

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Medizinischen Klinik und Poliklinik D

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt -

Die Hemmung der Apoptose von Monozyten durch die Phagozytose von Thrombozyten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Frank Dohle

aus Wickede (Ruhr)

2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Stefan Heidenreich

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Thomas

Tag der mündlichen Prüfung: 09.08.2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Medizinischen Klinik und Poliklinik D

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt -

- Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Stefan Heidenreich -

- Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Thomas -

ZUSAMMENFASSUNG

Die Hemmung der Apoptose von Monozyten durch die Phagozytose von Thrombozyten

Frank Dohle

Monozyten interagieren mit Thrombozyten in mannigfachen Situationen wie bei Entzündungsreaktionen, Hämostasevorgängen oder Gefäßwandveränderungen. Bei entzündlichen und thrombotischen Erkrankungen kommt es zu einer Anhäufung von Monozyten und Thrombozyten an entzündlichen Stellen und endothelialen Verletzungen.

In dieser Studie wurden die unterschiedlichen Interaktionen zwischen Monozyten und Thrombozyten untersucht und dabei der Einfluss von Thrombozyten auf die Apoptose von Monozyten analysiert. Humane Monozyten wurden frisch isoliert und die monozytäre Apoptose wurde dann mit Serum-Deprivation oder Stimulation über eine CD95/FAS-Ligation oder mit Interleukin 4 induziert. Anschließend erfolgte die gemeinsame Kokultivierung mit Thrombozyten. Der Apoptosenachweis der Monozyten wurde mittels Durchflußzytometrie über eine Propidiumjodid-Färbung und einem TUNEL-Assay, mittels einer DNA-Elektrophorese und mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie geführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Apoptose von Monozyten durch die Kokultivierung mit Thrombozyten supprimiert wurde. Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigten die Aufnahme von Thrombozyten in den Monozyten über Phagozytose. Die Blockierung der monozytären Phagozytose durch Cytochalasin D verhinderte die Ingestion der Thrombozyten durch die Monozyten und führte zu hohen monozytären Apoptoseraten. Das Überleben der Monozyten ging mit einer Herunterregulation des intrazellulären Schlüsselenzyms Caspase-3 in Zusammenhang mit der Aufnahme von Thrombozyten einher. Lösliche, thrombozytäre Faktoren hatten ebenso keinen Einfluss auf die monozytäre Apoptose wie die Gabe von Latex-Partikeln oder Zymosan A. Auch die Blockierung der verschiedenartigsten monozytären und thrombozytären Rezeptoren, die bei der Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten von Bedeutung sind, wie zum Beispiel CD41a, CD62P, CD14, CD36 und CD40 konnte den zytoprotektiven Effekt der Thrombozyten auf die Monozyten nicht verhindern.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchungen eine Unterdrückung der Apoptose der Monozyten durch Thrombozyten über spezifische, von der Phagozytose abhängige Mechanismen mit weitreichenden Konsequenzen für artherosklerotische oder entzündliche Prozesse.

Termin der mündlichen Prüfung: 09.08.2004

Und wenn ich prophetisch reden könnte
und alle Geheimnisse wüsste
und alle Erkenntnis hätte;
wenn ich alle Glaubenskraft besäße
und Berge damit versetzen könnte,
hätte aber die Liebe nicht,
wäre ich nichts.
(1 Korinther 13,2)

Für meine Eltern und meine Schwester

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	MONOZYTEN	1
1.1.1	Die Rolle der Monozyten im humanen Organismus	1
1.1.2	Monozytopoese.....	2
1.1.3	Morphologie der Monozyten.....	3
1.1.4	Mononukleäres phagozytisches System	4
1.1.5	Funktionsweise der Monozyten im Immunsystem.....	7
1.1.5.1	Sekretorische Funktion der Monozyten.....	7
1.1.5.2	Stimulation und Aktivierung der Monozyten	8
1.1.5.3	Monozyten als antigenpräsentierenden Zellen.....	9
1.1.5.4	Zytotoxizität der Monozyten	10
1.2	APOPTOSE	11
1.2.1	Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose.....	11
1.2.3	Die Bedeutung der Apoptose für den Organismus.....	13
1.2.4	Intrazelluläre Signalkaskaden der Apoptose	14
1.2.5	Apoptose von Monozyten.....	17
1.2.5.1	Induktoren der Apoptose von Monozyten	17
1.2.5.2	Inhibitoren der Apoptose von Monozyten	19
1.3	PHAGOZYTOSE	21
1.3.1	Rezeptoren und Adhärenz	21
1.3.2	Signaltransduktionen während der Phagozytose	23
1.3.3	Intrazelluläre Prozessierung und Verdauung.....	23
1.4	THROMBOZYTEN	25
1.4.2	Thrombopoese	25
1.4.3	Morphologie der Thrombozyten.....	26
1.4.3	Rezeptoren und Aktivierung.....	27
1.5	MONOZYTEN UND THROMBOZYTEN	30
1.6	ZIELE DER ARBEIT.....	33

2	MATERIAL UND METHODEN	35
2.1	LABORGERÄTE.....	35
2.1.1.1	Zentrifugengeräte.....	35
2.1.1.2	Zellkulturgeräte.....	35
2.1.1.3	Mikroskopie.....	35
2.1.1.4	Durchflußzytometrie.....	35
2.1.1.5	Geräte für die Immunfluoreszenzmikroskopie	36
2.1.1.6	Geräte für die Elektrophorese	36
2.1.1.6	Sonstige Geräte	36
2.2	MATERIALIEN	37
2.2.1	Serum für die Zellkultur	37
2.2.2	Kulturmedium und Puffer.....	37
2.2.2.1	Kulturmedium für Monozyten	37
2.2.2.2	Hepes/Tyrode-Puffer	38
2.2.2.3	Hypotoner Thrombozytenpuffer	38
2.2.2.4	Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS).....	39
2.2.2.5	Natriumacid-Lösung	39
2.2.2.6	Paraformaldehyd-Puffer.....	39
2.2.2.7	Saponin-Puffer	39
2.2.2.8	Trypanblau.....	39
2.2.2.9	Trypsin/EDTA-Lösung.....	40
2.2.2.10	Triton-X-100	40
2.2.2.11	TAE-Puffer (50fach)	40
2.2.2.12	Laufpuffer für die Gelelektrophorese.....	40
2.2.3	Zytokine.....	41
2.2.4	Monoklonale Antikörper	42
2.2.5	Polyklonale Antikörper	43
2.2.6	Reagenzien und Chemikalien	43
2.2.6.1	Reagenzien zur Hemmung der Phagozytose.....	43
2.2.6.2	Reagenzien zur Inhibition von Membranrezeptoren.....	43
2.2.6.3	Reagenzien für den durchflußzytometrischen Apoptosenachweis	43
2.2.6.4	Reagenzien für den gelelektrophoretischen Apoptosenachweis.....	43
2.2.7	Plastikmaterialien	44

2.3	PRÄPARATION HUMANER MONOZYTEN	45
2.3.1	Isolierung von Monozyten mittels	
	Ficoll-Percoll - Dichtegradientenzentrifugation.....	45
2.3.2	Isolierung von Monozyten mittels	
	immunomagnetischer Separation (MACS)	48
2.4	PRÄPARATION HUMANER THROMBOZYTEN	51
2.4.1	Probanden und Probenabnahme	51
2.4.2	Isolierung von Thrombozyten durch Zentrifugation.....	51
2.4.3	Fluoreszenzmarkierung der Thrombozytenmembran.....	52
2.5	IN VITRO - TESTSYSTEME	54
2.5.1	Kultivierung von Monozyten und Koinkubation mit Thrombozyten....	54
2.5.2	Induktion der Thrombozytenaktivierung.....	54
2.5.3	Inkubation von Monozyten mit fragmentierten oder löslichen	
	thrombozytären Faktoren.....	55
2.5.4	Inkubation von Monozyten mit Zymosan A und Latex-Mikropartikeln	55
2.5.5	Koinkubation von Monozyten mit Fluoreszenz-markierten.....	
	Thrombozyten und Cytochalasin D.....	57
2.5.6	Monozytäre und thrombozytäre Rezeptorinhibitoren.....	57
2.6	DURCHFLUßZYTOMETRIE	59
2.6.1	Aufbau und Funktionsweise eines Durchflußzytometers.....	59
2.6.2	Auswertung der durchflußzytometrische Daten	62
2.7	DURCHFLUßZYTOMETRISCHE METHODEN	64
2.7.1	Monozytärer Apoptosenachweis mittels Propidiumjodid	64
2.7.2	Monozytärer Apoptosenachweis mittels TUNEL - Assay	65
2.7.3	Nachweis intrazellulärer Caspase-3-Aktivität.....	67
2.7.4	Detektion des monozytären Oberflächenrezeptors CD14	68
2.7.5	Detektion der Thrombozytenaktivierung anhand	
	der CD62P-Expression (α -Granula-Sekretion).....	68
2.8	GELELEKTROPHORETISCHER APOPTOSENACHWEIS	70
2.9	TRANSMISSIONS-ELEKTRONENMIKROSKOPIE	73
2.10	IMMUNFLUORESZENZMIKROSKOPIE	73
2.11	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	74

3	ERGEBNISSE	75
3.1	SUPPRESSION DER MONOZYTÄREN APOPTOSE	75
	DURCH THROMBOZYTEN.....	75
3.1.1	Protektion monozytärer Apoptose induziert durch Serum-Deprivation.... durch aufsteigende Anzahlen an Thrombozyten	75
3.1.2	Auswirkung der Koinkubationszeit mit Thrombozyten	
	auf die Apoptoseprotektion von Monozyten	77
3.1.3	Expression von CD95/FAS auf Monozyten	79
3.1.4	Suppression der Apoptose von Monozyten induziert	
	durch α CD95/FAS mAb durch Thrombozyten.....	80
3.1.5	Einfluss von Thrombozyten auf die monozytäre Apoptose induziert..... durch IL-4	81
3.2	NACHWEIS MONOZYTÄRER APOPTOSE MITTELS	82
	TUNEL UND DIE EFFEKTE DER THROMBOZYTEN	82
3.3	GELELEKTROPHORETISCHER APOPTOSE-NACHWEIS.....	85
	VON MONOZYTEN UND DIE EFFEKTE DER THROMBOZYTEN.....	85
3.4	FRÜHE MONOZYTÄRE APOPTOSESTADIEN UND	87
	DIE AUSWIRKUNGEN VON THROMBOZYTEN	87
3.4.1	Einfluss von Thrombozyten auf die CD14-Expression	
	von apoptoseinduzierten Monozyten.....	87
3.4.2	Einfluss von Thrombozyten auf die intrazelluläre Caspase-3-Aktivität von apoptoseinduzierten Monozyten.....	89
3.5	UNTERSUCHUNGEN UNTER ANWENDUNG DER	91
	TRANSMISSIONS-ELEKTRONENMIKROSKOPIE	91
3.6	PHAGOZYTÖSE UND APOPTOSE VON MONOZYTEN	99
3.6.1	Phagozytoseinduktion durch Zymosan A und Latex-Mikropartikel	
	und der Einfluss auf die Apoptose von Monozyten	99
3.6.2	Auswirkungen von löslichen thrombozytären Faktoren.....	
	auf die Apoptose von Monozyten.....	101

3.7	MONOZYTÄRE PHAGOZYTOSE VON THROMBOZYTEN.....	104
3.7.1	Fluoreszenzmarkierung der Thrombozytenmembran.....	104
3.7.2	Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Phagozytose von..... fluoreszenzmarkierten Thrombozyten durch Monozyten.....	105
3.7.2	Inhibition der Phagozytose durch Cytochalasin D und Reduktion der thrombozytären Apoptoseprotektion von Monozyten..	107
3.7.3	Adhärenz oder Ingestion von fluoreszenzmarkierten Thrombozyten durch apoptotische Monozyten.....	110
3.8	ANWENDUNG VON REZEPTORINHIBITOREN	113
3.8.1	Expression von CD40 auf Monozyten	113
3.8.2	Blockierung des CD40-Rezeptors auf Monozyten.....	114
3.8.3	Blockierung des CD14-Rezeptors auf Monozyten.....	116
3.8.4	Einfluss von Adhäsionsinhibitoren auf den Apoptoseschutz von Monozyten durch Thrombozyten	118
3.9	SUPPRESSION DER APOPTOSE VON MONOZYTEN	121
	DURCH AKTIVIERTE THROMBOZYTEN	121
3.9.1	Thrombozytenaktivierung und CD62P-Expression	121
3.9.2	Suppression der monozytären Apoptose durch aufsteigende Anzahlen an aktivierten Thrombozyten	123
3.9.3	Korrelation zwischen monozytärer Apoptoserate und Thrombozytenaktivierung mittels CD62P-Expression.....	124

4	DISKUSSION	126
4.1	APOPTOSE VON MONOZYTEN	126
4.1.1	Induktion der Apoptose von Monozyten durch Serumdeprivation	126
4.1.2	Induktion der Apoptose von Monozyten durch α CD95/FAS mAb	127
4.1.3	Induktion der Apoptose von Monozyten durch Interleukin 4	128
4.2	MONOZYTEN UND THROMBOZYTEN	129
4.2.1	Suppression der monozytären Apoptose durch Thrombozyten	129
4.2.3	Konzentrationsabhängigkeit der Suppression	
	der monozytären Apoptose durch Thrombozyten	130
4.2.4	Eine zweistündige Kokultivierungszeit erzielt	
	die Apoptose-Protektion von Monozyten durch Thrombozyten	130
4.2.5	Quantitativer Nachweis der thrombozytären Protektion	
	der monozytären Apoptose mittels Propidiumjodid	131
4.2.6	Quantitativer und qualitativer Nachweis der thrombozytären Protektion..	
	der monozytären Apoptose mittels TUNEL-Assay	131
4.2.7	Qualitativer Nachweis der thrombozytären Protektion	
	der monozytären Apoptose mittels Gelelektrophorese	132
4.2.8	Qualitativer Nachweis der thrombozytären Apoptoseprotektion	
	der Monozyten mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie	133
4.2.9	Steigerung der CD14-Expression von apoptoseinduzierten Monozyten....	
	durch kokultivierte Thrombozyten	133
4.2.10	Reduktion der Aktivierung von Caspase-3	
	in serumdeprivierten Monozyten durch Thrombozyten	134
4.3	PHAGOZYTOSE UND APOPTOSE VON MONOZYTEN	137
4.3.1	Die Suppression monozytärer Apoptose	
	durch phagozytierte Thrombozyten	137
4.3.2	Die Phagozytoseinduktion durch Zymosan A und Mikropartikel	
	führt zu keiner Suppression von monozytärer Apoptose	138
4.3.3	Lösliche, thrombozytäre Faktoren haben keinen Einfluss	
	auf die Apoptose von Monozyten	139
4.3.4	Inhibition der Phagozytose von Thrombozyten und Reduktion	
	der Suppression der Apoptose von Monozyten	140

4.3.5	Unterscheidung zwischen Adhärenz und Phagozytose	142
4.3.6	Die Einflüsse der Phagozytose auf die Apoptose von Monozyten.....	144
4.4	EFFEKTE VON ADHÄSIONSINHIBITOREN	146
4.5	SUPPRESSION DER APOPTOSE VON MONOZYTEN	152
	DURCH AKTIVIERTE THROMBOZYTEN	152
5	ZUSAMMENFASSUNG	154
6	AUSBLICK	155
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	158
8	LITERATURVERZEICHNIS	162
9	LEBENS LAUF	191
10	DANKSAGUNG	192

1 Einleitung

1.1 Monozyten

1.1.1 Die Rolle der Monozyten im humanen Organismus

Monozyten gehören neben den Granulozyten und Lymphozyten zu der Population der weißen Blutkörperchen, auch Leukozyten genannt. Im Gegensatz zu den Lymphozyten dienen sie dem humanen Immunsystems zwar auch als zellulärer, ansonsten aber unspezifischer Abwehrmechanismus. Monozyten spielen eine Hauptrolle in der Initiierung, Aufrechterhaltung und Auflösung einer Immunantwort des menschlichen Körpers und zählen damit auch zu den wichtigsten Effektorzellen dieses komplexen Systems [150,175]. Das Schicksal der Monozyten – im Sinne von Aktivierung, Differenzierung, Migration, Ausbildung von phagozytierenden und antigenpräsentierenden Eigenschaften, sowie ihrem programmierten Zelltod – ist durch diverse Faktoren meist aus der direkten Umgebung einer Entzündungsreaktion determiniert [50].

Sowohl periphere Monozyten als auch gewebsabhängig differenzierte Makrophagen nehmen eine Schlüsselrolle bei den inflammatorischen Prozessen der unterschiedlichen, immunvermittelten Erkrankungen ein [105]: Zum Beispiel bei der rheumatoide Arthritis [36,137,198], bei rheumatologischen Systemerkrankungen wie dem Lupus Erythematodes [167], bei entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn [93] und entzündlichen Nierenerkrankungen [66,67,69,159], sowie bei der Sepsis [72].

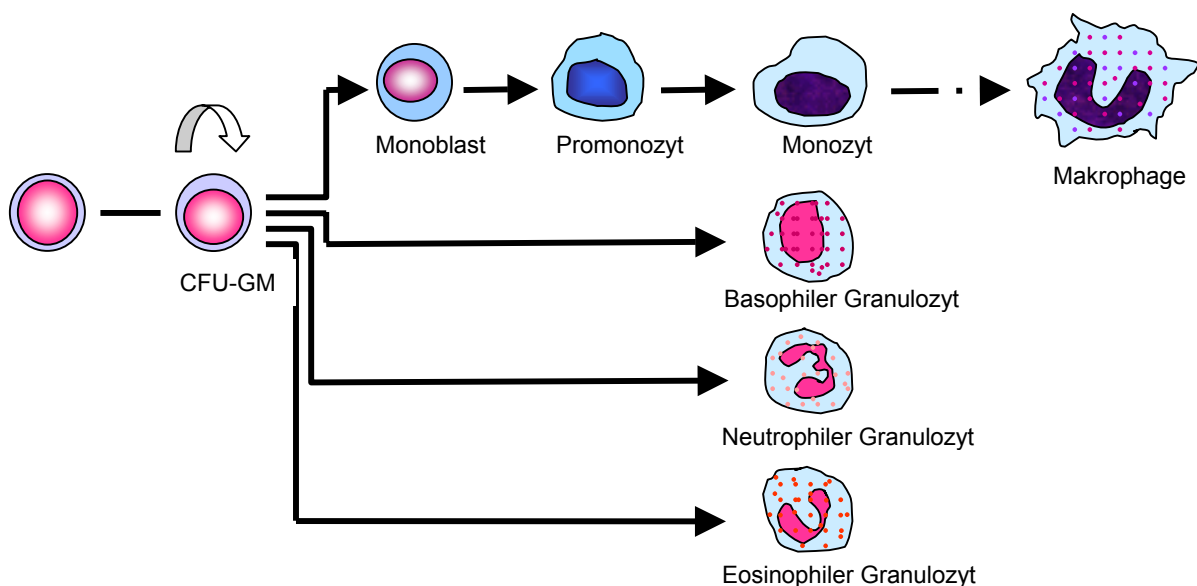
Des weiteren agieren Monozyten im Rahmen der Hämostase [15] und bei vaskulären Erkrankungen [20,103,112,116], außerdem sind sie in jeder Phase der Atherogenese präsent und werden auch bei der Entstehung von Plaques [16] nachgewiesen. Monozyten herrschen dabei nicht nur im Frühstadium einer atherosklerotischen Läsion vor, sondern sie stellen auch einen gewichtigen Faktor bei der Progression der Atherosklerose dar [10,16,19,76,80,97,114,152,163,164].

1.1.2 Monozytopoese

Monozyten stammen von pluripotenten, undifferenzierten Knochenmarkstammzellen ab. Die Monozytopoese steht unter dem Einfluss von wachstumsstimulierenden Stromafaktoren und Zytokinen und wird zum Beispiel durch CSF-GM (granulocyte-monocyte-colony-stimulating-faktor) und CSF-M (monocyte-colony-stimulating-faktor) oder SCF (stem-cell-faktor) sowie von Interleukin-3 und Interleukin-6 angeregt [18,128,129]. Monozyten wie auch Granulozyten entstehen aus einer gemeinsamen monopoetischen-granulopoetischen Vorläuferzelle, der spezifisch bezeichneten CFU-GM. Die Monozyten entwickeln sich dann im Knochenmark über ein Stadium als Monoblast und Promonozyt.

