999). "Recent advances in chemokines and chemokine receptors." Crit Rev Immunol **19**(1): 1-47.

9. ANHANG

9.1 Anamnesebogen

„Dendritische Zellen in Atherosklerose“ – Studie, eine Kooperation der Medizinischen Klinik I und der Chirurgie, Ansprechpartner Dr. Nickel 123•1722; PD Dr. Weis 123•1715 für die Med. I und OA Dr. Kopp 123•1217 für die Chirurgie

Großer Patientenaufkleber	OP-Datum: _____ Art der OP: _____
---------------------------	--------------------------------------

Symptome: TIA	Apoplex	Demenz
Fontaine I ^o	II ^o	III ^o
Stabile AP	instabile AP	Myokardinfarkt (wann?)

Maligne Vorerkrankungen:	ja	nein
--------------------------	----	------

Diagnose/ED: _____ / _____

Therapie:	CX	Radiatio
-----------	----	----------

CVRF:

DM (ED, IDDM/NIDDM): _____

Nikotin (pack years): _____

Hyperlipoproteinämie (ED): _____

Hypertonus (ED): _____

Jährliche Influenza-Impfung: _____

Medikation/Dosis/Therapiebeginn:

Thrombozytenaggregationshemmer: _____

Antihypertensiva: _____

Statine: _____

Immunsuppressiva: _____

Duplexsonographische Plaquemorphologie:

Harter Plaque	weicher Plaque	Ulzerationen
---------------	----------------	--------------

Intima-Dicke: _____

V_{max}: _____

9.2 Patienteninformation

Klinikum der Universität München – Großhadern
Medizinische Klinik I
Marchioninistraße 15
81377 München

_____ **LMU**
Ludwig _____
Maximilians-
Universität _____
München _____

Charakterisierung dendritischer Zellen und deren Chemokin-•Rezeptoren/•Liganden im atherosklerotischen Plaque – Relevanz proatherogener Faktoren

Ansprechpartner (Medizinische Klinik I): Dr. Nickel (089/7095-3172)
Ansprechpartner (Chirurgie): OA Dr. Kopp

Patienteninformation

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir führen derzeit eine Studie zur Untersuchung an sog. dendritischen Zellen, einer Untergruppe der weißen Blutkörperchen durch. Diese Zellen spielen sowohl bei der Entstehung als auch bei dem Fortschreiten der Gefäßverkalkung eine maßgebliche Rolle. Wir hoffen, dass durch neue Erkenntnisse über diese Zellen längerfristig neue Therapieoptionen entwickelt werden können.

Zu diesem Zweck bitten wir Sie sich damit einverstanden zu erklären, dass das während der Operation entnommene Gewebe von uns histologisch (mikroskopisch) weiter aufgearbeitet wird und einzelne Eiweiße, unter anderem sog. Chemokine, bestimmt werden.

An dieser Stelle soll klar gestellt werden, dass Ihnen für die Studie kein zusätzliches Material entnommen wird, sondern nur das Gewebe Verwendung findet, welches nicht zur weiteren Diagnostik notwendig ist und deshalb verworfen werden würde.

Neben der Erfassung der sog. klassischen Risikofaktoren (Bluthochdruck, Rauchen etc.) ist man seit kurzem in der Lage aus dem Blut Substanzen zu isolieren, deren Konzentrationen mit dem Voranschreiten der Gefäßverkalkung korrelieren.

Zu diesen Faktoren zählen unter anderem: oxLDL, ADMA, Osteoprotegerin, Oncostatin-M.

Im Rahmen dieser Studie beabsichtigen wir die Konzentration im Blut zu messen, um eventuelle Zusammenhänge mit dem Verkalkungsvorgang im Gefäß zu untersuchen. Wir benötigen zu diesem Zweck 3x9ml Blut (2xEDTA, 1xSerum).

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben und nur in verschlüsselter (pseudonymisierter) Form gespeichert, d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode. Der Zugang zu den Originaldaten und auf den Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Herr PD Dr. med. M. Weis und Herrn Dr. med. T. Nickel.

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit Ihrer Daten ebenfalls gewährleistet.

Es werden keine genetischen Untersuchungen durchgeführt.

Selbstverständlich können Sie jederzeit ohne Angabe von Gründen von der Studienteilnahme zurücktreten.

Herzlichen Dank für Ihre Mitarbeit

9.3 Einverständniserklärung

Klinikum der Universität München – Großhadern
Medizinische Klinik I
Marchioninistraße 15
81377 München

_____ **LMU**
Ludwig-
Maximilians-
Universität-
München-_____

Charakterisierung dendritischer Zellen und deren Chemokin-Rezeptoren/-Liganden in atherosklerotischen Plaques – Relevanz proatherogener Faktoren

Anspruchspartner (Medizinische Klinik I): Dr. Nickel (089/7095-3172)
Anspruchspartner (Chirurgie): O.A. Dr. Kopp

_____ **AUFKLEBER**

Studiennummer: _____

Einverständniserklärung

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir führen derzeit eine Studie zur Untersuchung an sog. dendritischen Zellen, einer Untergruppe der weißen Blutkörperchen durch. Diese Zellen spielen sowohl bei der Entstehung als auch bei dem Fortschreiten der Gefäßverkalkung eine maßgebliche Rolle. Wir hoffen, dass durch neue Erkenntnisse über diese Zellen längerfristig neue Therapieoptionen entwickelt werden können.

Zu diesem Zweck bitten wir Sie sich damit einverstanden zu erklären, dass das während der Operation entnommene Gewebe von uns histologisch (mikroskopisch) weiter aufgearbeitet wird und einzelne Erweiße, unter anderem sog. Chemokine, bestimmt werden.