Nach ihrer Ausreifung werden sie einige Zeit im Knochenmark gespeichert und von dort ins periphere Blut ausgeschleust. Dort zirkulieren sie für etwa 8-70 Stunden im Blutsystem. In der Blutzirkulation machen Monozyten 1-12 % aller nukleären Blutzellen im Differentialblutbild aus [18,73].

Abb. 1.1 : Hämopoese mit Monozytopoese [adaptiert nach Böcker]

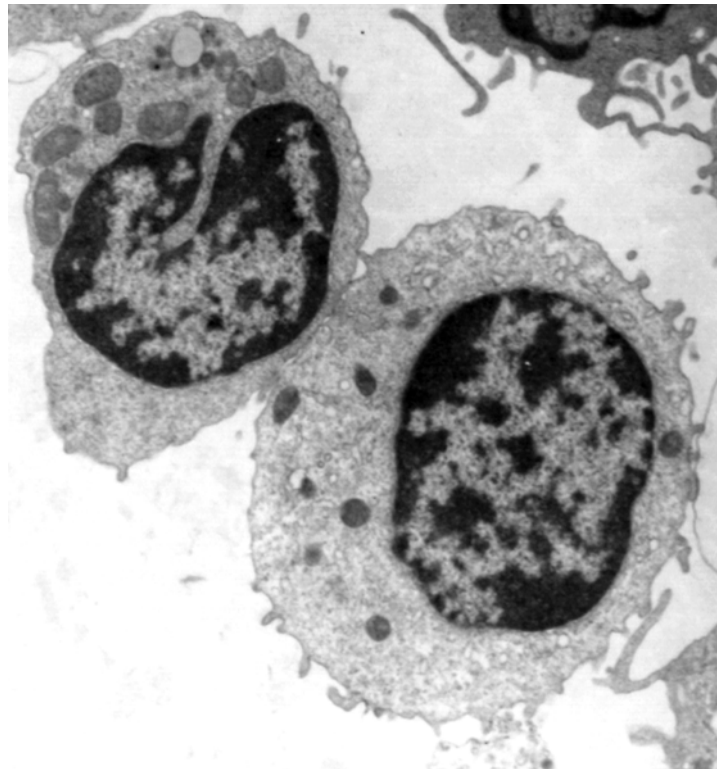


1.1.3 Morphologie der Monozyten

Monozyten können sehr variabel in ihrer Größe sein; sie sind mit einem Durchmesser von 12 – 20 µm relativ große Zellen. Sie haben einen großen ovalen bis nierenförmigen, teils gelappten Zellkern mit einem unzusammenhängenden nukleären Chromatin. Im histologischen Präparat weisen sie ein schwach basophiles Zytoplasma auf und in der elektronenmikroskopischen Darstellung findet sich neben reichlich Mitochondrien und Ribosomen, ein ausgeprägtes rauhes endoplasmatisches Retikulum sowie ein gut ausgebildeter Golgi-Apparat. Dies deutet auf ihre besondere Fähigkeit zur Synthetisierung von sekretorischen und membranösen Proteinen hin. Das Zytosol beinhaltet zahlreiche Lysosomen, Vesikel und Granula, die verschiedenartige Enzyme, wie saure Phosphatasen, saure Hydrolasen, Esterasen, Proteasen und vor allem Peroxidasen enthalten und mit phagozytiertem Material zu Phagolysosomen verschmelzen können, um zum Beispiel pathogene Mikroorganismen abzutöten und abzubauen. Neben den Granula und Lysosomen zur Phagozytose besitzen Monozyten zum anderen eine große Anzahl sekretorischer Vesikel, deren Produkte unter anderem aus Enzymen, Wachstumsfaktoren oder Zytokinen bestehen.

Abb. 1.2 :

**Elektronenmikroskopische
Abbildung von Monozyten**
(Vergrößerung 3400fach)



Monozyten exprimieren an der Oberfläche ihrer gewundenen Zellmembran Moleküle, denen unterschiedliche Funktionen zugeschrieben werden. Sie dienen als Rezeptoren für Immunglobuline, wie IgG, Komplementfaktoren, wie C3, C4 oder C5a, Thrombin oder Fibrin, Wachstumsfaktoren, wie CSF-GM oder CSF-M, Zytokine, wie verschiedene Interleukine und Interferone, und für Hormone und andere Mediatoren, wie zum Beispiel Insulin, Histamin, Transferrin, Fibronectin, Laminin, Thrombospondin, Katecholamine und Lipopolysaccharide.

Zur Differenzierung und Charakterisierung werden die Oberflächenmoleküle in einem numerischen System mit einer Zahl hinter der engl. Abkürzung CD für „cluster of differentiation“ beschrieben, z.B. „CD14“ [WHO-Standardisierungskomitee vom 6. Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens in Kobe/Japan, 1975].

Insbesondere zählen zu der großen Anzahl der Zellmembranoberflächenmoleküle der CD14-Rezeptor zur Bindung von Lipopolysacchariden, der CD36-Rezeptor als Adhäsionsstelle für Thrombospondin und Kollagen I und IV sowie der CD40-Rezeptor als Bindungsstelle für den CD40-Liganden.

Da Monozyten auch zu den antigen-präsentierenden Zellen (APC) gehören, lassen sich sowohl MHC-Klasse-1 (major histocompatibility complex), als auch MHC-Klasse-2 Oberflächenmoleküle nachweisen [18,175].

1.1.4 Mononukleäres phagozytisches System

Monozyten bilden die zelluläre Grundlage für das phylogenetisch älteste Element des Immunsystems, das heute als mononukleäres phagozytisches System (MPS) bezeichnet wird [18], welches früher auch retikuloendotheliales System (RES) genannt wurde [Aschoff, 1924]. Ein Überleben des Organismus ohne mononukleäre Zellen erscheint nicht möglich, während eine Funktionsstörung oder das Fehlen von höher entwickelten Immunzellen, wie zum Beispiel B- und T- Lymphozyten, für einen längeren Zeitraum toleriert werden kann [18].

Für wenige Stunden bis zu drei Tagen zirkulieren die Monozyten im peripheren Blut. Durch chemotaktische Reize induziert adhären sie dann an das Endothel und wandern anschließend aus den Gefäßen in verschiedene Gewebe ein; dies geschieht zum Beispiel

im Rahmen von Entzündungsreaktionen oder arteriosklerotischen Prozessen. Die nicht spezifisch ausdifferenzierten Monozyten entwickeln sich gewebeabhängig zu reifen Makrophagen und besitzen dann jeweils charakteristische morphologische und funktionelle Eigenschaften (siehe Tab. 1.1) [17].

Tab. 1.1 : Zellen des mononukleären phagozytischen System und die speziellen Charakteristika [modifiziert nach Böcker]

Bezeichnung	Funktionelle Eigenschaften und Besonderheiten
Blutmonozyten, Gewebemakrophagen	Pinozytose; Phagozytose; amöboide Bewegung auf chemotaktische Reize wie Elastin, Fibronektin, Kollagenfragmente, Peptide, Proteine von normalen und Tumorzellen; Abgabe von Enzymen wie Lysozym, Proteasen, Hydrolase, Esterasen; Abgabe von Komplementfaktoren, Gerinnungsfaktoren und Proteaseinhibitoren; Fc-Rezeptoren für IgG1, IgG3, IgG-Komplexe und IgE; Rezeptoren für Glykoproteine, Lipoproteine, Zytokine und Hormone; Antitumoreffekte; Interaktionen mit Hämatopoesezellen und Immunzellen
Alveolarmakrophagen	Zusätzlich Degradation von Surfactant; Eisen- und Staubspeicherung; Abbau von Bakterien, Erythrozyten, Zelldetritus, Proteaseinhibitoren wie α_1 -Antitrypsin und α_1 -Atichymotyrpsin
Pleuralmakrophagen	Abtöten von Tumorzellen; Phagozytose von Bakterien
Peritonealmakrophagen	Abtöten von Tumorzellen; Phagozytose von Bakterien
Histiozyten	Gewebstypische Makrophagen des lockeren Bindegewebes
Milzmakrophagen	Blutzellmauserung in der roten Pulpa; Hämosidrinspeicherung
Makrophagen des Gastrointestinaltraktes	Topographische Beziehung von Makrophagen und Epithelzellen, Kapillaren, Lymphozyten, Plasmazellen in der Lamina propria
Makrophagen	Antigenpräsentation von absorbierten Antigenen; Suppression der Immunantwort; Induktion der

der Payer-Plaques	Immuntoleranz; Vermehrung bei entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen des Darmes
Hautmakrophagen (dendritische Ausläufer der Langerhans-Zellen)	Antigenpräsentation als sogenannte immunakzessorische Zellen; Aufnahme von Antigenen im Bereich der Haut und Transport in die drainierenden Lymphknoten
Lebermakrophagen (Kupfer-Sternzellen)	Kontakt mit Endothelzellen der Sinusoide und Hepatozyten; Phagozytose von Bakterien, die vom Darm in das Pfortaderblut verschleppt werden; Einfluss auf den Stoffwechsel der Hepatozyten; Sekretion von Fibronektin, Komplementfaktoren und Apolipoprotein E
ZNS-Makrophagen (Mikroglia)	Phagozytose von abgestorbenen Nervenzellen, Zelldetritus und Fremdmaterial; Induktion der Immunantwort im ZNS; Antitumoreffekte; Modulation der neuronalen Zellfunktion
Knochenmakrophagen (Osteoklasten)	Spezialisierte multinukleäre Riesenzellen, die auf Kalzitinin reagieren und Knochensubstanz resorbieren
Granulommakrophagen	Funktionell unterschiedliche Epitheloidzellen und multinukleäre Riesenzellen vom Fremdkörper- oder Langerhans-Zelltyp; spezielle, zytokinvermittelte, monozytäre Reaktionsformen mit einer zentralen Rolle in der Granulombildung bei definierten Erkrankungen mit Phagozytose und Antigenpräsentation

Die ortständigen Gewebsmakrophagen können einige Wochen bis zu mehreren Jahren überleben. Ihr im Vergleich zu Monozyten verlängertes Überleben bewirkt die prononcierte Widerstandskraft gegenüber toxischen Stimuli [65]. Mehrere Makrophagen zusammen können sich um Ziele formieren, die z.B. aus umfangreichem oder schwerlich zu digestierenden Fremdmaterial bestehen: Dies gilt für eingedrungene Splitter, Fasern, Parasiten und Mykoplasmen. Dort können Makrophagen aggregieren und mit Lymphozyten sogenannte Granulome bilden. An derartigen Läsionen können Membranstrukturen von Makrophagen fusionieren und einen kontinuierlichen Zellwall

als Epitheloidzellen bilden oder auch insgesamt als Zellen verschmelzen und eine multinukleäre Riesenzelle formieren.

Unabhängig aber von ihrer Lokalisation oder ihrer Erscheinungsform, gehören die gewebssassoziierten Phagozyten zu einer einzigen Abstammung, zusammengefasst als mononukleäres Phagozytosesystem, und sie leiten sich allesamt von denen im Blut zirkulierenden Monozyten ab [18,150,175,187].

1.1.5 Funktionsweise der Monozyten im Immunsystem

1.1.5.1 Sekretorische Funktion der Monozyten

Monozyten und Makrophagen gehören zu den sekretorisch aktivsten Zellen des Körpers. Sie sezernieren eine enorme Vielfalt biologisch aktiver Substanzen, die meist als Antwortreaktion auf spezifische Stimuli freigesetzt werden können, allerdings findet die Freisetzung manchmal auch spontan statt. Sezerniert werden Enzyme wie Lysozym, Kollagenase und Elastase, Lipasen und Phospholipasen, Ribonukleasen, Glykosidasen, Phosphatasen und Sulfatasen, außerdem Plasminogenaktivator, Lipoproteinlipase, Arginase, Angiotensinkonvertase. Des Weiteren erfolgt die Abgabe von Prostaglandinen, Leukotrienen, plättchenaktivierender Faktor, Thromboplastin, Komplementfaktoren, Gerinnungsfaktoren, Wachstumshormonen, Plasmaproteine wie α_2 -Makroglobulin, α_1 -Antiprotease, Fibronektin, Transferrin, Apolipoprotein E und Haptoglobin. Zur breiten Palette der sezernierten Stoffe gehören vor allem auch Zytokine – wie koloniestimulierende Faktoren, Interleukine (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α) oder Interferone (IFN- α , IFN- β) – und ferner reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies – wie H_2O_2 , NO, O_2^- , OH mit zytotoxischer Wirkung.

Mithilfe dieser Produkte werden von Monozyten und Makrophagen immunologische Prozesse beeinflusst. Hierzu zählt die Abwehr eingedrungener Mikroorganismen, der Abbau von körpereigenem, geschädigtem oder gealtertem Gewebe, die Kontrolle von Zellwachstum und Zelldifferenzierung, sowie die Kontrolle der Gewebeumformung, ebenso eine tumorhemmende Wirkung. Insbesondere die Immunregulation bei akuten Entzündungen mit der Freisetzung von inflammatorischen oder antiinflammatorischen Substanzen und die Beeinflussung der lymphozytären Entzündungsantwort ist

Bestandteil der monozytären Funktion. Dabei ermöglicht es die Migrationsfähigkeit von Monozyten und Makrophagen, dass die sezernierten Produkte in alle Körperregionen transportiert und bei Bedarf gezielt und hochkonzentriert freigesetzt werden können [21,54,175,187].

Wann immer Monozyten und Makrophagen selbst spezifische Stimuli empfangen, führt dies zu intrazellulären Vorgängen, die eine Aktivierung der Zellen bewirken. Hierbei kommt es zu einer deutlichen Steigerung ihrer Metabolisierungsprozesse, ihrer Motilität, der Antigenprozessierungsaktivität und der Phagozytosefähigkeit. So haben aktivierte Makrophagen, die durch eine Zunahme des zytoplasmatischen Volumens größer als inaktivierte Monozyten sind, eine deutlich gesteigerte Sekretionsrate und sind dementsprechend wesentlich effizienter in ihrer Immunantwort.

1.1.5.2 Stimulation und Aktivierung der Monozyten

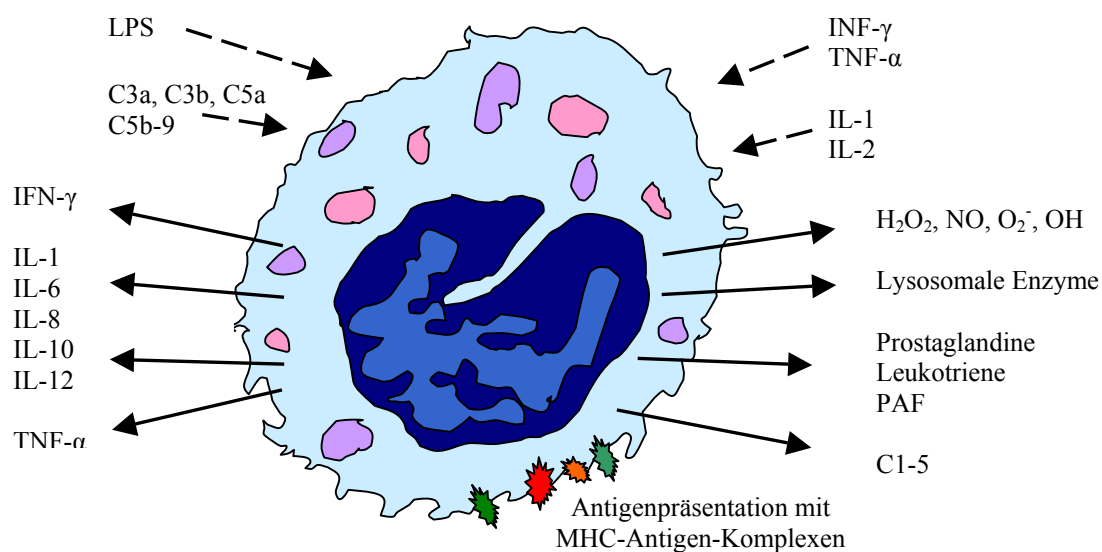
Die Notwendigkeit zur Aktivierung besteht dann, wenn zum Beispiel extra- und intrazelluläre Erreger, wie *Pneumocystis carinii* oder Listerien, Mykoplasmen und Salmonellen, oder aber virusinfizierte sowie neoplastisch transformierte Zellen zerstört werden müssen. Diese Aktivierung ist ein mehrstufiger Prozess, der zum einen aus einer antigenspezifischen Stimulation von T-Lymphozyten besteht. So senden T-Lymphozyten, denen ein Antigen präsentiert wird, Makrophagen sensibilisierende Signale aus, wozu auch die Bindung des CD40-Liganden der T-Lymphozyten an den CD40-Rezeptor der Makrophagen gehört; hierdurch wird in den Makrophagen ein Schutzmechanismus vor dem programmierten Zelltod induziert [2,142].

Zum anderen erfolgt die Präaktivierung der Makrophagen durch antigenunspezifische Lymphokine, z.B. IL-1, IL-2, TNF- α oder IFN- γ . Die vollständige Aktivierung wird dann entweder exokrin – durch die Anwesenheit von aktivierten Gerinnungsfaktoren, Lipopolysacchariden, Produkten aus dem Zerfall von Gewebe oder Komplementfaktoren, lymphokinetischem IL-1 und TNF- α – ausgelöst oder sie geschieht – IFN- γ -, TNF- α , IL-1 oder CSF-1-vermittelt – durch parakrine bzw. autokrine Vorgänge [54,175,187].

Im Speziellen erhöht sich in einem ersten Schritt der Aktivierung durch lymphokinetisches Interferon- γ , die Anzahl an TNF- α -Rezeptoren auf den

Makrophagen, so dass sich die Wirkung von Tumornekrosefaktor- α im zweiten Schritt der Aktivierung maßgeblich verstärkt [153]. Ferner können T-Helferzellen über eine Interferon- γ -Ausschüttung die Expression von MHC-Molekülen auf Makrophagen stimulieren und dadurch in einem verstärktem Maße Makrophagen ihrerseits zur Antigenpräsentation befähigen.

Abb. 1.3 : Sekretion, Stimulation, Antigenpräsentation



1.1.5.3 Monozyten als antigenpräsentierenden Zellen

Aktiviert Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle bei der adaptiven Immunantwort als antigenpräsentierende Zellen. Wie auch dendritischen Zellen und B-Lymphozyten präsentieren sie körperfremde Substanzen, so dass diese als Antigene von T-Lymphozyten erkannt werden. Dies geschieht über die Aufnahme antigenen Materials durch Endozytose und eine Zerkleinerung in immunogene Bruchstücke. Hierbei werden im Sinne der Antigenprozessierung die verbleibenden Peptidfragmente in den Phagolysosomen an MHC-Klasse-2-Moleküle gebunden und dann an der Zelloberfläche exprimiert werden. An diesen MHC-Antigen-Komplexen binden über einen direkten Zell-Zell-Kontakt T-Lymphozyten. Zusammen mit kostimulierenden Signalen der antigenpräsentierenden Zelle, wie IL-1, werden die T-Lymphozyten weiter aktiviert und

zur Differenzierung und Proliferation angeregt. Über die Bindung an die antigen-präsentierende Zelle und die Aktivierung wirken letztlich wiederum die T-Lymphozyten durch eine ihrerseitige Zytokinproduktion aktivierend auf weitere Makrophagen und rekrutieren durch die Ausschüttung von IL-2 und INF- γ weitere T-Lymphozyten [54,87,175].

1.1.5.4 Zytotoxizität der Monozyten

Die Zerstörung von Zellen durch Makrophagen kann durch antikörperabhängige Prozesse eingeleitet werden. Dabei markieren zunächst Antikörper das Pathogen. Diese Antikörper können durch die Fc-Rezeptoren der Makrophagen erkannt werden und diese Interaktion führt dann zu einer Degranulation und Ausschüttung lytischer Substanzen, die zum Beispiel den Fremdorganismus abtöten können. Durch die Beteiligung von inflammatorischen Mediatoren, wie aktive Sauerstoffmetabolite, TNF- α und IL-1 sowie proteolytisch-hydrolytische Enzyme, können lokal hochakute Entzündungserscheinungen einhergehen.

Bei antikörperunabhängigen Zytotoxizitätsreaktionen, zum Beispiel gegen neoplastisch transformierte Zellen, wird eine enge Kooperation zwischen Makrophagen und T-Lymphozyten mit der Freisetzung von Lymphokinen, wie INF- γ , beobachtet. Hierbei treten weniger stark ausgeprägte, lokale Entzündungszeichen auf. Ist hingegen ein Tumor nicht ausreichend immunogen und führt nicht zu einer Stimulation von T-Lymphozyten, lassen sich Monozyten und Makrophagen nicht unbedingt zur Tumorzytotoxizität aktivieren.

Die Zytotoxizität kann sich insgesamt gegen Parasiten, Tumorzellen, transplantierte Zellen und gegen intrazelluläre Bakterien oder virusinfizierte Zellen richten [54,187].

1.2 Apoptose

Zelltod und Regeneration gehören zu den grundlegenden Umbaumechanismen eines multizellulären Organismus und dieser natürliche Zellumsatz ist für das Überleben eine essentielle Grundlage. Neben der Analyse von Zellwachstum und Zelldifferenzierung hat sich das Interesse der weltweiten, zellbiologischen Wissenschaft auf die Erforschung des natürlichen Zelltodes konzentriert. Der Zelltod in mehrzelligen Organismen kann zufällig oder geplant auftreten und es werden zwei allgemeine Prozesse beschrieben: Die Nekrose und die Apoptose.

1.2.1 Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose

Die Nekrose findet sich bei einer irreversiblen Verletzung der Zellmembran durch Komplementfaktoren und lytische Viren oder aber bei Einwirkung von chemischen und physikalischen Traumata auf die Zelle, wie z.B. mechanischer Beschädigung, Ischämie oder Hyperthermie. Dabei kommt es zu einer frühen Schädigung der mitochondrialen Funktionen und dadurch zu einer Einschränkung des intrazellulären, oxydativen Stoffwechsels. Es resultiert durch die Abnahme der oxydativen Phosphorylierung ein Verlust energiereicher Phosphate, die der Hauptenergieträger intrazellulärer Prozesse sind. Damit verlieren die Ionenpumpen der Zellemembran ihre Funktionsfähigkeit, so dass es zu einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle kommt mit nachfolgender Aktivierung der Phospholipasen. Diese führt zu einem weiteren Integritätsverlust der Zytoplasmamembran, insbesondere der osmotische Gradient entlang der Zellmembran kann nicht mehr aufrecht erhalten werden. Die zelluläre Homöostase wird gestört, es kommt zu einem Einstrom von Wasser und Ionen in die Zelle, diese schwillt an, das Zytoplasma degeneriert und die Zellorganellen werden destruiert. Der Zellkern schrumpft und das Chromatin aggregiert, bis es schließlich zur Zerstörung der Kernmembran und Freisetzung des Chromatins inklusive dessen hydrolytischen Abbaus im Zytoplasma kommt. Schließlich rupturiert die Zytoplasmamembran, worauf der zytoplasmatische Inhalt der Zelle in das umgebende Gewebe austritt und eine inflammatorische Reaktion bewirken kann [27,195].

Die Apoptose ist hingegen ein aktiver, intrazellulär gesteuerter, energieverbrauchender Prozess, der nach einem genetisch festgelegtem Programm abläuft, daher auch programmierter Zelltod genannt wird. Dieser kann durch eine Zerstörung der DNA-Struktur initiiert werden, z.B. durch Röntgenstrahlen, ultraviolettes Licht oder chemotherapeutische Substanzen [197]. Durch Apoptose wird das Risiko einer neoplastischen Alteration verhindert, immer dann, wenn keine Reparatur der geschädigten DNA im vollem Umfang mehr möglich ist [43,117]. Apoptose von Zellen kann auch durch Glukokortikoide [162], durch die Zytokine Interleukin-4 und Interleukin-10 [105,107], sowie durch den Entzug von Wachstumsfaktoren oder energieliefernden Substraten induziert werden [47,62,105,107]. Ebenso können direkte Ligand-Rezeptor-Interaktionen, wie zum Beispiel über den CD95/FAS-Rezeptor zur Auslösung des programmierten Zelltodes führen. Dabei dockt ein Ligand an den sogenannten „Todesrezeptor“ an, so dass seine intrazelluläre Domäne eine Signalweiterleitung ins Zellinnere vermittelt [3,9,27,29,62,184,198]. Des Weiteren kann über die Inhibierung der Proteinsynthese – der Transkription durch Actinomycin D oder der Translation durch Cycloheximid – und über die Modulation mitochondrialer Prozesse [59] sowie über die Blockierung intrazellulärer, antiapoptotischer Regulationsmechanismen der Bcl-2-Proteinfamilie [1,52,79,186] der programmierte Zelltod ausgelöst werden.

Der apoptotische Zelluntergang kann morphologisch von der nekrotischen Form unterschieden werden. Als Kriterien spielen nicht nur licht- und elektronenmikroskopische, sondern in zunehmender Weise auch durchflußzytometrische Parameter eine bedeutsame Rolle [30,102]. Zunächst kommt es zu einer Abnahme des Zellvolumens und zu einer verdichteten Anhäufung der zytoplasmatischen Organellen, wobei diese strukturell intakt bleiben. Die Zellmembran erscheint mit vermehrten Ausstülpungen und Aussackungen, behält allerdings ihre Integrität und damit ihren osmotischen Gradienten weiterhin aufrecht. Das Zytoskelett wird umstrukturiert und die Zelle schrumpft weiter. Im Zellkern kondensiert das Chromatin [27]. Zusätzlich wird die DNA durch Endonukleasen an definierten Stellen zwischen den Nukleosomen als Doppelstrangbrüche gespalten, wodurch charakteristische DNA-Bruchstücke mit einer Länge von etwa 180-200 Basenpaaren oder deren Vielfachen entstehen [195]. Diese DNA-Fragmentation kann zum einen in der Gelelektrophorese als sogenannte DNA-Leiter, wie auch durch fluoreszenztechnische Anfärbung sichtbar

gemacht werden. In der Spätphase wird der Zellinhalt in membranumschlossene Vesikel, die sogenannten apoptotischen Körperchen, abgeschnürt und es treten spezifische Membranalterationen auf, die eine Erkennung und Bindung der Zellfragmente durch Makrophagen und damit eine phagozytotische Beseitigung möglich machen. Dadurch wird die Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile und eine nachfolgend ausgelöste Entzündungsreaktion verhindert [105,157].

1.2.3 Die Bedeutung der Apoptose für den Organismus

Die Apoptose spielt eine wichtige, regulative Rolle während der Embryonalentwicklung, der Entwicklung und Differenzierung des Nervensystems [123], bei vermehrt hormon- und wachstumsfaktorabhängigen Zellverbänden, wie Thymus [83], Prostata [141], Uterus [33,63], Nebennierenrinde [49], sowie bei stärker proliferierenden Geweben, wie Leberparenchym [56] oder Endothelien [154], und dient zur Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit des Immunsystems [155]. Um schädliche Immunreaktionen zu unterdrücken, werden verschiedenartige Zellen des Immunsystems, wie Thymozyten [161], autoreaktive und zytotoxische T-Lymphozyten [14,60,104,110,156,165,180], sowie Monozyten [11,105,107], durch Apoptose eliminiert, sobald deren Funktionen erfüllt sind.

Eine Fehlregulation der Apoptose wird im Bezug auf mannigfache Erkrankungen hypothetisch diskutiert. So wird auf der einen Seite eine zu hohe Apoptoserate als Ursache vermutet für die neuronale Degeneration bei der Alzheimer-Erkrankung [13], bei den autoimmunen Reaktionen bei Multipler Sklerose, bei Diabetes mellitus, bei der Hashimoto Thyreoditis [130], bei Systemischem Lupus Erythematoses [185] und nicht zuletzt bei AIDS, indem dabei die $CD4^+$ -T-Lymphozyten vorzeitig, programmiert absterben [6,48]. Auf der anderen Seite wird eine zu geringe Apoptoserate zu Grunde liegend im Rahmen der Rheumatischen Arthritis, wobei eine defekte Regulation der Apoptose von T-Lymphozyten der wesentliche Pathomechanismus zu sein scheint [122,137,198], und im Zusammenhang von vielen Krebserkrankungen [82,119], wie unter anderem und im speziellen bei Hautkrebs [127], beim Prostatakarzinom [141], beim Chorionkarzinom [63], beim Neuroblastom [85] und wie bei Leukämien und Lymphomen [75,147,158], beschrieben.

1.2.4 Intrazelluläre Signalkaskaden der Apoptose

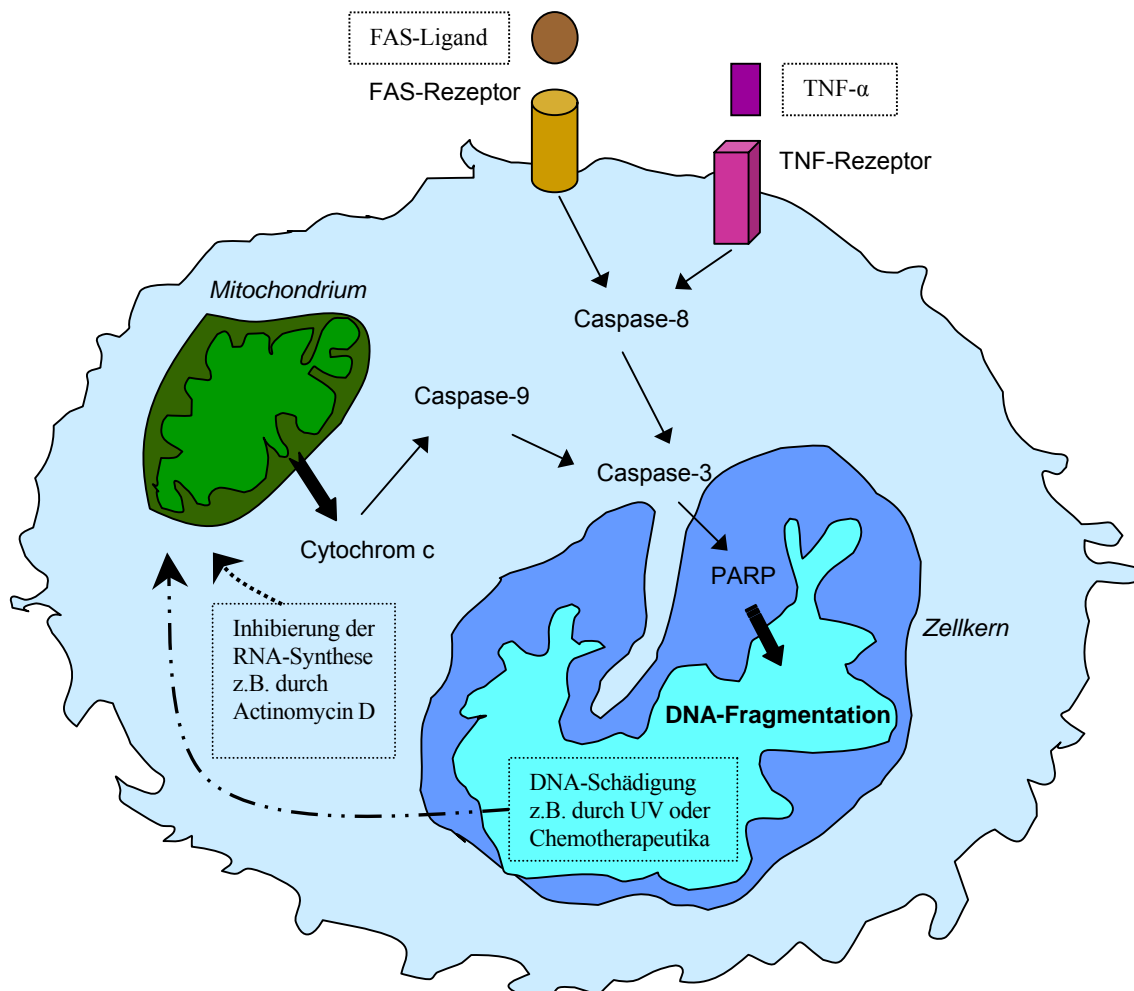
Aufgrund der Bedeutung für die Entwicklung und Homöostase eines multizellulären Organismus sind für die Apoptose spezialisierte Regulationsmechanismen innerhalb der Zellen erforderlich. Das komplexe intrazelluläre Regulationsnetzwerk bei der Auslösung des programmierten Zelltodes war und ist in den vergangenen Jahren Gegenstand intensiver Erforschung und konnte genauer charakterisiert werden.

Dabei stellt die zentrale Komponente dieser Mechanismen ein proteolytisches System dar, in dem Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen, die sogenannten Caspasen, hauptsächlich involviert sind. Diese Enzyme nehmen an einer intrazellulären Kaskade teil, die als Antwort auf proapoptische Signale ausgelöst wird und die regulative Auflösung der Zelle zur Folge hat. Inzwischen konnten mehr als 12 Mitglieder dieser Proteasen-Familie identifiziert werden, die als Initiatoren oder Effektoren verschiedene Rollen während der apoptotischen Regulationsmechanismen aber auch im Rahmen von inflammatorischen Regulationsantworten ausfüllen und sich einseitig oder wechselseitig beeinflussen können. Die Caspasen liegen zunächst im nichtaktivierten Zustand als Procaspasen vor. Nach einer proteolytischen Abspaltung von spezifischen Proteinsequenzen durch andere Proteasen oder durch Autokatalyse, ausgelöst durch die Bindung verschiedener Kofaktoren oder durch die Entfernung von Inhibitoren, entstehen dann aus den inaktiven Proenzymen die aktiven Caspasen. Diese können ihrerseits weitere Caspasen aktivieren oder auf unterschiedliche zytosolische oder nukleäre Struktur- und Regulationsproteine, die am Zusammenspiel der apoptoseinduzierenden, wie auch antiapoptischen Regulationsmechanismen beteiligt sind, einwirken [5,117,135,181,194].

Je nach dem Faktor der initialen Apoptoseinduktion werden unterschiedliche Signalkaskaden über spezifische Caspasen vermittelt. In besonderer Weise sind die Caspase-8, Caspase-9 und vor allem die Caspase-3 an gewichtigen Kardinalstellen der apoptotischen Regulationswege lokalisiert. So wird auf der einen Seite die Caspase-8 bei der rezeptorvermittelten Apoptose über die Bindung extrazellulärer apoptosefördernder Stimuli, wie die Ankopplung der Faktoren FAS-Ligand oder TNF- α an den FAS-Rezeptor oder an den TNF-Rezeptor I, in einem Komplex verbunden mit der zytoplasmatischen Domäne der Rezeptoren [9,138] aktiviert. Auf der anderen Seite

kann Caspase-9 durch extramitochondriales, zytoplasmatisches Cytochrom c in einem Komplex mit dem energiereichem Molekül dATP und dem zytoplasmatischem Adapterprotein APAF-1 aktiviert werden. Cytochrom c wird zuvor über eine Alteration der Permeabilität der Mitochondrienmembran ins Zytosol ausgeschüttet, wenn zellinterne Signale hervorgerufen durch eine DNA-Schädigung oder Störung der Proteinsynthese, z.B. ausgelöst durch UV-Strahlen oder Chemotherapeutika, einwirken oder wenn die oxydative Phosphorylierung vor allem durch das Fehlen von energiereichen Substraten gestört ist [32,59,100]. Die aktivierte Caspase-8 oder Caspase-9 kann danach über eine proteolytische Spaltung das Effektorenzym Caspase-3 zur weiteren Auslösung der Apoptose initiieren [100]. Dabei nimmt die Caspase-3 eine zentrale Rolle in der Apoptoseinduktion ein [47,162]. Sie funktioniert als Hauptstelle der zytoplasmatischen Caspase-Kaskaden und als Effektor auf intranukleäre Faktoren. So kann die Caspase-3 auf die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) [135] oder Nukleasen [99] einwirken, worüber dann eine Fragmentation der DNA bewirkt und letztendlich unwiderruflich die Apoptose eingeleitet wird .

Abb. 1.4: Vereinfachtes Schema apoptotischer Signalkaskaden mit der Involvierung von Caspasen nach verschiedenartiger Apoptoseinduktion



Weitere Schlüsselrollen in der Regulation der Apoptose nehmen Proteine der bcl-2-Familie wahr. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie sind teilweise mitochondrial und teilweise zyttoplasmatisch zu finden und können in zwei funktionelle Gruppen unterteilt werden: Die proapoptotisch wirkenden Proteine, wie bax, bak, bcl-x_S oder bad, und die Antagonisten der Apoptose, wie bcl-2, das als erstes Mitglied dieser Apoptose-regulierenden Gen- und Proteinfamilie beschrieben wurde, bcl-x_L oder mcl-1. Dabei steht die Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Signalen und die enge

Kooperation mit der Caspasen-Kaskade im Mittelpunkt, insbesondere die enge Kooperation zwischen bcl-2, Cytochrom c und der Caspase-9 [1,52,62,100,110].

Insgesamt gibt es nach heutigem Kenntnisstand eine Vielzahl von verschiedenen Komponenten intrazellulärer Signalkaskaden, die bei der Apoptoseinitiierung involviert sind und gegenseitig enge Wechselbeziehungen haben.

1.2.5 Apoptose von Monozyten

1.2.5.1 Induktoren der Apoptose von Monozyten

Die Apoptose von Monozyten ist von entscheidender Bedeutung bei diversen Beteiligungen des Immunsystems, wie beispielhaft bei Entzündungsreaktionen [105] oder atherosklerotischen Prozessen [16,80]. Dabei lässt sich der physiologische und programmierte Zelltod durch differente pro- und antiapoptotisch wirkenden Mediatoren, Stimulantien und Faktoren beeinflussen, d.h. induzieren oder inhibieren.

Bei Monozyten kann durch Serumentzug, durch Glukokortikoide, durch bakterielle Infektionen, durch eine Stimulation mit Zytokinen wie Interleukin-4 und Interleukin-10 und insbesondere durch eine Interaktion zwischen dem FAS-Liganden und dem FAS-Rezeptor Apoptose ausgelöst werden.

Im einzelnen kommt es dabei durch Interleukin-4 zu einer Inhibition der Sekretion pro-inflammatorischer und antiapoptotischer Zytokine, wie IL-1 und TNF- α , zu einer Herunterregulation von CD14 und zu einem intrazellulären Signaltransduktionsweg inklusive der mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom c und einer resultierenden Aktivierung der Caspase-9 und der Effektorcaspase-3 [58,64,65,68,96,105,106,178].

Hingegen verläuft die durch Interleukin-10 induzierte Apoptose über eine CD95/FAS-abhängigen Signalkaskade mit der Involvierung der Caspase-8 [100]. Insgesamt werden diese Zytokine vor allem von T-Lymphozyten ausgeschüttet [105]. Die Auslösung der monozytären Apoptose geschieht aber nicht nur, indem regulatorische Zytokine einwirken, sondern auch durch Glukokortikoide. Diese führen einerseits zu einer Interaktion von FAS-Liganden (CD95L) mit den entsprechenden CD95/FAS-Membranrezeptoren über Zell-Zell-Kontakte oder über das von Monozyten autokrin nach einer

Steroidbehandlung extrazellulär sezernierte CD95L. Nachfolgend wird darüber die CD95-abhängige Signalkaskade mit der Aktivierung von Caspase-3 ausgelöst. Andererseits werden auch die proinflammatorischen und antiapoptotischen Zytokine IL-1 β und TNF- α vermindert freigesetzt [162].

Weiterhin wird der programmierte Zelltod von Monozyten beim Fehlen energiereicher Substrate wie unter serumfreien Bedingungen beobachtet. Dabei wird eine Aktivitätssteigerung der Caspase-3 wie auch eine Herunterregulation des antiapoptotisch wirkenden Hitze-Schock-Proteins hsp70 gesehen [47,95].

Auch unterschiedliche Bakterienspezies, wie Staphylokokkus aureus, Escheria coli, Pseudomonas aeruginosa oder Salmonella enteritidis können in bestimmten Dosierungen zu einer Apoptoseinduktion führen [11,50,58,61]. So wird bei einer Inkubation von Monozyten mit Staphylokokkus aureus über eine Ausschüttung von FAS-Liganden, nach der erfolgten intrazellulären Aufnahme der Bakterien, und über eine vermehrte Expression von FAS-Rezeptoren, eine gesteigerte Aktivierung der Caspase-8 und Caspase-3 gemessen [12].