An dieser Stelle soll klar gestellt werden, dass Ihnen für die Studie kein zusätzliches Material entnommen wird, sondern nur das Gewebe Verwendung findet, welches nicht zur weiteren Diagnostik notwendig ist und deshalb verworfen werden würde.

Neben der Erfassung der sog. klassischen Risikofaktoren (Bluthochdruck, Rauchen etc.) ist man seit kurzem in der Lage aus dem Blut Substanzen (z.B. *oxLDL*, *ADMA*, *Osteoprotegerin*, *Oncostatin-M*) zu isolieren, deren Konzentrationen mit dem Voranschreiten der Gefäßverkalkung korrelieren. Im Rahmen dieser Studie beabsichtigen wir die Konzentration im Blut zu messen, um eventuelle Zusammenhänge mit dem Verkalkungsvorgang im Gefäß zu untersuchen. Wir benötigen zu diesem Zweck 3x9ml Blut (2xEDTA, 1xSerum).

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben und nur in verschlüsselter (pseudonymisierter) Form gespeichert, d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode. Der Zugang zu den Originaldaten und auf den Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Herr PD Dr. med. M. Weis und Herrn Dr. med. T. Nickel.

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit Ihrer Daten ebenfalls gewährleistet. Es werden keine genetischen Untersuchungen durchgeführt. Selbstverständlich können Sie jederzeit ohne Angabe von Gründen von der Studienmitnahme zurücktreten.

☐ Ich bin damit einverstanden, dass das mir während der Operation entnommene Material zu Forschungszwecken weiter untersucht wird.

☐ Ich bin damit einverstanden, dass mir drei mal 9ml Blut entnommen werden und zu Forschungszwecken weiter untersucht werden.

München, den _____

_____ Unterschrift Patient

_____ Unterschrift Studienbeauftragter

10. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. med. Michael Weis für die Ermöglichung dieses Projektes im Rahmen des Promotionsstudienganges zur Förderung von Forschung und Lehre, die Bereitstellung des Themas, die Diskussionsbereitschaft, Unterstützung und stete Anregung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Insbesondere möchte ich mich bei Dr. med. Thomas Nickel für seine Begeisterung für das Thema, seine Geduld und den unermüdlichen Enthusiasmus bedanken. Seine Betreuung und umfassende Unterstützung haben in einem ganz erheblichen Maß zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und ohne ihn wäre ein erfolgreicher Abschluss nicht möglich gewesen.

Des Weiteren danke ich Professor Dr. med. Gerhard Steinbeck für die Übernahme der Arbeit an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I an der LMU München.

Ich bedanke mich herzlich beim gesamten Team der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. med. Michael Weis für die stets hilfsbereite Zusammenarbeit und freundschaftliche Atmosphäre im Labor.

Ganz besonders möchte ich aber Zeljka Sisic für die große Unterstützung in der Versuchsdurchführung, die freundschaftliche Zusammenarbeit und das stets offene Ohr für mich danken.

Der größte Dank gilt meiner Familie und insbesondere meinen Eltern. Ohne ihre ausdauernde, liebevolle und vielseitige Unterstützung wäre die Umsetzung meiner Promotion und meines Studiums nicht möglich gewesen.

11. LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Claudia Sabrina Summo
Adresse: Oettingenstrasse 56
80538 München
Telefon: 0176 6 37 38 021
Email: c.summo@gmail.com
Geburtsdatum: 31. Mai 1983
Geburtsort: München

HOCHSCHULSTUDIUM

10/2003 - 05/2010 Studium der Humanmedizin (Abschlussnote: 2,5)
Ludwig-Maximilians-Universität München
08/2005 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: gut)
04/2010 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: gut)

06/2010 Approbation als Ärztin

WISSENSCHAFTLICHE ARBEIT

Seit 2006 Promotionsstudium im Rahmen des Förderprogramms für
Forschung und Lehre (FöFoLe)

Seit 2006 Mitglied der Forschungsgruppe zum Thema **Dendritische
Zellen in der Atherosklerose** an der Klinik und Poliklinik I,
Klinikum der Universität München, Großhadern unter der
Leitung von Professor Dr. med. Michael Weis

2006 - 2010 Dissertation zum Thema:
**Charakterisierung dendritischer Zellen und deren
Chemokin- Rezeptoren/-Liganden im atherosklerotischen
Plaque – Relevanz proatherogener Faktoren**

Vorträge:

05/2008 Abschlussvortrag im Rahmen des FöFoLe-Programm zum
Dissertationsthema

Publikationen:

Nickel T, Schmauss D, Hanssen H, Sisic 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.

Nickel T, Deutschmann A, Hanssen H, **Summo C**, Wilbert-Lampen U: *Modification of endothelial biology by acute and chronic stress hormones*. *Microvasc Res*. 2009 Dec;78(3):364-9.

Nickel T, Hanssen H, Sisic Z, **Summo C**, Schmauss D, Hoster E, Weis M: *Immunoregulatory effects of the flavonol quercetin in vitro and in vivo*. *European Journal of Nutrition* 2011, vol. 50(3), pp. 163-72

Nickel T, Hanssen H, Emslander I, Drexel V, Hertel G, Schmidt-Trucksäss A, **Summo C**, Sisic Z, Lambert M, Hoster E, Halle M, Weis M: *Immunomodulatory effects of aerobic training in obesity*. *Mediators Inflamm*. 2011, vol. 2011, pp. 308965

Nickel T, Pfeiler S, **Summo C**, Kopp R, Meimarakis G, Sisic Z, Lambert M, David R, Kaczmarek I, Weis M, Lackermair K, Beiras-Fernandez A: *oxLDL downregulates the dendritic cell homing factors CCR7 and CCL21*. *Mediators of Inflammation* 2012 Epub 2012 Apr 30

12. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet.

München, den 09.05.2012

Claudia Summo