Die Interaktion von FAS-Liganden mit FAS-Rezeptoren auf der Zellmembran der Monozyten ist von besonderer Bedeutung. Hierbei kann eine apoptosestimulierende Wirkung autokrin wie parakrin erfolgen. Ebenso führt sowohl der direkte Zellkontakt mit T-Lymphozyten, die CD95L vermehrt an ihrer Zelloberfläche exprimieren, als auch freies CD95L zu einer Induktion der monozytären Apoptose [58]. Der FAS-Ligand bindet extrazellulär an den FAS-Rezeptor und induziert intrazellulär zunächst die Rekrutierung eines FAS-assoziierten Proteins und der Procaspase-8. Dabei kommt es über eine proteolytischen Spaltung zur aktiven Form der Caspase-8 und im weiteren zur Initiierung der speziellen Signalkaskade mit einer Aktivierung der Caspase-3, die dann letztendlich intranukleäre Enzyme zur DNA-Fragmentation und damit zur Einleitung der monozytären Apoptose induziert [86,138,184].

Monozyten sind aber auch selber beteiligt als Induktoren spontaner oder aktivierter Apoptose zum Beispiel bei T-Lymphozyten [58].

1.2.5.2 Inhibitoren der Apoptose von Monozyten

Es sind Faktoren bekannt, die eine Inhibition der monozytären Apoptose bewirken können. Hierzu gehören, neben den Interleukin-1 β oder Interleukin-2, die proinflammatorisch wirkenden und eine Differenzierung herbeiführenden Mediatoren TNF- α und INF- γ [58,107,108,138]. So führte eine Behandlung von Monozyten mit therapeutischen Gaben eines blockierenden Antikörper gegen TNF, zu einer über die Signalkaskaden der Caspase-8, Caspase-9 und Caspase-3 vermittelten Apoptoseauslösung [100].

Auch können Lipopolysaccharide (LPS), Zellwandkomponenten gramnegativer Bakterien, die potente Induktoren für die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α und IL-1 β sind, über eine Bindung an den CD14-Rezeptor von Monozyten zum Schutz vor Apoptose führen [47,58,65,68,138]. Diesbezüglich konnte bei proapoptotisch, mit CD95L stimulierten Monozyten eine Suppression der Apoptose mit LPS oder TNF- α festgestellt werden, indem die Hochregulation eines inhibitorischen Proteins, das die intrazelluläre Membrananbindung von Procaspase-8 an die zytoplasmatische Domäne des CD95/FAS-Rezeptors unterbindet, gemessen wurde [138].

In Bezug auf den CD14-Rezeptor bewirkt die Stimulation von Monozyten mit LPS eine verstärkte Expression dieses Membranmoleküls und gleichzeitig eine Protektion vor Apoptose. Hingegen geht eine verminderte CD14-Membranexpression, zum Beispiel durch die Modulation mit Interleukin-4, mit einer erhöhten Apoptoserate einher [65,68,96,159].

Bei einer Infektion von Monozyten mit niedrigen Dosierungen des intrazellulär, erscheinenden Bakterium Mykobakterium tuberculosis konnte ebenfalls über eine Freisetzung von Interleukin-1 β und TNF- α eine Unterdrückung monozytärer Apoptose gezeigt werden [50,58,140]. Auch führte eine Infektion von Monozyten mit Chlamydia pneumoniae zu einer Inhibierung vor Apoptose [55].

Ferner kann eine über den CD95/FAS-Rezeptor vermittelte Apoptose durch die Stimulation von Monozyten mit Wachstumshormonen, wie Interleukin-3, GM-CSF oder M-CSF, unterdrückt werden, indem die Expression des antiapoptotischen Proteins bcl-2 erhöht und darüber die Aktivierung der Caspase-3 unterdrückt wird [62,105].

Schließlich ist der Plättchenfaktor 4 ein weiterer Stimulans, der nicht nur bei der Differenzierung von Monozyten eine Rolle spielt, sondern auch als Schutzfaktor vor einer durch Serumentzug ausgelösten Apoptose in Erscheinung tritt [50,160].

1.3 Phagozytose

Die Phagozytose ist die originärste Form der Elimination körperfremden und körpereigenen Materials aus einem multizellulären Organismus und dient zur Vernichtung von eingedrungenen Mikroorganismen (Bakterien, Pilze oder Parasiten) und von Fremdpartikeln bzw. auch zur Beseitigung von Immunkomplexen sowie geschädigter oder gealterter Zellen. Durch eine Aufnahme des Materials in das Zellinnere kann eine Abtötung durch mikrobizide Substanzen und letztlich eine Verdauung eingeleitet werden. Die Fähigkeit zur Phagozytose ist bei neutrophilen Granulozyten sowie besonders bei Monozyten oder Makrophagen ausgebildet, so dass diese Zellen oft auch als Phagozyten bezeichnet werden. Sie sind daher die wichtigsten Bestandteile der unspezifischen, angeboren, zellulären Immunabwehr [54,94,150].

1.3.1 Rezeptoren und Adhärenz

Zunächst ist die Voraussetzung für die Phagozytose eine Erkennung und Bindung des Materials durch Monozyten und Makrophagen. Diese kann zum einen indirekt über die Opsonisierung, d.h. Kenntlichmachung, zum Beispiel des Erregers, mit Hilfe spezifischer Opsonine, wie Antikörper, vor allem der IgM- und IgG-Klassen, und Komplementfaktoren, insbesondere C3b und iC3b, erfolgen. Dabei interagiert IgG mit der F(ab')₂-Domaine mit dem zu bedeckendem Partikel und die freie Fc-Domaine kann dann durch Fc γ -Rezeptoren entdeckt werden. Dazu sind auf der Zelloberfläche von Monozyten und Makrophagen drei Subklassen von Fc γ -Rezeptoren, die sich in ihrer Struktur und Affinität zu IgG unterscheiden, lokalisiert. Für die Interaktion mit den opsonisierenden Komplementfragmenten C3b und iC3b ist der Komplementrezeptor CR3, auch als CD11b/CD18 definiert und zur Familie der Membranintegrine gezählt, reichlich vorhanden.

Des Weiteren stehen Phagozytose-kompetente Rezeptoren für Fibronektine und Vitronektine zur Verfügung, die ebenfalls aus der genetischen Superfamilie der Integrine stammen [94]. Durch die vorausgegangene Immunisierung kann dann ein fremder Mikroorganismus eingefangen und beseitigt werden [54].

Zum anderen gibt es auf der Membranoberfläche von Monozyten und Makrophagen eine Vielzahl von gut charakterisierten Rezeptoren, die eine direkte Erkennung über die Bindung integraler Oberflächenkomponenten des zu phagozytierenden Materials ermöglichen. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem Mannose- und β -Glukan-Rezeptoren, antigene Oberflächenmoleküle, wie Glykoproteine und CD14, CD36, CD68 und der Scavenger-Rezeptor der Klasse I, die polyanionische Komplexe, wie Lipopolysaccharide der bakteriellen Zellmembran, sowie apoptotische Zellen binden können [65,94,157].

Da aus absterbenden Zellen reaktive Agenzien und schädigende Enzyme hervorgehen können, ist die Elimination dieser Zellen durch Monozyten und Makrophagen von besonderer Bedeutung, um destruktive Einflüsse und inflammatorische Reaktionen im umliegenden Gewebe zu vermeiden.

Speziell wird bei apoptotischen Zellen eine Änderung der Anordnung von Membranzmolekülen unter anderem mit einer Lokalisation von Phosphatidylserine an der extrazellulären Seite der Plasmamembran beobachtet [94]. Zu den Rezeptoren auf Monozyten und Makrophagen, die zu einer Erkennung von Phosphatidylserine fähig sind, zählen der oxidiertes LDL bindende Rezeptor CD68, Annexine, die als Proteingruppe Phospholipide in der Anwesenheit von Ca^{2+} binden können, Scavenger-Rezeptoren der Klasse II, wie CD36 und ein noch nicht identifizierter Phosphatidylserin-Rezeptor, der auf stimulierten Makrophagen blockiert werden kann [45].

Ferner ist bei der Adhärenz von apoptotischen Zellen eine Einbeziehung von Thrombospondin, einem Brückenmolekül, das zwischen Oberflächenstrukturen der zugrundegehenden Zellen und dem CD36-Rezeptor oder dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor kooperativ bindet, erforderlich [157,177].

Insgesamt können über die Einbeziehung der beschriebenen Rezeptoren alternde Granulozyten, Thymozyten, Erythrozyten und Thrombozyten adhärirt und phagozytiert werden [22,23,26,42,50,67,156,174].

1.3.2 Signaltransduktionen während der Phagozytose

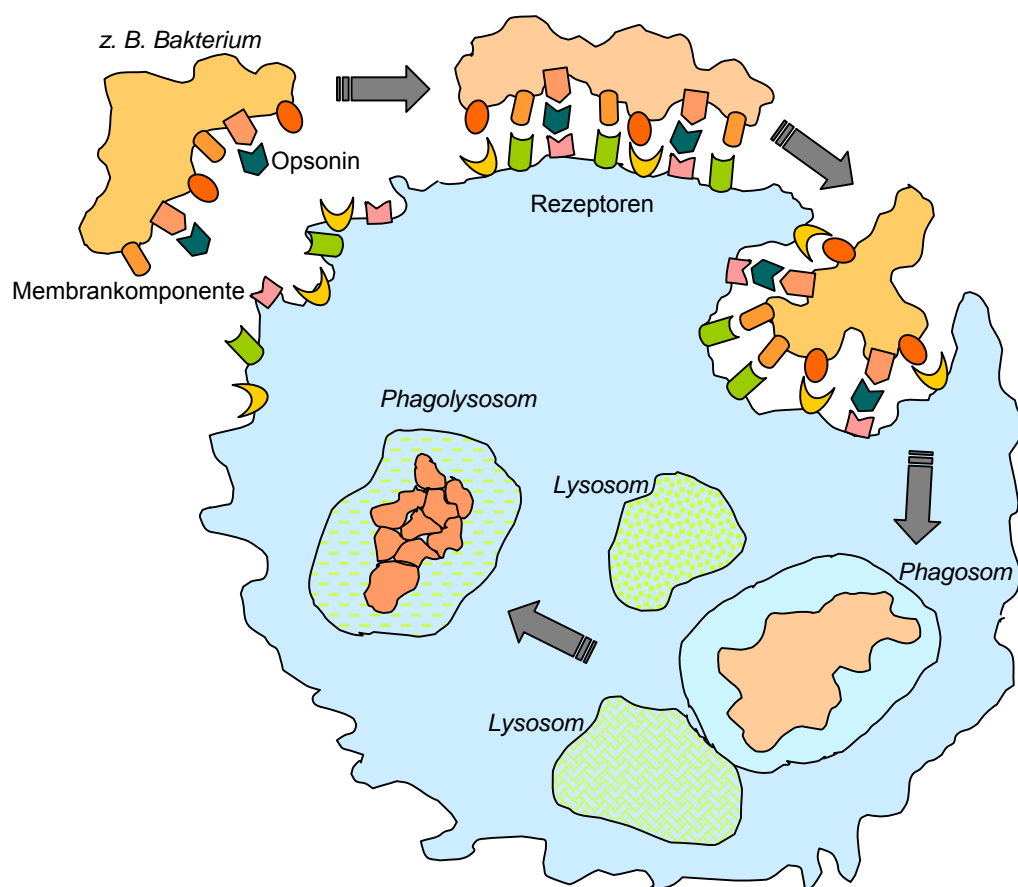
Unabhängig von der Art des einbezogenen Rezeptors, wird nach der erfolgten Anbindung des zu phagozytierenden Materials eine Zusammendrängung von Rezeptoren nachgewiesen, die danach zu einer Aktivierung von Protein-Tyrosin-Kinasen und Serine/Treonine-Kinasen C mit einer anschließenden enzymatischen Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen, einschließlich der Rezeptoren, führt. In der Folge werden dann intrazelluläre sowie membranständige Signaltransduktionswege generiert. Dabei sind monomerische GTPasen in Kooperationen mit Phosphatidylinositol-Kinasen involviert. Über eine Modulation des submembranösen Aktin-Filament-Systems kommt es zu einer Umorganisation des auf Aktin basierenden Zytoskeletts und dies führt letztendlich zu einer Internalisierung des zu phagozytierenden Materials [94].

1.3.3 Intrazelluläre Prozessierung und Verdauung

Nach der Erkennung und Bindung des Materials, z.B. ein Pathogen, wird so durch eine Einstülpung des betroffenen Zellmembranbereiches eine digestive Tasche, die sich von der Zelloberfläche ablöst und einen membranbegrenzten Hohlraum bildet, ein sogenanntes Phagosom, intrazellulär abgeschnürt. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als endozytotische Invagination. Im Zellinneren verschmelzen diese Phagosomen mit Lysosomen, den zytoplasmatischen Granula, zu Phagolysosomen. Darin sorgen nach der Fusion ein niedriger pH, reaktive Metabolite und ingestierende Enzyme, wie Hydrolasen, Kollagenasen, Elastasen, oder Hyaluronidasen, für das Abtöten der Mikroorganismen und den Abbau der internalisierten Substanz. Hierbei sind sauerstoffabhängige, stickstoffabhängige und lysosomenabhängige Mechanismen miteinander verzahnt. Die bedeutsamsten Bakterizide, wie O_2 , O_2^- , O^- und H_2O_2 sowie HOCL, werden durch ein H_2O_2 -Halogen-Peroxidase-System mit Hilfe einer membranständigen NADPH-Oxidase und einer Superoxiddismutase sowie Myeloperoxidase gebildet. Da diese Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite auch das eigene Gewebe schädigen kann, werden diese Metabolite in einem kontrollierten Abbau durch Katalasen und Glutathionperoxidasen kontrolliert abgebaut. Ebenso werden reaktive Stickstoff-

metabolite an der intrazellulären Keimabtötung, wie NO^- aus L-Arginin abstammend, beteiligt. Phagozyten sind weiterhin reich an intrazellulären Granula, die zahlreiche Enzyme enthalten. In den primären, auch azurophile genannten, Granula finden sich diverse saure Hydrolasen, die zu einer Auftrennung von Makromolekülen wie Kohlenhydrate, Fette, Proteine und Nukleinsäuren fähig sind, neutrale Proteasen, wie Kathepsin G, Lysozym und kationische Proteine, während in den sekundären oder spezifischen Granula Lysozym, welches die bakteriellen Zellwände durch Spaltung der Bindung zwischen Acetylmuramylsäuren und N-Acetylglucosamin aufbricht, und das eisenbindende Protein Laktoferin vorliegen. Diese lysosomalen Enzyme haben vor allem Bedeutung beim Abbau der internalisierter Substanzen. Nach der erfolgten antimikrobiellen Aktivität und der Verdauung werden schließlich Abbauprodukte aus der Zelle in den Extrazellularraum ausgeschieden [18,54,150].

Abb. 1.5 : Schematische Darstellung der Phagozytose



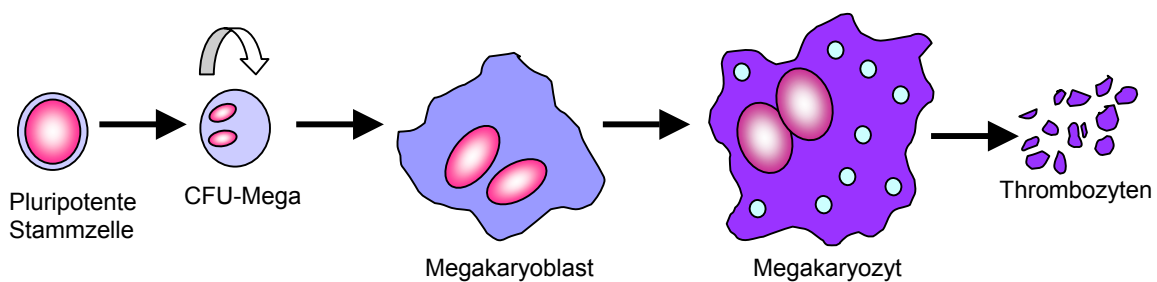
1.4 Thrombozyten

Thrombozyten, die auch als Blutplättchen bezeichnet werden, spielen eine zentrale Rolle während der Hämostase. Sie sind an inflammatorischen Reaktionen und letztlich auch an der Wundheilung beteiligt. Im Rahmen all dieser unterschiedlichen Prozesse interagieren Thrombozyten mit dem Gerinnungssystem, dem fibrinolytischen System, mit Endothelien und mit Leukozyten. So sind die verschiedenartigen Funktionsweisen und Interaktionen von Thrombozyten Gegenstand intensiver Forschung, vor allem auf dem Gebiet vaskulärer Fehlfunktionen und Erkrankungen, wie der Atherosklerose und Thrombose, aber auch bezüglich akuter und chronischer Entzündungen [15,19,54,76].

1.4.2 Thrombopoese

Thrombozyten entstammen während der Thrombopoese aus den größten (15-85 μm) und morphologisch variabelsten Knochenmarkszellen, den Megakaryozyten. Diese werden durch eine Kernteilung ohne Zytoplasmateilung aus Megakaryoblasten gebildet, welche sich unter dem Einfluss von Interleukin-3 und GM-CSF über verschiedene Vorläuferzellen im Knochenmark aus der pluripotenten Stammzelle entwickeln. Die Zellkerne der Megakaryozyten sind stark gelappt, das Zytoplasma hat ein großes Volumen und enthält mit zunehmender Reifung zahlreiche azurophile Granula. Durch eine Abspaltung von Zytoplasmafragmenten resultieren letztlich die Thrombozyten. Sie weisen daher keinen Zellkern auf und sind dadurch auch nur zu einer eingeschränkten Synthese von Proteinen fähig.

Abb. 1.6 : Thrombopoese [adaptiert nach Böcker]



Bei einer tägliche Erneuerungsrate von etwa 20 Prozent der Gesamtblutplättchenzahl beträgt die Lebenszeit der Thrombozyten rechnerisch ungefähr 7-11 Tage; dann werden die gealterten Zellen hauptsächlich im retikuloendothelialen System der Leber und Milz durch Phagozytose abgebaut. Die Bildung sowie der Abbau stehen in einem physiologischen Gleichgewicht, so dass die Zellzahl im Blut ungefähr $150-440 \times 10^3/\mu\text{l}$ beträgt [18,73].

1.4.3 Morphologie der Thrombozyten

Die Blutplättchen sind die kleinsten, korpuskulären Bestandteile des zirkulierenden Blutes mit einer Größe von 2 – 5 μm bei einem Durchmesser von 0,2 – 2 μm . Im unstimulierten Zustand zirkulieren die Thrombozyten mit einer typischen diskoiden Form und ohne die Ausbildung von Pseudopodien im Blut.

Die Zytoplasmamembran ist extrazellulär von einer Glykokalix überzogen, die aus verschiedensten Glykoproteinen und Mukopolysacchariden besteht. Die Zellmembran enthält im ruhenden Zustand Einstülpungen in das Plättcheninnere und weist eine Vielzahl von integrierten Proteinen auf, die Rezeptoren für verschiedenartige lösliche Agonisten und Adhäsionsproteine darstellen.

Von dieser Oberfläche entwickelt sich ein submembranös gelegenes Mikrotubulisystem, das die diskoiden Form der unaktivierten Thrombozyten aufrecht hält und an der Ausbildung der Formveränderung des aktivierten Plättchens beteiligt ist. Weiterhin liegt ein intrazellulär dichtes, tubuläres Membransystem vor, das aus einem offenen, kanalikulären System und aus einem geschlossenen, tubulären System besteht. Im offenem Kanalsystem existieren Verbindungen zur Plasmamembran und über Porenöffnungen in den Extrazellularraum. Das geschlossene, kanalikuläre System, das ein Abkömmling des rauhen, endoplasmatischen Retikulums des Megakaryozyten ist, dient als Hauptspeicherort von freien Kalziumionen, welche große Bedeutung in der Regulation des Plättchenmetabolismus und der Aktivierung haben. Die tubulären Membrankanalsysteme sind reich an Enzymen des Arachidonsäurestoffwechsels und können unter anderem Prostaglandine und Thromboxan A_2 sezernieren.

Neben weiteren typischen, zytoplasmatischen Elementen wie Mitochondrien oder Glykogenspeicher besitzen Thrombozyten charakteristische, membranbegrenzte

Organellen: Die Granula, die als Speicherorte für Proteine und andere Substanzen dienen. Es gibt drei verschiedene Formen dieser Speichergranula:

Die dichten Granula, auch als dense-bodies definiert, die Lysosomen und die α -Granula.

Die dichten Granula, namensgebend ist die elektronenoptische Dichte, enthalten eine Reihe von niedermolekularen Verbindungen, die den Aggregationsvorgang fördern, wie Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Serotonin und Kalziumionen.

Die lysosomalen Granula ähneln den Lysosomen anderer Zellen und besitzen hydrolytische Enzyme, wie Elastasen, Kollagenasen oder Kathepsin.

Die α -Granula sind zahlenmäßig am häufigsten vorhanden und beinhalten adhäsive Protein, wie Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, von-Willebrand-Faktor, Thrombospondin oder Glykoprotein IIb-IIIa, zytokinähnliche Proteine, wie β -Thromboglobulin und Plättchenfaktor 4, Wachstumsfaktoren, wie unter anderem ein epidermal, endothelialer oder der aus Plättchen stammende Wachstumsfaktor „platelet-derived-growth-factor“ (PDGF), Koagulationsfaktoren, wie die Gerinnungsfaktoren Fibrinogen, Faktor V und Faktor XI oder die fibrinolytisch wirkenden Protein S und Plasminogen, und nicht zuletzt Enzyme, wie α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin, α_2 -Antiplasmin oder der C1-Esterase-Inhibitor. Dabei sind all diese Agenzien an Prozessen der Adhäsion, Aggregation, Koagulation, Chemotaxis, Proliferation sowie Inflammation beteiligt. Thrombozyten sind außerdem in der Lage auch Moleküle des Blutplasmas, zum Beispiel Immunglobuline und Albumin, durch Endozytose über Transportvesikel in die α -Granula aufzunehmen [18,53,91,120].

1.4.3 Rezeptoren und Aktivierung

Thrombozyten haben an ihrer Oberfläche differente Membranrezeptoren lokalisiert, die im Rahmen der Plättchenaktivierung in Kontakt mit ihren physiologischen Agonisten treten können. Die Thrombozytenmembran weist aktivierende Rezeptoren für ADP, Thrombin und Thromboxan- A_2 , den Platelet-activating-factor-Rezeptor, einen Rezeptor für Serotonin sowie einen für Vasopressin, einen α -adrenergen-Rezeptor auf. Aber auch verschiedene Kollagenrezeptoren und inhibierende Rezeptoren bezüglich der Aktivierung, wie ein Adenosinrezeptor, ein Prostazyklinrezeptor und ein β -adrenerger-Rezeptor, sind nachzuweisen.

Dabei führt die Interaktion der spezifischen Bindungsstellen mit Aktivatoren, wie zum Beispiel ADP, Thrombin und Thromboxan-A₂, oder mit Proteinen der extrazellulären Matrix, wie Kollagen, Thrombospondin, Laminin und Fibronectin, oder durch physikalischen Scherstress über Signaltransduktionswege zur Bildung von Signalfaktoren, die wiederum weitere Metabolismen der Aktivierung in den Thrombozyten bewirken.

Im Detail spielen insbesondere die drei Enzymkomplexe mit der Beteiligung der Phospholipase C, der Phospholipase A₂ und der Adenylatzyklase eine wesentliche Rolle bei den intrazellulären, aktivierenden sowie inhibierenden Botenstoffmechanismen. Über Second Messenger ist jedes dieser Enzyme an der Regulation des zytoplasmatischen Ca²⁺-Spiegels beteiligt, indem beispielsweise Ca²⁺-Ionen aus dem dichten tubulären System freigesetzt werden. Diesbezüglich ist die Konzentration von freien Ca²⁺-Ionen abhängig von der Stimulationsart. Wenn nun der Ca²⁺-Spiegel im Zytosol der Blutplättchen eine gewisse Schwelle nach erfolgter Aktivierung übersteigt, wird ein Formwandel über eine Umorganisation des kontraktiven Zytoskeletts durch strukturelle Veränderungen innerhalb der Mikrotubuli erreicht. Hierbei kommt es zu einer sphärischen Form der Thrombozyten mit einer Ausbildung von sogenannten Pseudopodien.

Des Weiteren kann nach der Plättchenaktivierung eine Degranulation auftreten. Dabei verschmelzen α -Granula und dichte Granula mit der Zellmembran im Prozess einer Exozytose und sezernieren so die Granulainhaltsstoffe, wie adhäsive oder zytokinähnliche Substanzen, ADP oder Ca²⁺-Ionen, die wieder auf andere Thrombozyten in der Umgebung einwirken und zu einer Aktivierung führen und eine Aggregation fördern können [53,120].

Zusätzlich werden Glykoproteine, wie P-Selektin, auch als CD62P benannt, aus der α -Granulamembran in die Zytoplasmamembran integriert. Dementsprechend kann die Expressionskonzentration von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche als Marker der vorausgegangenen Aktivierung dienen [120]. P-Selektin stellt vor allem aber ein Adhäsionsmolekül dar, das besonders als Bindungsstelle von stimulierten Thrombozyten an Endothelien und Leukozyten wirkt [121,171,172].

Es sind zahlreiche, weitere Plättchenmembranglykoproteinrezeptoren bekannt, die an der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten beteiligt sind. So wird der für die Plättchenaggregation essentielle Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa (CD41) ebenfalls durch die Aktivierung und die nachfolgende Verschmelzung von Membranen der α -Granula mit der Zytoplasmamembran vermehrt an der Oberflächenmembran exprimiert. Dabei durchläuft nach der Stimulation das GP IIb/IIIa (CD41) eine Konformitätsänderung, um Adhäsivproteine, wie Fibrinogen oder Thrombospondin, irreversibel zu binden und darüber Adhäsionen auszulösen und Aggregate zu bilden. Insbesondere ist dieser Glykoproteinkomplex bei der Adhäsion von aktivierten Thrombozyten an Leukozyten beteiligt [53,172].

Weiterhin konnte nach einer Stimulation und Aktivierung von Thrombozyten ein membrangebundener Proteinkomplex, der verwandt mit dem Tumornekrosefaktor-Aktivatorprotein erscheint (TRAP), als CD154 klassifiziert wird, auf der Zytoplasmamembran entdeckt werden. Dieser kann unter anderem mit dem CD40-Rezeptor auf Endothelzellen interagieren und darüber eine Entzündungsreaktion initiieren. So wird dieses spezifische Membranoberflächenmolekül auch als CD40-Ligand bezeichnet. Auch exprimieren Thrombozyten selber konstant und stimulationsunabhängig CD40-Rezeptoren [71].

Weitere Rezeptoren der Thrombozytenmembran, involviert in die Mechanismen der Adhäsion und Aggregation, sind die zu der Integrin-Proteinfamilie gehörenden Membrankomplexe $\alpha_2\beta_1$ (GP Ia/IIa), $\alpha_5\beta_1$ (GP Ic/IIa), oder $\alpha_v\beta_3$ und die leucinreichen Glykoproteine GP IX (CD42a), GPIa (CD49b), GP I α (CD42b), GPI β (CD42c), GPV (CD42d) und GP IV (CD36), die in unterschiedlicher Art und Weise spezifisch und teils unspezifisch Kollagen, Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Thrombospondin oder den von-Willebrand-Faktor als Liganden binden können [54,84,120].

1.5 Monozyten und Thrombozyten

Bei immunologischen Abwehrreaktionen und bei hämostasiologischen Vorgängen kommunizieren Monozyten und Thrombozyten physiologisch über komplexe Interaktionen miteinander und beeinflussen sich in ihren Aktivitätszuständen und Funktionsweisen gegenseitig.

Die hochreagiblen Thrombozyten werden bei Entzündungsreaktionen initial durch exogene Stimuli aktiviert und können über adhäsive und aggregierende Mechanismen chemotaktische Signale aussenden, die zu einer anschließenden Migration und Aktivierung von Monozyten führt. Auch die aggregatbildenden Faktoren stellen in unterschiedlicher Art und Weise Mediatoren dar, die zu einer Initiierung inflammatorischer Reaktionen beitragen. So werden präformierte Substanzen mit Entzündungspotential wie Fibronectin, Thrombospondin, Plasminogen, TGF- α und TGF- β aus den α -Granula und zum Beispiel Serotonin oder ATP und Calcium aus den dichteren Granula sowie Thromboxan A₂ von den Thrombozyten sezerniert und neben der Entzündungsauslösung auch die weitere Aggregation induziert. Umgekehrt bewirken stimulierte Monozyten in einer Art Rückkopplungsmechanismus eine Auflösung der Thrombozytenaggregate [54]. Im Rahmen der Adhäsion von aktivierten Thrombozyten an Monozyten sind vor allem thrombozytäre Glykoproteinkomplexe IIb/IIIa (CD41a) und CD62-Rezeptoren (P-Selektin) beteiligt. Insbesondere reagieren thrombozytäre CD62P-Rezeptoren Ca²⁺-abhängig mit monozytären P-Selektin-Glykoprotein-Liganden-1 [19,149,171,172]. Weiterhin sind aber auch mannigfache Membranintegrine der Monozyten und insbesondere der CD36-Rezeptor, der über Thrombospondin eine Kooperationsbrücke mit Thrombozyten bilden kann, an den interzellulären Wechselwirkungen teilhabend [164]. Mit Hilfe der direkten wie indirekten Zell-Zell-Anheftungsstellen ist auch über die Membran-Zwischenräume ein gegenseitige Kommunikation durch lösliche Mediatoren möglich [171]. Bei der Interaktion über Adhäsionsmoleküle oder über Mediatoren liegt meistens einer der interagieren Partner aktiviert vor. So adhären durch Thrombin stimulierte im Gegensatz zu unaktivierten Thrombozyten in deutlich größerem Umfang an Monozyten [148].

Bei pathophysiologischen Prozessen, z.B. die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen oder bei akuten inflammatorischen Situationen sind heterozelluläre Mechanismen beteiligt, die unter anderem Thrombozyten und Monozyten beinhalten. Hierbei können sich Thrombozyten und Monozyten sowohl über direkten Zell-Zell-Kontakt als auch über die Sezernierung von Mediatoren gegenseitig beeinflussen. So führt die Anbindung von aktivierten Thrombozyten an Leukozyten zu einer Freisetzung von IL-1 β , IL-6, IL-8 oder TNF- α . Dabei repräsentieren diese Zytokine die Gruppe der Hauptregulatoren der lokalen bzw. auch systemischen Entzündungsantworten. Beispielsweise ist im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes die Adhäsion von Thrombozyten an Leukozyten in die Entwicklung von inflammatorischen Reaktionen nach dem Infarkt involviert [125]. Ferner kann die Aktivierung von Monozyten zu prokoagulatorischen und proadhäsiven Reaktionen führen und eine Hauptrolle bei thrombotischen Komplikationen nach koronaren Interventionen einnehmen. Ebenso sind aktivierte Monozyten nicht nur bei der Pathogenese der thrombotischen Läsionen beteiligt, indem prokoagulatorische und aber auch antikoagulatorische Moleküle produziert werden, sondern sie schütten selbst vielfältige Promotoren akuter Entzündungsreaktionen, wie Arachidonsäurederivate, Leukotriene, proteolytische Enzyme wie Cathepsin G oder Sauerstoffradikale aus [39,112]. Diese Abbau-Enzyme sowie die Oxidantien können im weiteren das Endothel derart schädigen, dass sie eine entscheidende Voraussetzung für die Bildung von Läsionen bei der arteriosklerotischen Erkrankung darstellen [109]. Bei den proinflammatorischen Interaktionen zwischen Thrombozyten und Monozyten als Komponenten der Hämostase wird unter anderem über einen direkten Zellkontakt über den thrombozytären CD40-Liganden sowie den monozytären CD40-Rezeptor die Chemotaxis, Aktivierung und Expression des Gewebefaktors der Monozyten bewirkt [15,71,126]. Weiterhin können Thrombozyten über den CD40-Liganden oder die Ausschüttung zytokinähnlicher Substanzen auf das Endothel und auf glatte Muskelzellen einwirken. Dort können sie nachfolgend eine Sekretion chemotaktischer Substanzen, wie das Monocyte-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1) oder die Oberflächenexpression von ICAM-1 induzieren und somit indirekt die Monozytenchemotaxis und Monozytenadhäsion an atherosklerotischen Läsionen fördern [53]. Insgesamt nehmen Monozyten neben den Thrombozyten bei der Arteriosklerose als chronische, inflammatorisch-fibroproliferative Erkrankung der Gefäßwand eine gewichtige Rolle in der Pathogenese

ein. So konnte auch bei *in vivo* Experimenten eine inflammatorische Signalkaskade nachgewiesen werden, die an den Folgen einer koronaren Mikroembolisation ursächlich beteiligt scheint [74]. Da Thrombozyten biologisch hochaktive Substanzen, wie vasoaktive, chemotaktische, proliferative und bakterizide Substrate produzieren, werden sie auch als proinflammatorische Zellen im Rahmen von rheumatologischen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, angesehen [41].

Zusammenfassend haben sowohl Thrombozyten als auch Monozyten über gegenseitige Interaktionen und Kommunikationen eine wichtige Bedeutung in der Initiierung der Immunantwort bei Abwehrreaktionen, bei der Wiederherstellung von Gewebsstrukturen im Rahmen der Wundheilung und im besonderen bei der Antwort auf lokale Schädigungen, die bei atherosklerotischen, infektiösen oder entzündlichen Reaktionen auftreten.

1.6 Ziele der Arbeit

Die Interaktion von Monozyten und Thrombozyten scheint einen starken Einfluss bei unterschiedlichen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen zu haben, beispielsweise bei der Hämostase, bei vaskulären Erkrankungen, im Rahmen der Atherosklerose sowie bei Entzündungssituationen. Dabei haben die Vitalität und Aktivität oder der programmierte Zelltod der Monozyten wichtige Auswirkungen auf die Entwicklung und die Progression einer Entzündung oder der Atherosklerose.

In dieser Arbeit soll beleuchtet werden, welche Bedeutung Thrombozyten auf die Apoptose von Monozyten haben. In einem *in vitro*-System wurde daher die konstitutive und induzierte Apoptose von Monozyten und ihre Modulation durch Thrombozyten eingehend untersucht. Hierzu wurden frisch isolierte, humane Monozyten durch Serum-Deprivation oder Stimulation mit α CD95/FAS mAb oder Interleukin 4 zur Apoptose gebracht und mit Thrombozyten kokultiviert. Mittels durchflußzytometrischer Daten, TUNEL-Färbung, DNA-Elektrophorese und Transmissionselektronenmikroskopie erfolgten die Analysen der monozytären Apoptose. Ferner sollte hierdurch eine Aufklärung von Regulationsmechanismen der Apoptose von Monozyten betrieben werden, enthaltend Veränderungen in der CD14-Expression und Effekte auf das Signalkaskadenenzym Capase-3.

Da bei der Interaktion, insbesondere der Adhäsion, von Thrombozyten und Monozyten eine Vielfalt von Zelloberflächenrezeptoren beteiligt sind, war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit Wechselwirkungen verschiedener thrombozytärer, wie CD41a und CD62P, und monozytärer, wie CD14, CD36, CD40 und Phosphatdidylserin, Rezeptoren und die Bedeutung für die monozytäre Apoptose zu studieren.

Eine weitere Aufgabe bestand darin, den Zusammenhang des Einflusses von unstimulierten versus aktivierten Thrombozyten auf die apoptierenden Monozyten zu prüfen. Hierbei wurden die Thrombozyten mit einem isotonen wie hypotonen Puffer mit oder ohne zugesetzter Apyrase gewaschen und anschließend eine differente Anzahl dieser Thrombozyten den apoptosestimulierten Monozyten zugesetzt. Im Rahmen dieser Versuche wurde des weiteren die CD62P-Rezeptorexpression der Thrombozytenmembran gemessen.

Schließlich war es im Laufe der Studien von besonderem Interesse, die Bedeutung und Wirkungsweisen des Prozesses der Phagozytose auf die Apoptose von Monozyten aufzuweisen. Um hier neue Erkenntnisse zu gewinnen wurde experimentell erforscht, welche Einflüsse die Gabe von Latex-Partikeln und Zymosan A und welche Auswirkungen lösliche, thrombozytäre Faktoren auf den programmierten Zelltod von Monozyten haben. Zusätzlich sollten die Effekte des Phagozytoseinhibitors Cytochalasin D und der Anwendung der Substanzen Trypsin/EDTA und Trypanblau bei der Kokultivierung von Thrombozyten mit apoptierenden Monozyten erfasst werden.

2 Material und Methoden

2.1 Laborgeräte

2.1.1.1 Zentrifugengeräte

Biofuge 28 RS	Heraeus Sepatech [Düsseldorf, BRD]
Model TJ-6 Zentrifuge	Beckman [München, BRD]
Ultrazentrifuge Art-Micra D-8	ART (Micra KT) [Mülheim, BRD]

2.1.1.2 Zellkulturgeräte

Sterile Werkbank Lamin Air HA 2472 GS	Heraeus [Düsseldorf, BRD]
CO ₂ -begaster Brutschrank Electronic	Heraeus [Düsseldorf, BRD]
Wärmeschrank Electronic B 5050 E	Heraeus [Düsseldorf, BRD]

2.1.1.3 Mikroskopie

Lichtmikroskop Telaval 31	Zeiss [Jena, BRD]
Transmissions-Elektronenmikroskop 410	Philips [Berlin, BRD]

2.1.1.4 Durchflußzytometrie

FACScan Flow Cytometer	Becton Dickinson [Heidelberg, BRD]
Monitor 98785 A	Hewlett Packard [San Diego, USA]
Unix PC 9000 340	Hewlett Packard [San Diego, USA]
FACS-Software Lysis II	Hewlett Packard [San Diego, USA]
Auswertesoftware WinMDI Version 2.7	Microsoft Cooperation [USA]

2.1.1.5 Geräte für die Immunfluoreszenzmikroskopie

Cytospin 2 Zentrifuge Shandon [Frankfurt am Main, BRD]

Mikroskop III RS Zeiss [Jena, BRD]

2.1.1.6 Geräte für die Elektrophorese

Mikrowelle R-2V16 Sharp [Hamburg, BRD]

Elektrophoresekammer A 4581 Biometra [Göttingen, BRD]

Spannungsgerät Power Pack P 25 Biometra [Göttingen, BRD]

UV-Schirm Quick-Store mit Rothaar & Schroeder [Heidelberg, BRD]

CCD-Kamera und

Monitor Monacor B & W

2.1.1.6 Sonstige Geräte

Pipetus-Akku Hirschmann [Eberstadt, BRD]

Bunsenbrenner GASI Schütt [Göttingen, BRD]

pH-Meter CG 840 Schott [Mainz, BRD]

Thermoblock Dri Block DB 2A Techne [Darmstadt, BRD]

Feinwaage LP 1200S und RC 210D Sartorius [Göttingen, BRD]

Rührfisch MR 2002 Heidolph [Kelheim, BRD]

Vortex press-to-mix 34524 Snijders[Tilburg, Niederlande]

Kühlschrank cooler Bosch [Stuttgart, BRD]

2.2 Materialien

2.2.1 Serum für die Zellkultur

Für die Zellkultur wurde Fötale Kälberserum (FCS) (Biochrom Seromed [Berlin, BRD]) mit einer Endotoxin-Konzentration von $< 0,01$ ng/ml eingesetzt. Zur Inaktivierung des Komplementsystems wurde das Serum 30 Minuten auf 56°C erwärmt und anschließend portionsweise aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Zur Kultivierung der Monozyten wurde eine Konzentration von 5 % FCS und zur Induktion von monozytärer Apoptose wurde eine Konzentration von 0,2 % FCS im Kulturmedium eingestellt.

2.2.2 Kulturmedium und Puffer

2.2.2.1 Kulturmedium für Monozyten

Für die Zellkultur wurde das Grundmedium RPMI 1640 Medium (Biochrom Seromed [Berlin, BRD]) mit folgenden Zusätzen ergänzt:

500 ml RPMI 1640 Medium	Biochrom Seromed [Berlin, BRD]
5 ml L-Glutamin	GibcoBRL [Karlsruhe, BRD]
5 ml Penicillin/Streptomycin	Biochrom Seromed [Berlin, BRD]
5 ml (1M) HEPES	Biochrom Seromed [Berlin, BRD]
1,7 ml Mercaptoethanol	Sigma Aldrich [Steinheim, BRD]
0,2 % oder 5 % Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom Seromed [Berlin, BRD]

2.2.2.2 Hepes/Tyrode-Puffer

Bei der Isolierung der Thrombozyten wurde ein isotoner Hepes/Tyrode-Puffer verwandt, der aus folgenden Zusätzen hergestellt wurde:

250 ml Aqua bidest.

(137 mM) 2000 mg NaCl	Sigma [Deisenhofen, BRD]
(2,7 mM) 50 mg KCl	Sigma [Deisenhofen, BRD]
(1 mM) 50 mg MgCl ₂	Sigma [Deisenhofen, BRD]
(0,5 mM) 15 mg NaH ₂ PO ₄	Sigma [Deisenhofen, BRD]
(1 mM) 45 mg Glucose	Sigma [Deisenhofen, BRD]
(2 mM) 186 mg EDTA	Sigma [Deisenhofen, BRD]
(20 mM) 5 ml Hepes (1M)	Sigma [Deisenhofen, BRD]
(0,35 %) 875 mg Bovines Serum Albumin (BSA)	Merck [Darmstadt, BRD]

Der pH wurde bei 6,4 eingestellt.

2.2.2.3 Hypotoner Thrombozytenpuffer

Die Thrombozyten wurde teilweise auch mit einer hypotonen Pufferlösung aufbereitet, die eine erniedrigte Natriumchlorid-Konzentration aufwies und aus folgenden Zusätzen bestand:

500 ml Aqua bidest.

(15 mM) 908 mg Tris	Sigma [Deisenhofen, BRD]
(21 mM) 612 mg NaCl	Sigma [Deisenhofen, BRD]
(2 mM) 372 mg EDTA	Sigma [Deisenhofen, BRD]
(0,1 %) 500 mg Glucose	Sigma [Deisenhofen, BRD]
(0,05 %) 250 mg Bovines Serum Albumin (BSA)	Merck [Darmstadt, BRD]

Der pH wurde bei 6,5 eingestellt.

2.2.2.4 Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

PBS (engl. phosphate buffeted saline) wurde mit oder ohne Zusätze von Kalzium und Magnesium von der Firma Biochrom Seromed [Berlin, BRD] bezogen.

2.2.2.5 Natriumacid-Lösung

500 ml PBS mit Kalzium und Magnesium	Biochrom Seromed [Berlin, BRD]
(0,05 %) 250 mg Natriumacid (NaN_3)	Merck [Darmstadt, BRD]
250 μl Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom Seromed [Berlin, BRD]

2.2.2.6 Paraformaldehyd-Puffer

100 ml PBS mit Kalzium und Magnesium	Biochrom Seromed [Berlin, BRD]
(4 %) 4000 mg Paraformaldehyd oder	Sigma [Deisenhofen, BRD]
(1 %) 1000 mg Paraformaldehyd	

Der pH wurde bei 7,4 eingestellt.

2.2.2.7 Saponin-Puffer

98 ml PBS mit Kalzium und Magnesium	Biochrom Seromed [Berlin, BRD]
2 ml Hepes (1M)	Biochrom Seromed [Berlin, BRD]
1000 mg Bovines serum Albumin (BSA)	Merck [Darmstadt, BRD]
(0,1 %) 100 mg Saponin	Sigma [Deisenhofen, BRD]

Der pH wurde bei 7,4 eingestellt.

2.2.2.8 Trypanblau

(250 $\mu\text{g/ml}$) 1 ml 0,5 %ige Stammlösung	Sigma [Deisenhofen, BRD]
19 ml isotone NaCl-Lösung	

Der pH wurde bei 4,4 eingestellt.

2.2.2.9 Trypsin/EDTA-Lösung

Eine Trypsin/EDTA-Stammlösung (Biochrom Seromed [Berlin, BRD]) wurde mit PBS ohne Kalzium und Magnesium im Verhältnis 1 : 10 verdünnt.

2.2.2.10 Triton-X-100

100 ml Aqua bidest.

(0,1 %) 100 mg Natriumcitrat Merck [Darmstadt, BRD]

(0,1 %) 0,1 ml Triton-X-100 Merck [Darmstadt, BRD]

2.2.2.11 TAE-Puffer (50fach)

500 ml Aqua bidest.

(500 mM) 9300 mg EDTA Sigma [Deisenhofen, BRD]

121 g Tris Sigma [Deisenhofen, BRD]

28,6 ml Eisessig Merck [Darmstadt, BRD]

Der pH wurde bei 8,0 eingestellt.

Eine einfache Lösung wurde durch eine Verdünnung mit Aqua bidest. im Verhältnis 1 zu 20 hergestellt.

2.2.2.12 Laufpuffer für die Gelelektrophorese

TAE-Puffer (einfach)

20 % Glycerol

0,25 % Bromphenolblau

2.2.3 Zytokine

Human rekombinantes Interleukin 4 (IL-4)	Boehringer [Mannheim, BRD]
Interferon gamma (IFN γ)	Sigma Aldrich [Steinheim, BRD]
Granulozyten/Monozyten-Wachstum- stimulierender-Faktor (GM-CSF)	Sigma Aldrich [Steinheim, BRD]

2.2.4 Monoklonale Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Fluoreszenzmarkierung, zur Apoptoseinduktion und für Inhibitionsversuche folgende monoklonale Antikörper verwendet :

Antigen	Klon	Herkunft	Isotyp	Einsatz und Konjugation	Bezugsquelle
CD14	M5E2	Maus	IgG _{2a,k}	Rezeptornachweis auf Monozyten, FITC-konjugiert	BD Pharmingen [Heidelberg, BRD]
CD14 My4	322A-1	Maus	IgG _{2b}	Blockierend auf Monozyten	Coulter Immunotech [Krefeld, BRD]
CD14 Mem18	Mem18	Maus	IgG ₁	Blockierend auf Monozyten	Monosan Sanbio [Beutelsbach, BRD]
CD36	FA6-152	Maus	IgG ₁	Blockierend auf Monozyten	Coulter Immunotech [Krefeld, BRD]
CD40	14G7	Maus	IgM	Rezeptornachweis auf Monozyten, FITC-konjugiert	Monosan Sanbio [Beutelsbach, BRD]
CD40	BL-C4	Maus	IgM	Blockierend auf Monozyten	Monosan Sanbio [Beutelsbach, BRD]
CD41a	P2	Maus	IgG _{1k}	Blockierend auf Thrombozyten	Coulter Immunotech [Krefeld, BRD]
CD62P	CLB-Throm/6	Maus	IgG ₁	Rezeptornachweis auf Thrombozyten, FITC-konjugiert	Coulter Immunotech [Krefeld, BRD]
CD62P	Ak-4	Maus	IgG ₁	Blockierend auf Thrombozyten	Dianova [Hamburg, BRD]
CD95/FAS	CH-11	Maus	IgM	Apoptoseinduktion bei Monozyten	Coulter Immunotech [Krefeld, BRD]

2.2.5 Polyklonale Antikörper

Zum Nachweis der intrazellulären Caspase-3-Aktivität wurden polyklonale (Rabbit) Antikörper (Pharmingen [San Diego, USA]), die Phycoerythrin (PE)-konjugiert vorlagen und die die aktive Form der humanen Caspase-3 erkannten, eingesetzt.

2.2.6 Reagenzien und Chemikalien

2.2.6.1 Reagenzien zur Hemmung der Phagozytose

Cytochalasin D	Sigma Chemicals [St. Louis, USA]
Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lösungsreagenz)	Merck [Darmstadt, BRD]

2.2.6.2 Reagenzien zur Inhibition von Membranrezeptoren

RGDS	Bachem Biochemica [Heidelberg, BRD]
RGES	Sigma Aldrich [Steinheim, BRD]
Phospo-L-serine	Sigma Aldrich [Steinheim, BRD]

2.2.6.3 Reagenzien für den durchflußzytometrischen Apoptosenachweis

Propidiumjodid (PI)	Sigma Aldrich [Steinheim, BRD]
FACS Flow Lösung	Becton Dickinson [Heidelberg, BRD]
In Situ Cell Death Detection Kit (TUNEL-Assay)	Boehringer [Mannheim, BRD]

2.2.6.4 Reagenzien für den gelelektrophoretischen Apoptosenachweis

GenomicPrep Cells DNA Isolation Kit	Amersham Pharmacia [Freiburg, BRD]
Ethanol 99,8 %	Carl Roth [Karlsruhe, BRD]
Isopropanol	Carl Roth [Karlsruhe, BRD]

Peq Gold universal Agarose	AGS [Heidelberg, BRD]
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich [Steinheim, BRD]
Standard 123 bp Leiter	Sigma Aldrich [Steinheim, BRD]

2.2.7 Plastikmaterialien

Die Bezugsquellen für die Plastikmaterialien waren die Firmen Greiner [Frickenhausen, BRD] und Eppendorf [Hamburg, BRD], soweit in den nachfolgenden Kapiteln nicht anders aufgeführt.

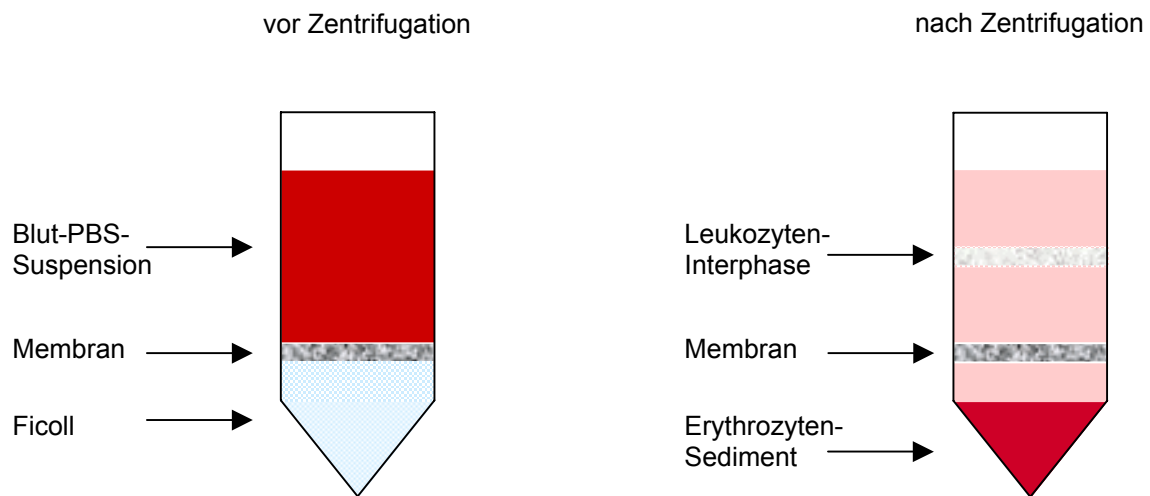
2.3 Präparation humaner Monozyten

Für den größten Teil der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente war aufgearbeitetes Blut, sogenannte „buffy coats“, aus Vollblut von Blutspendern des Instituts für Transfusionsmedizin der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster das Ausgangsmaterial für die Gewinnung menschlicher monozytärer Blutzellen.

Diese „buffy coats“ werden im ersten Schritt bei der Trennung von Vollblut in seine Einzelbestandteile in einem Filterverfahren gewonnen und bestehen neben Erythrozyten hauptsächlich aus Leukozyten und Thrombozyten.

2.3.1 Isolierung von Monozyten mittels Ficoll-Percoll - Dichtegradientenzentrifugation

Die 100 ml Blutmenge des am gleichen Tag gewonnenen „buffy coats“ wurde zunächst auf zwei sterile 50-ml-Zentrifugationsröhrchen aufgeteilt und 15 min bei $500 \times g$ ohne Bremse zentrifugiert. Dabei wurde das Blut in eine untere Erythrozyten und Leukozyten enthaltende Schicht und in eine obere aus plättchenreichem Plasma bestehende Phase aufgetrennt. Diese obere Phase wurde mit einer sterilen Pipette abgenommen und verworfen. Das verbliebene Sediment wurde nun mit kalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) ohne Kalzium und Magnesium auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt und gut durchmischt. In der Zwischenzeit wurden vier andere 50-ml-Zentrifugenröhrchen, die an der Volumenmarke 15 ml eine 2,5 mm dicke Polyester membran besaßen, mit 15 ml kaltem Ficoll (Dichte: 1,077 g/ml (Biochrom Seromed [Berlin, BRD])) gefüllt. Durch die anschließende Zentrifugation von 2 min bei $2000 \times g$ gelangte das Ficoll durch die Membran in den unteren Teil des Röhrchens und konnte nun mit jeweils 25 ml der Erythrozyten-Leukozyten-PBS-Suspension überschichtet und 20 min bei $500 \times g$ ohne Bremse zentrifugiert werden.

Abb. 2.1 : Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

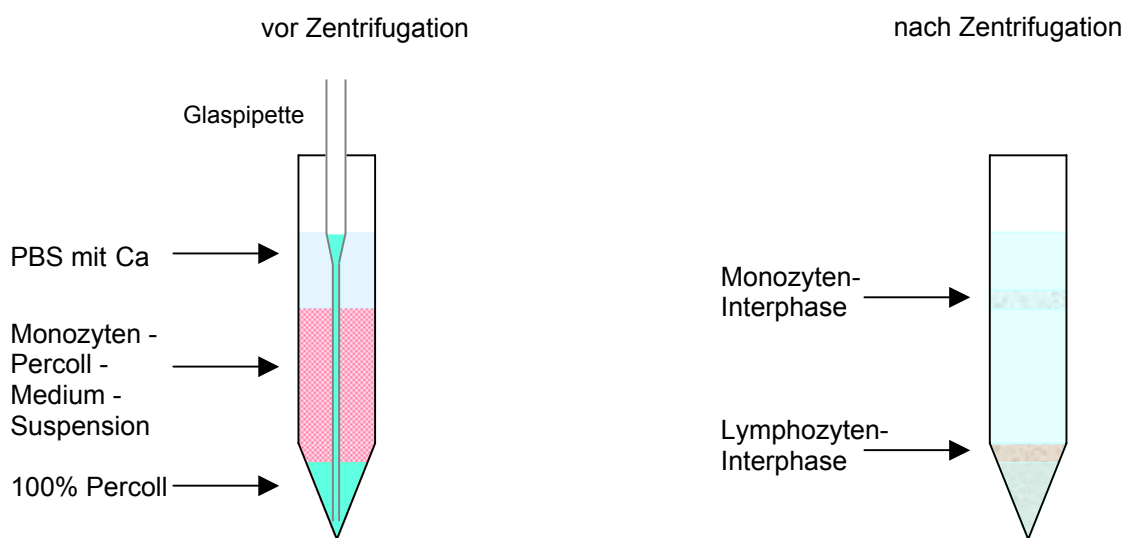
Diese erste Dichtezentrifugation führte zu einer Separierung der mononukleären Zellen von den Erythrozyten. Hierbei bildete sich eine weiße Interphase bestehend aus Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten, die mit Hilfe einer sterilen 1-ml-Pipette aus allen vier Röhrchen entnommen und in ein neues 50-ml-Zentrifugenröhrchen zusammengeführt werden konnte [68,101].

Anschließend wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 ml mit PBS-Puffer mit Kalzium und Magnesium aufgefüllt und je einmal 10 min bei $400 \times g$ und 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Zwischendurch wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet wieder in PBS-Puffer mit Kalzium und Magnesium resuspendiert, um die letzten Ficollreste herauszuwaschen.

Während der Zentrifugationsschritte wurde zunächst 40 ml Percollgemisch aus 36 ml nativem Percoll (Dichte: 1,129 g/ml (Pharmacia [Freiburg, BRD])) vermisch mit 4 ml 10%igem PBS hergestellt. Dieses native Percoll besteht aus Silikonpartikeln (mit einem Durchmesser von 15-30 nm) überzogen mit nicht dialysierbarem Polyvinylpyrrolidone (PVP) und ist isoosmolar und nicht toxisch. Dann erfolgte die Zusammenstellung einer Suspension aus 57 Prozent des oben genannten Percollgemisches und 43 Prozent RPMI Kulturmedium ohne FCS. Nach gründlicher Durchmischung der Percoll-Medium-Suspension wurde das verbliebene Zellpellet in 20 ml der Lösung resuspendiert.

Vier sterile 15-ml-Zentrifugationsröhrchen wurden nun mit 2 ml PBS mit Kalzium und Magnesium gefüllt und zunächst mit 5 ml der Percoll-Medium-Zell-Suspension und dann mit 1 ml des Percollgemisches mit Hilfe einer zugefügten Pasteur-Pipette unterschichtet. Anschließend wurden die Ansätze 30 min bei $1400 \times g$ ohne Bremse und mit geringer Beschleunigung zentrifugiert.

Abb. 2.2 : Percoll-Dichtegradientenzentrifugation



Die zweite Dichtezentrifugation führte zu einer Auftrennung in eine untere Lymphozyten und Granulozyten angereicherte und in eine obere, dünn-schichtige, Monozyten enthaltende Interphase, die mit einer sterilen 1-ml-Pipette achtsam in ein neues 50-ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und aus allen vier 15-ml-Röhrchen vereinigt werden konnte.

Nun wurde wieder auf ein Gesamtvolumen von 50 ml mit PBS-Puffer mit Kalzium und Magnesium aufgefüllt und je einmal 10 min bei $500 \times g$ und 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und zwischendurch der Überstand über dem Zellpellet abgenommen und verworfen und mit PBS-Puffer mit Kalzium und Magnesium resuspendiert, um die Percollreste vollständig herauszuwaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Zellsediment in 10 ml RPMI-Kulturmedium ohne FCS aufgelöst.

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden 50 µl aus der oben aufgeführten Zell-Medium-Suspension in ein vorbereitetes 2-ml- Eppendorf-Gefäß mit 450 µl PBS-Puffer gegeben und aus diesem Inhalt danach ein Tropfen in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. So errechnete sich die Zellzahl in den verbliebenen 10 ml Zell-Medium-Suspension aus der gezählten sechzehn Felder-Zellmenge multipliziert mit dem Kammerfaktor von 10.000, der Verdünnung 10 im Eppendorf-Gefäß und dem ursprünglichen Suspensionsinhalt von 10 ml. Damit konnte die Anzahl der Zellen bestimmt und eine Zelldichte von 5.000.000 Zellen pro ml eingestellt werden.

Die monozytären Zellen wurden nun in 24 well-Platten (1 ml/ well) überführt und zur Adhärenz für 90 Minuten bei 5%igem CO₂-Luftgehalt und 37 °C Temperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit schloss sich ein zweimaliges Waschen mit PBS-Puffer mit Kalzium und Magnesium an. Die Monozyten blieben aufgrund ihrer molekularen Oberflächenstruktur an dem Kunststoff adhärent, wohingegen die verbliebenen Lymphozyten nach der Inkubationszeit durch das wiederholte Waschen weitestgehend entfernt werden konnten.

Dabei betrug der Titer der Monozyten nach der Adhärenz mit anschließender Waschung in etwa 750.000 Zellen pro Well [95,96,101,162].

2.3.2 Isolierung von Monozyten mittels immunomagnetischer Separation (MACS)

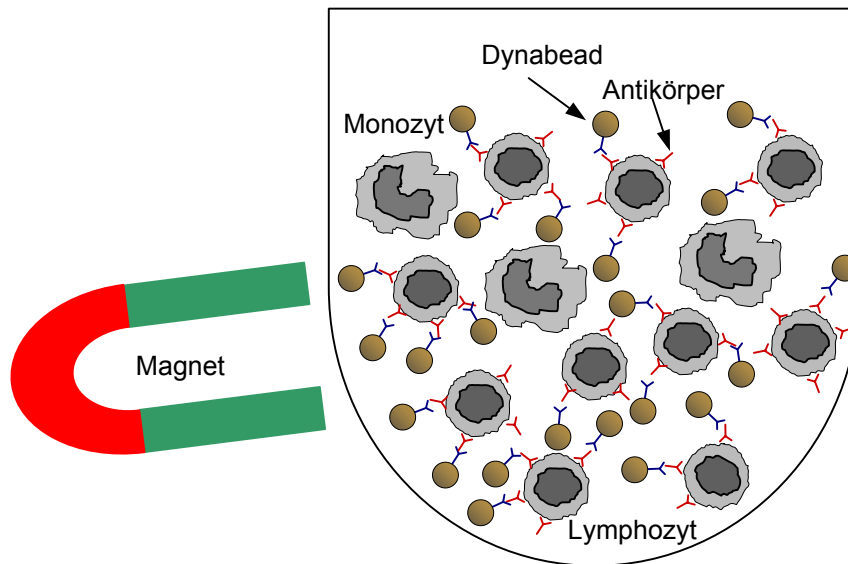
Alternativ wurden zur Gewinnung humaner Monozyten zunächst die Ficoll-Dichtezentrifugation angewandt und danach die Monozyten magnetisch aufgereinigt. Dazu wurden die übrig gebliebenen Zellen gewaschen und gezählt und auf eine Zelldichte von 10.000.000 Zellen pro 100-200 µl PBS-Puffer mit Kalzium und Magnesium und 0,1 % BSA eingestellt.

Zur immunomagnetischen Separation wurden Dynabeads (Dynaal [Hamburg, BRD]) verwendet, die aus IgG4 - Antikörper gegen murines IgG, an die gleichförmig magnetische Polystyren-Partikel mit einem Durchmesser von ca. 4,5 µm gekoppelt sind, bestehen.

Das Volumen von 100 µl der Dynabeads wurde in ein steriles 2-ml-Reaktionsgefäß gegeben und dieses 1 Minute an einen Magneten gehalten bis eine klare Lösung entstand. Diese Flüssigkeit wurde abpipettiert und unter Hinwegnahme des Magneten wurden die am Rand des Reaktionsgefäßes angesammelten Dynabeads in 1 ml kaltem PBS-Puffer mit Kalzium und Magnesium und 0,1 % BSA resuspendiert. Nach erneuter Wiederholung des Waschvorganges verblieben die Dynabeads in 100 µl Puffer.

Nun wurden die bereits in 100-200 µl suspendierten 10.000.000 Zellen mit 20 µl einer Antikörper-Mixtur (Monocyte Negative Isolation Kit) (Dyna [Hamburg, BRD]) und 20 µl eines blockierenden Reagenz versetzt und 12 Minuten bei 4 °C Temperatur inkubiert. Zum einen beinhaltet die Mixtur mäusele IgG Antikörper gegen Antigene auf T und B Zellen und natürlichen Killerzellen und Granulozyten wie CD2, CD7, CD16, CD19 und CD56. Zum anderen enthält das blockierende Reagenz Gammaglobulin, um unspezifische Fc-Rezeptoren auf Monozyten zu blockieren.

Nachdem die Antikörper an die entsprechenden Antigene auf den oben aufgeführten Zellen binden konnten, wurde mit 1 ml PBS-Puffer mit Kalzium und Magnesium und 0,1 % BSA verdünnt und 8 Minuten bei 500 × g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellsediment in 900 µl des erwähnten Puffers aufgelöst. Anschließend erfolgte die Gabe von 100 µl der Dynabeads und eine 15-minütige Inkubation bei 4 °C. Hierbei reagierten nun die gegen mäusele IgG gerichteten Antikörper auf den Dynabeads mit den mäusele IgG Antikörpern, die zuvor an die humanen Antigene auf T und B Zellen und natürlichen Killerzellen und Granulozyten gebunden hatten. Zur Beendigung der Inkubation wurde 1 ml PBS-Puffer mit Kalzium und Magnesium und 0,1 % BSA hinzugefügt.

Abb. 2.3 : Immunomagnetische Separation

Nun diente das 2-minütige Halten des entsprechenden 2-ml-Eppendorf-Gefäßes an einen Magneten zur Auftrennung der Zellen.

Die negativ selektierten Monozyten verblieben in Lösung und wurden vorsichtig herauspipettiert und die Lymphozyten und Granulozyten bildeten einen magnetischen weiß-bräunlichen Randsaum, der verworfen wurde. Hierbei wurde die entnommene Monozyten-Suspension in ein neues steriles 2-ml-Eppendorf-Gefäß überführt und 8 Minuten bei $800 \times g$ zentrifugiert [151].

Anschließend erfolgte die Abnahme des Überstandes. Nach der Resuspendierung des Zellpellets in 2 ml RPMI-Kulturmedium ohne FCS, wurde die entsprechende Zellzahl eingestellt und das bereits oben ausführlich dargestellte Adhärenz- und Aussetzungsverfahren durchgeführt.

Bei dem beschriebenen Separationsvorgang war es besonders wichtig die eingesetzten Puffer möglichst kalt ($2-8 \text{ }^{\circ}\text{C}$) einzusetzen, um die Bindung von phagozytierenden Zellen an Dynabeads zu verhindern [Dynal Technical Information].

2.4 Präparation humaner Thrombozyten

2.4.1 Probanden und Probenabnahme

Das Probandenkollektiv setzte sich aus 8 Freiwilligen, 2 Frauen und 6 Männer, mit einem Durchschnittsalter von $27,5 \pm 6$ (von 21 bis 40 Jahren) zusammen. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren alle Blutspender in guter körperlicher Verfassung. Für die Thrombozytenspende wurden nur Probanden zugelassen, die nicht in ärztlicher Behandlung standen, keine Infektionen aufwiesen und mindestens 2 Wochen vor der Blutabnahme keine Medikamente eingenommen hatten.

Nach Aufklärung und Einwilligung wurde den Freiwilligen peripher-venöses Blut entnommen. Hierbei wurde beim sitzenden Probanden der Arm bequem gelagert und die Punktionsstelle ausreichend desinfiziert. Dann erfolgte nach steriler Punktion einer Armvene mit Hilfe eines „Butterfly“-21G-Venenpunktionsbestecks (Venofix [Braun, Melsungen]) die langsame Aspiration mit geringem Sog von 20 ml venösen Blutes mittels zweier 10-ml-Natrium-Citrat-Monovetten über einen Multiadapter. Die 0,11 M Natriumcitratlösung verhinderte die Gerinnung des Vollblutes durch Komplexierung zweiwertiger Ionen, wie z.B. Ca^{2+} , durch Citrat. Für die Punktionsnadel wurde die Forderung nach einem möglichst scharfen Schliff bei großem Innendurchmesser (0,8 mm ~ 21 G) und geringer Gesamtlänge (3 cm) erfüllt [91].

Mit der Präparation konnte nach der Blutentnahme umgehend begonnen werden.

2.4.2 Isolierung von Thrombozyten durch Zentrifugation

Zunächst wurden die zwei 10-ml-Monovetten mit venösem Citratblut 12 Minuten bei $200 \times g$ zentrifugiert. Dabei erfolgte die Auftrennung des Vollblutes in zwei Phasen, wobei sich in der unteren Schicht Erythrozyten und Leukozyten absetzten und die obere Schicht plättchenreiches Plasma (PRP) aufwies, welches vorsichtig, ohne die Grenzschicht aufzuwirbeln, in ein neues steriles 50-ml-Zentrifugationsgefäß abpipettiert wurde [166,172].

Nachdem die Monovetten mit dem verbliebenen Rest verworfen wurden, erfolgte die Gabe von 5 ml 5 mmol EDTA und 25 μ l Apyrase Grad VIII (Fluka [Steinheim, BRD]) zum PRP. Die Apyrase, die in einer Aktivität von 0,5 U/ml eingesetzt wurde, diente zusätzlich der Inhibition der Thrombozytenaggregation [71,132,188].

Nach 10 Minuten Zentrifugation bei $800 \times g$ wurde das Pellet zweimal in 5 ml Hapes/Tyrode-Puffer mit Apyrase resuspendiert und dann wieder 10 Minuten bei $800 \times g$ zentrifugiert [173,193].

Das Thrombozytensediment wurde abschließend in 2 ml RPMI-Kulturmedium mit 0,2 % FCS vermischt und die Anzahl der Thrombozyten unter Verwendung der Neugebauer-Zählkammer bestimmt.

2.4.3 Fluoreszenzmarkierung der Thrombozytenmembran

Für den Nachweis der Phagozytose wurde in einigen Experimenten die Zellmembran der Thrombozyten unter Verwendung des Fluoreszenz-Farbstoffes PKH67 Green Fluorescent Cell Linker (Sigma [Steinheim, BRD]) markiert. Bei dieser Technologie werden fluoreszierende Farbstoff-Moleküle in die Zellmembran inkorporiert [78,133]. Diese verbleiben über einen längeren Zeitraum in der Zellmembran und die fluoreszierenden Zellen können dann mittels Durchflußzytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie ermittelt werden [169,179].

Nach der Einstellung einer Konzentration von 10^7 Thrombozyten / ml Diluent C, wurden 200-400 μ l Thrombozyten - Diluent C - Gemisch pro 2-ml-Eppendorf-Gefäß aufgeteilt. Vorab war bereits eine Farbstofflösung, bestehend aus 2 μ l Green-Linker auf 500 μ l Diluent C, hergestellt worden. Hiervon wurden 200 μ l pro 2-ml-Eppendorf-Gefäß zum vorgelegten Inhalt gegeben und 2 Minuten bei 25 °C Raumtemperatur inkubiert. Nun diente die 1-minütige Gabe von 2 ml purem FCS dem Abstoppen der Reaktion. Hierauf wurde der Inhalt aus allen Behältnissen in ein 50-ml-Zentrifugationsröhrchen zusammengefügt und 10 Minuten bei $2000 \times g$ zentrifugiert. Danach erfolgte die Abnahme des Überstandes und die Resuspendierung des Thrombozytensedimentes in 5 ml Hapes/Tyrode-Puffer und erneute Zentrifugation.

Abschließend wurde dieser gründliche Waschvorgang mit HEPES/Tyrode-Puffer ein zweites Mal durchgeführt und nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurden die angefärbten Thrombozyten mit 0,2 % FCS Medium vermischt und die Anzahl der Thrombozyten bestimmt [40,78,115,133,169,179,191].

2.5 *In vitro* - Testsysteme

2.5.1 Kultivierung von Monozyten und Koinkubation mit Thrombozyten

Die Monozyten wurden grundsätzlich nach dem Adhäsionsverfahren in 0,2%igem und 5%igem Medium kultiviert und mit apoptoseauslösenden Stimulantien, wie Antikörper gerichtet auf CD95/FAS [3,27,29,62,184] oder dem Zytokin IL-4 [65,68,96,178] versehen. Die Thrombozytengabe fand dann etwa nach 20 Stunden Vorinkubationszeit der Monozyten statt. Hierbei wurden ca. 100 µl Medium entnommen und ca. 100 µl neues Medium oder die Thrombozyten-Medium-Suspension wieder vorsichtig hinzugefügt [57]. Bei den meisten Versuchen blieben Monozyten und Thrombozyten bis zum Ende der Inkubationszeit zusammen. Diese betrug als Standardinkubationszeit 72 Stunden nach dem Aussetzen der Monozyten oder ungefähr 42 bis 52 Stunden nach dem Hinzufügen der Thrombozyten. Anschließend wurden die Monozyten meistens durchflußzytometrisch analysiert, wobei gewisse Methoden, wie der TUNEL-Assay oder die Caspase-3-Messung (je 36 Stunden), teilweise kürzere Kokultivierungszeiten erforderten.

2.5.2 Induktion der Thrombozytenaktivierung

Sollten aktivierte Thrombozyten verwendet werden, erfolgte die Thrombozytenaufbereitung nicht mit dem oben dargelegten Hepes/Tyrode-Puffer versetzt mit Apyrase, sondern mit einem hypotonen Puffer. Dieser enthielt eine Natriumchlorid-Konzentration von nur 21 mmol im Gegensatz zu 137 mmol beim isotonen Hepes/Tyrode-Puffer und das Hinzufügen von Apyrase zur Thrombozytenaggregationshemmung wurde nicht vorgenommen.

Zur Aktivierung und damit verbundener Aggregierung der Thrombozyten erfolgte die Verringerung der Osmolarität und das Weglassen der Apyrase [8,31,37,77,107,111,118,183].

2.5.3 Inkubation von Monozyten mit fragmentierten oder löslichen thrombozytären Faktoren

Um die mögliche Einwirkung von eventuell freigesetzten, löslichen Faktoren der Thrombozyten, wie Inhaltsstoffe der Granula, z.B. Plättchenfaktor 4, ATP, Serotonin, Fibrinogen, Albumin, auf apoptotische Monozyten zu betrachten, wurden zwei unterschiedliche Versuchsserien durchgeführt.

Zum einen wurde nach etwa 20 Stunden Vorinkubation der Monozyten 500 µl des Mediumüberstandes aus dem well entfernt und die Thrombozyten in einem Doppelkammersystem, getrennt durch eine Membran mit einer 0,2 µm Porengröße (Schleicher + Schuell [Dassel, BRD]), zugegeben.

Zum anderen wurden ca. 100×10^6 Thrombozyten in 1 ml RPMI-Medium mit 0,2 % FCS in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und einer 10-minütigen Behandlung mit einer Apparatur ausgesetzt, die die Thrombozyten sowohl mechanisch als auch mit Hilfe von Ultraschallwellen (Stufe G \cong 3900 Umdrehungen/min) fragmentierte. Ferner erfolgte dann noch teilweise eine Filtrierung diese Suspension mit thrombozytären Fragmenten durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm, die nur für die löslichen Faktoren, nicht jedoch für größere Fragmente passierbar war. Von diesem Filtrat oder auch von der Lösung mit den Thrombozyten-Fragmenten wurden je 100 µl zu den Monozyten im well, nach vorheriger Entnahme von 100 µl Mediumüberstand, gegeben und nach der Standardinkubationszeit durchflußzytometrische Untersuchungen zur Apoptosebestimmung der Monozyten durchgeführt.

2.5.4 Inkubation von Monozyten mit Zymosan A und Latex-Mikropartikeln

Um den Prozeß der monozytären Phagozytose und der damit verbundenen Aktivierung der Zellen und dem eventuell daraus resultierenden Schutz vor Apoptose näher zu beleuchten, wurden zwei unterschiedliche Reagenzien, Zymosan A und Latex-Partikel, zur Kokultivierung verwandt.

Die aus Zellwänden des Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* präparierte und Protein-Kohlenhydrat-Komplexe beinhaltende Substanz Zymosan A (Sigma Aldrich [Steinheim, BRD]) wurde zunächst mit einer Konzentration von 1 mg/ml in je 2 ml PBS-Puffer ohne Kalzium und Magnesium eingestellt und einmal gewaschen. In einem sterilen 2-ml-Eppendorf-Gefäß, das nun nach Zentrifugation und Waschung 1 ml Zymosan-PBS-Lösung enthielt, wurde 30 Minuten bei 80 °C im Heizblock erhitzt, um mögliche Verunreinigungen zu denaturieren. Dann folgte ein zweiter Waschschrift mit PBS-Puffer ohne Kalzium und Magnesium und eine Zentrifugation. Das Resuspendieren des Zymosan-Pellets in 1 ml nicht hitzeinaktivierten, damit auch immunologische Komplementfaktoren enthaltende, FCS und die Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten führte zu einer Opsonisierung des Zymosan A. Schließlich dienten weitere Zentrifugationen und Waschschriffe mit PBS-Puffer ohne Kalzium und Magnesium der Säuberung vom FCS. Die Partikel des nun opsonisierten Zymosan A wurden gezählt und 10×10^6 Zymosan-Teilchen in 100 µl mit 0,2 % FCS versehenen RPMI-Kulturmedium konzentriert [23,26,38,67].

Im Rahmen der Experimente zur Phagozytose wurden des weiteren sogenannte „Latex Beads“ eingesetzt. Diese Latex-Mikropartikel (Sigma Chemicals [St. Louis, USA]) bestanden aus polymerisiertem Styren und hatten einen Durchmesser von 3,0 µm, der dem von Thrombozyten entsprach. Zur Aufbereitung wurden meist 15 µl ($2,2 \mu\text{l} = 15 \times 10^6$) der Latex-Teilchen-Lösung in 1 ml PBS-Puffer ohne Kalzium und Magnesium suspendiert und einmal gewaschen. Dieses Waschen gliederte sich immer in eine Zentrifugation bei $31.750 \times g$, dem Abpipettieren des Überstandes und der Resuspendierung des Sediments in 1 ml PBS-Puffer ohne Kalzium und Magnesium. Danach wurde der Inhalt des 2-ml-Eppendorf-Gefäßes 30 Minuten bei 80 °C im Heizblock pasteurisiert und erneut gereinigt. Zur Opsonisierung erfolgte die Gabe von 1 ml nicht hitzeinaktiviertem FCS und eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C. Am Ende erfolgten wieder mehrere Waschschriffe, die Zählung der Latex-Teilchen und für die Endkonzentration eine Suspendierung von $\sim 5 \times 10^6$ Partikeln in 100 µl 0,2 % FCS Medium [23].

Bei beiden zur Phagozytose benutzten Substanzen wurde die Applikation in gleicher Weise wie die Kokultivierung der Thrombozyten mit Monozyten durchgeführt und

abschließend wurde standardgemäß durchflußzytometrisch der natürliche Zelltod der Monozyten gemessen oder aber auch eine Analyse monozytärer TEM-Bilder erbracht.

2.5.5 Koinkubation von Monozyten mit Fluoreszenz-markierten Thrombozyten und Cytochalasin D

Bei dem methodisch im Rahmen dieser Arbeit erstellten Assay wurde 30 Minuten vor der Thrombozytengabe Cytochalasin D zu den Monozyten gegeben und vorinkubiert. Zur Interaktion wurden danach an der Membran Fluoreszenz-markierte Thrombozyten verwandt und 1 Stunde im well belassen. Anschließend wurde der komplette Medium- oder Medium-Thrombozyten-Inhalt herausgenommen und das well mit den adhärenen Monozyten wurde einmal mit PBS-Puffer mit Kalzium und Magnesium ausgewaschen und dann mit neuem Medium mit oder ohne Stimulantien versehen. So ließ sich die Inkubation des Cytochalasin D auf insgesamt 90 Minuten begrenzen, obgleich die Thrombozyten, im Gegensatz zu allen anderen Versuchsdurchführungen, hier nur 1 Stunde mit den Monozyten reagieren konnten.

Zusätzlich wurden Kontrollansätze mit DMSO angewandt, da dies die Lösungsreagenz für Cytochalasin D darstellte, und alle Ansätze wurden sowohl mit als auch ohne Thrombozytengabe durchgeführt [38,70,89,94,192].

Die Monozyten wurden nach der Standardinkubationzeit von 72 Stunden abgenommen und der Durchflußzytometrie zugefügt, um den phagozytierten Inhalt an Fluorescein-Isothiocyant(FITC)-Membran-inkorporierten Thrombozyten zu messen.

2.5.6 Monozytäre und thrombozytäre Rezeptorinhibitoren

Der Einsatz von einigen Inhibitoren gegen Rezeptoren entweder der Thrombozyten oder der Monozyten sollte die gegenseitige Interaktion und Adhäsion im Rahmen der Ko-kultivierung unterbinden.

Auf der Seite der Thrombozyten wurden gegen die beim Prozeß der Adhäsion wichtigen Rezeptoren, zum einen blockierende Antikörper gegen CD62P (membranexprimierter Inhaltsstoff der α -Granula) [31,38,116,121,134,149,171,172]

und gegen CD41a (GP IIb/IIIa Komplex bei Fibrinogen vermittelter Adhäsion) [112,113,125,168,171,172] und zum anderen die inhibierende, aus Aminosäuren zusammengesetzte Reagenz RGDS [42,67,84,157,168,171] und als Kontrolle die inaktive Form RGEs angewandt.

Auf der Seite der Monozyten wurden zum einen blockierende Antikörper gegen CD14 (Erkennungsrezeptor für apoptotische Zellen) [42,65,94,112,125,143], CD36 (Thrombospondin vermittelte Adhäsion) [45,84,92,94,157,164,168,177] und CD40 (interagiert mit dem CD40-Liganden auf Thrombozyten) [2,71,142,144,190] und zum anderen die aggregationshemmende Reagenz Phospho-L-serine [44,45,67,157,177] benutzt.

Im allgemeinen diente zuerst eine Vorinkubation, die der Monozyten im Well und die der Thrombozyten in einem 2-ml-Eppendorf-Gefäß, zur Bindung der monoklonalen Antikörper oder der Reagenzien und erst danach erfolgte die gemeinsame Ko-kultivierung von Thrombozyten und Monozyten zusammen mit den Adhäsion verhindernden Substanzen. Diese wurden in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen eingesetzt. Nach der meist nur einstündigen Inkubation fand eine vorsichtige Abnahme der Suspension aus den Aussparungen der Kulturplatten und eine Zugabe von neuem Medium statt. Die Monozyten hatten so nur etwa eine Stunde mit den Thrombozyten unter Einsatz der blockierenden Substanzen reagiert. Anschließend wurden die Zellen noch weitere ca. 40 bis 52 Stunden kultiviert und dann der durchfluß-zytometrischen Untersuchung zugefügt.

2.6 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Bestandteilen oder strukturellen Merkmalen von Zellen. Sie stellt dabei ein optisches Meßsystem für einzelne in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Partikel dar und basiert auf dem Prinzip der Färbung verschiedener Komponenten mit geeigneten Fluochromen.

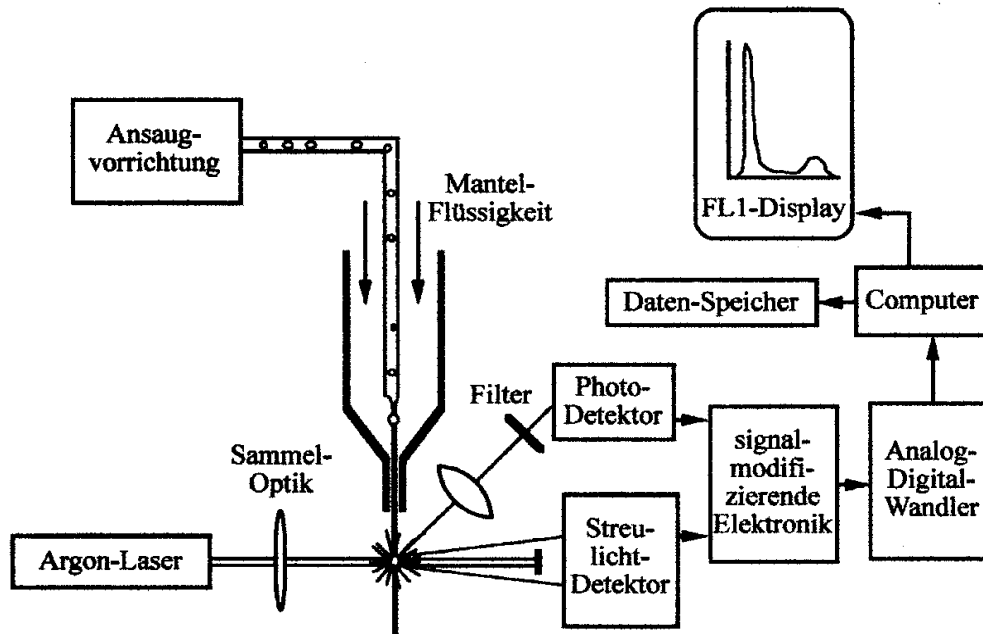
In den letzten Jahren wurden verschiedene durchflußzytometrische Nachweisverfahren für apoptotische Zellen entwickelt, die auf Änderungen der Zellmorphologie, der Zusammensetzung und Transportfunktion der Plasmamembran, der Organellenfunktion und der endonucleolytischen DNA-Fragmentierung basieren. Auch der Einsatz immunchemischer Methoden zum Apoptosenachweis mit der Durchflußzytometrie ist immer mehr möglich geworden, wenngleich die meisten verfügbaren Antikörper Antigene nachweisen, die zwar eine Tendenz oder Zeichen der Zelle zu Apoptose oder Apoptose-Resistenz aufzeigen, wie z.B. die Caspasen-Familie oder Proteine der Bcl-2-Familie, ein definitiver Erweis der Apoptose ist allerdings anhand dieser Marker nicht möglich.

Durch Einführung durchflußzytometrischer Meßmethoden Ende der achtziger Jahre konnte auch die Thrombozytenfunktionsdiagnostik wesentlich weiterentwickelt werden. Vor allem bietet sie einen methodischen Zugang zu vielen Teilsequenzen der Thrombozytenaktivierung, wie z.B. von morphologischen Veränderungen und der Messung der Oberflächendichte von Granulainhaltsstoffen [30,91,102].

2.6.1 Aufbau und Funktionsweise eines Durchflußzytometers

Das Durchflußzytometer ist ein optisches Messgerät, bei dem als Lichtquelle ein luftgekühlter Argonionenlaser monochromatisches kohärentes Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Es werden Streulicht- und Fluoreszenzsignale von Einzelzellen bestimmt, wobei unterschiedlichste immunologische Merkmale wie Oberflächenantigene, intrazelluläre Proteine und DNA-Fragmente mit fluorchrommarkierten Antikörpern zur Analyse detektiert werden können.

Abb.2.4 : Schematische Darstellung der Fluoreszenzverarbeitung im Durchflußzytometer [Wheeles,1991]



Die zu analysierenden Zellen müssen bei der Untersuchung nativ oder fixiert in einer monodispersiven Lösung, d.h. möglichst immer als einzelne Zellen, vorliegen und damit diese dann auch einzeln den Messpunkt passieren, ist ein Vorgang der „hydrodynamischen Fokussierung“ erforderlich [182]. Hierbei treffen sich zwei Flüssigkeitsströme, der Hüll- und der Probenstrom, und durch den höheren Druck des äußeren Hüllstromes wird der innere Probenstrom zu einem dünnen Faden ausgezogen, in dem die Zellen einem konstantem Fluss unterliegen und wie in einer Perlenkette aufgereiht den Laserstrahl im rechten Winkel kreuzen. Nach dem Auftreffen des Laserstrahls kann nun vom Messpunkt aus zunächst einmal in verschiedenen Raumwinkeln Streulicht in der Anregungswellenlänge gemessen werden. Beim Engwinkelstreulicht („forward scatter“ FSC) wird proportional die Zellgröße erfasst, bei der auch die Vitalität der Zellen eine große Rolle spielt, da z.B. apoptotische Zellen kleiner sind. Das 90°- Streulicht („side scatter“ SSC) spiegelt die Granularität der Zellen wider [146].

Jede Zelle lenkt zum einen das Laserlicht ab und emittiert auch, angeregt durch den Laser, Fluoreszenz, je nach Einsatz der Fluochrome. Diese fluoreszierenden

Verbindungen absorbieren hierbei Lichtenergie über einen weiten, aber jeweils charakteristischen Wellenlängenbereich und die Lichtenergieabsorption führt zu einer Anhebung von Elektronen auf ein höheres Energieniveau, so dass beim Rücksprung der Elektronen auf das Ausgangsniveau Photonen emittiert werden. Die Wellenlänge, bei der die Verbindung angeregt wird, in unserem Fall immer 488 nm, ist das jeweils charakteristische Exitationsspektrum, welches ungefähr dem Absorptionsspektrum entspricht. Hingegen stellt das beim Rücksprung auf das Grundniveau emittierte Licht das Emissionsspektrum dar, das wegen des Energieverlustes stets energieärmer und damit langwelliger ist. Unter Verwendung verschiedener Fluochrome unterschiedlicher Lichtspektren, können auch mehrere funktionelle Veränderungen gleichzeitig erforscht werden.

Tab. 2.1 : In dieser Arbeit angewandte Fluochrome der Durchflußzytometrie

Fluorchrom	Absorption (nm)	Emmision (nm)	Beispielanwendung
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	488	530	CD14; TUNEL; CD62P; PKH67
Phycoerythrin (PE)	492	580	caspase-3
Propidiumjodid (PI)	585	620	Apoptose

Da auch die Fluoreszenz im rechten Winkel gemessen wird, trennen Blenden, Strahlenteiler, dichroitische Filter, Bandpass- und Kantenfilter das Seitwärtsstreulicht vom Fluoreszenzlicht und die Fluoreszenz anschließend in die einzelnen Farbbereiche. Sowohl das Streulicht, als auch die Intensität der Fluoreszenz werden durch spezielle Photodioden registriert. Die Photonen werden dann in Photomultierröhren in Ströme und danach in Spannungsimpulse umgewandelt und diese analogen Signale werden verstärkt und letztlich in digitale Signale gewandelt, die vom Computer verarbeitet werden können. Der Computer zeichnet dann die Daten auf und stellt sie graphisch dar. Die Messwerte der Einzelzellen werden in der Reihenfolge gespeichert, in der sie den Messpunkt passieren und so wird die ursprüngliche Korrelation für die Datenauswertung bewahrt [145,146].

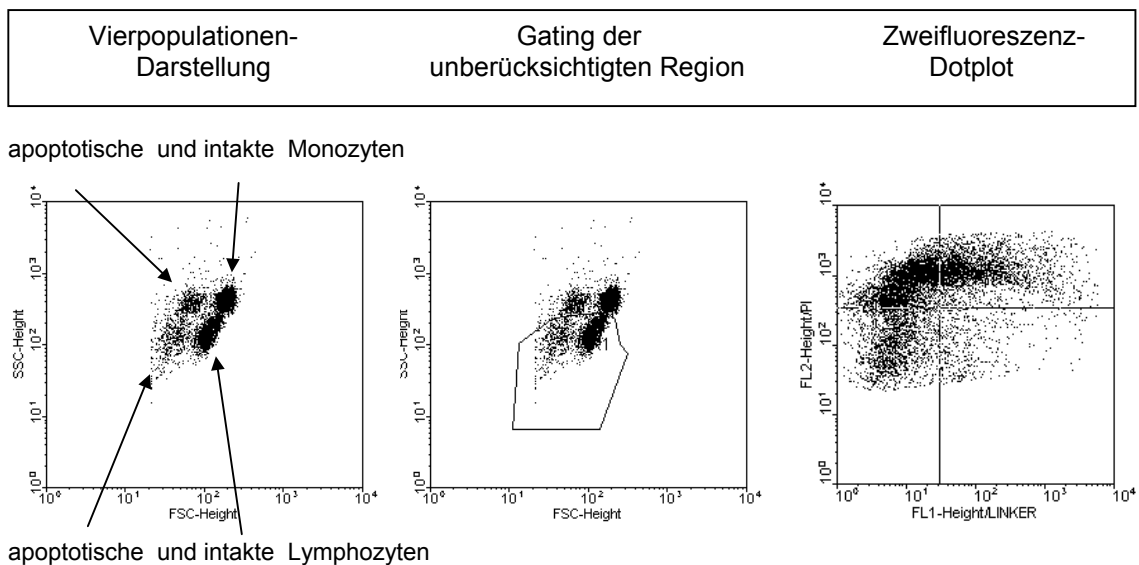
2.6.2 Auswertung der durchflußzytometrische Daten

Insgesamt gingen in der Arbeit Messwerte der Fluoreszenzintensitäten von einer jeweils 2.000 – 10.000 Einzelzellen umfassenden Stichprobe ein und es konnten über verschiedene Fluoreszenzkanäle (FL-1, FL-2 und FL-3) drei verschiedene Fluochrome (FITC, PE und PI) einbezogen werden.

Die Messdaten konnten zum einen als Histogramm dargestellt werden. Hierbei wurde je ein Parameter betrachtet und dabei waren die Anzahl der Zellen (Ordinate) gegen die meist logarithmisch vorgegebenen Signalintensitäten des zu untersuchenden Merkmals (Abszisse) aufgetragen.

Mit der häufig eingesetzten Zweiparameterdarstellung, dem sogenannten „Dotplot“, ließ sich die Relation zweier Zelleigenschaften einer Zellpopulation erforschen. In der Darstellung Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen Seitwärtsstreulicht (SSC), ließen sich in einer nicht ganz aufgereinigten Monozytenprobe vitale und apoptotische Monozyten und vitale und apoptotische Lymphozyten anhand vier verschiedener Punktwolken identifizieren [30,68].

Abb. 2.5: Exemplarische Darstellung eines Dotplot im FSC und SSC und „Gating“ sowie eine Zweifluoreszenz – Dotplot



Bei der Messung war es wichtig, Zelltrümmer oder andere Zellarten von den zu interessierenden Zellen zu trennen und so wurde in der Regel nur ein Teil der Messereignisse zur Auswertung herangezogen. Hierzu wurde bei der Auswertung der Daten zunächst die Zweiparameterdarstellung im Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) gewählt und im Dotplot die physikalischen Zelleigenschaften Zellgröße und Granularität betrachtet. Hierbei waren die Einstellungen des Durchflußzytometers so angelegt, dass bezüglich FSC und SSC nur relativ große Populationen erfasst wurden und z.B. die Thrombozytenpopulation unberücksichtigt blieb, wenn sie nicht extra eingestellt wurde. Nun wurde eine weitere Vorauswahl getroffen, indem ein polygonales Software-Fenster, als „Gating“ bezeichnet, um bestimmte Zellwolken gelegt wurde, die von vornherein unberücksichtigt oder deren Fluoreszenz-(Antigen)-Eigenschaften näher untersucht werden sollten [146]. Anhand der verschiedenen Punktwolken konnten dann die vitalen und apoptotischen Lymphozyten ausgegrenzt werden und gleichzeitig konnte unter Verrechnung der verbliebenen Zellen zur Gesamtzellzahl die jeweilige Reinheit an Monozyten der aufgearbeiteten Proben bestimmt werden. Die Reinheit lag bei Berücksichtigung aller Versuchsserien bei einem Anteil um etwa 80 Prozent an Monozyten.

Nach diesen Schritten wurden dann zwei Parameter der verbliebenen Monozytenpopulation geprüft und mit dem Hineinlegen eines Quadranten und den ermittelten Prozentangaben statistisch ausgewertet.

2.7 Durchflußzytometrische Methoden

Mit der standardmäßigen Propidiumjodid-Färbung und dem TUNEL-Assay wurde der quantitative Nachweis der Apoptose der Monozyten geführt. Zwei weitere immunchemische Methoden, die Betrachtung des Oberflächenrezeptors CD14 und die Studie des intrazellulären Signaltransduktionsweges über Caspase-3, zeigten weitere Tendenzen der Monozyten zur Apoptose auf.

Der Aktivierungszustand der Thrombozyten wurde mit der Messung von CD62P erfasst.

2.7.1 Monozytärer Apoptosenachweis mittels Propidiumjodid

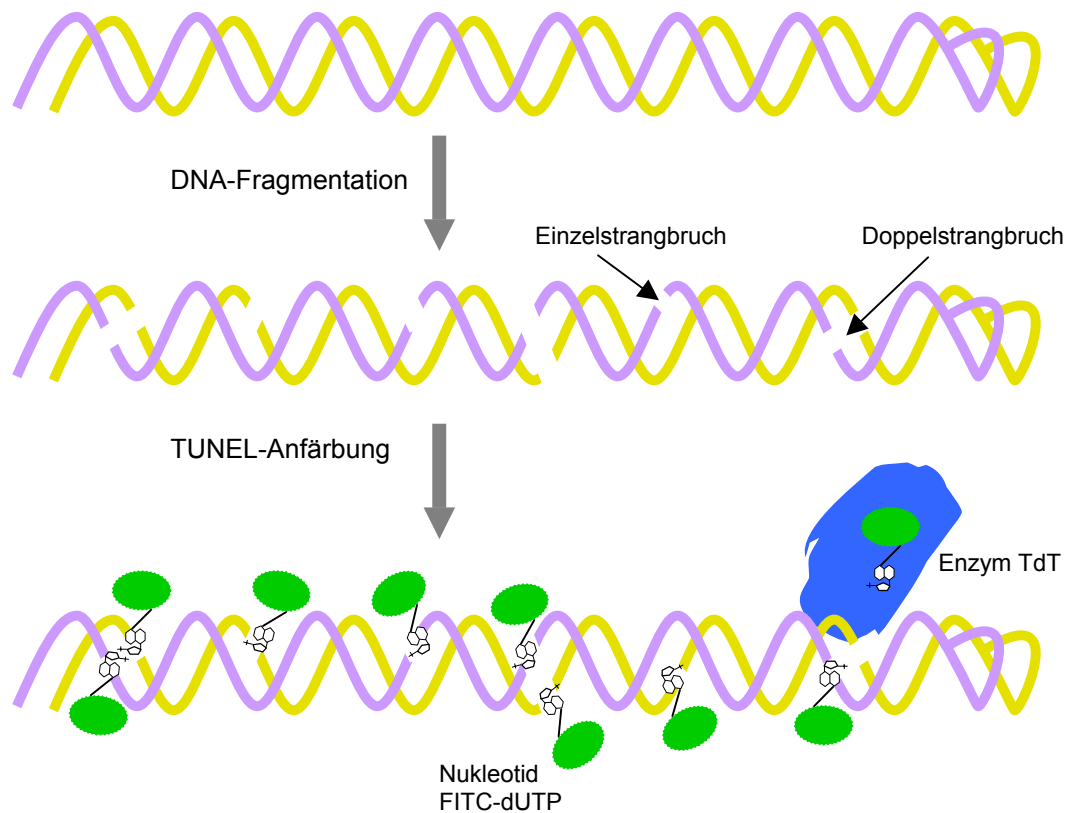
Ein wichtiges Merkmal apoptotischer Zellen ist, dass es schon in frühen Phasen zu einer spezifischen Degradierung der genomischen DNA kommt. Durch diesen Prozeß nimmt der DNA-Gehalt von apoptotischen Zellen im Vergleich zu vitalen Zellen ab (endonukleolytische DNA-Fragmentierung). Die klassische Methode zur Detektion solcher Veränderungen ist nach der Fixierung der Zellen die vollständige Anfärbung der DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI). Dieser bindet spezifisch an Nukleinsäuren. Der DNA-Gehalt der Zellen kann dann durchflußzytometrisch erfasst werden, wobei die Intensität der Fluoreszenz der Zellen ein Maß für ihren DNA-Gehalt darstellt. Zuvor wurden die Zellen permeabilisiert, damit die durch den apoptose-spezifischen Abbau der genomischen DNA entstandenen Bruchstücke aus den Zellen gelangen konnten und nur die verbliebene hochmolekulare DNA im Zellkern angefärbt wurde. Die apoptotischen Zellen in der untersuchten Population enthielten dann weniger hochmolekulare DNA und zeigten so auch durchflußzytometrisch prüfbar weniger PI-Fluoreszenz.

In der hier verwendeten Methodik wurden nach der Standardinkubationzeit von 72 Stunden 800 µl des Medium-Überstandes aus jedem well verworfen und 1 ml PBS-Puffer ohne Kalzium und Magnesium hinzugegeben und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte das gründliche, wiederholte Ablösen der Monozyten durch mehrmaliges Abspülen mit einer Pipette und das Füllen eines 2-ml-Eppendorf-Gefäßes mit 1 ml dieser PBS-Zell-Suspension zuzüglich 1 ml 0,05%igem Natriumacid zur

Stabilisierung der Zellen. Nun diente die Zentrifugation bei $7937 \times g$ der Sedimentierung der Monozyten, die nach der Abnahme des Überstandes in $180 \mu\text{l}$ 4%igem Paraformaldehyd gelöst und anschließend im Kühlschrank 15 Minuten fixiert wurden. Nach der erfolgreichen Fixierung wurde mit 2 ml Natriumacid gewaschen. Nach der Resuspendierung der Zellen in $150 \mu\text{l}$ 0,1 % Saponin zur Permeabilisierung der Monozyten zusammen mit $5 \mu\text{l}$ Propidiumjodid mit einer Konzentration von 1 mg/ml zur fluoreszenztechnischen Anfärbung der DNA erfolgte eine Inkubation von 20 Minuten bei $4-8 \text{ }^\circ\text{C}$ im Kühlschrank. Abschließend wurden die Monozyten noch zweimal mit 0,05%igem Natriumacid gewaschen und am Ende in $500 \mu\text{l}$ Natriumacid gut resuspendiert und zur durchflußzytometrischen Untersuchung in ein FACS-Röhrchen pipettiert [24,30,34,140].

2.7.2 Monozytärer Apoptosenachweis mittels TUNEL - Assay

Bei der zweiten durchflußzytometrischen Methode handelt es sich um eine enzymatische Markierung der DNA-Fragmente, die im allgemein als TUNEL-Assay (engl.: *Tdt-mediated dUTP nick end labeling*) bezeichnet wird. Durch die endonukleolytische Spaltung der DNA während der Apoptose resultieren doppelsträngige, molekular leichtgewichtige DNA-Fragmente sowie einzelsträngige, molekular höhergewichtige DNA und bei allen Strangbrüchen zahlreiche freie 3'-Hydroxyl-Enden, die durch eine exogene terminale Deoxynukleotidyltransferase (TdT) matrizenunabhängig mit fluoreszenzgekoppelten Nukleotiden (z.B. FITC-dUTP) markiert und entweder im Durchflußzytometer oder im Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können.

Abb. 2.6 : Schematische Darstellung der Funktionsweise des TUNEL-Assay

Nach Ablösung der Monozyten aus den Kulturplatten und Zentrifugation, wurden die Zellen in PBS-Puffer mit Kalzium und Magnesium und 1 % BSA in einem 2-ml-Eppendorf-Gefäß resuspendiert und erneut bei $7937 \times g$ mit Quick-Run sedimentiert. Hiernach wurde der Überstand entfernt und mit 300 μ l 4%igem Paraformaldehyd gelöst und für 15 Minuten im Kühlschrank fixiert. Die Proben wurden danach mit 2 ml PBS-Puffer mit Kalzium und Magnesium und 1 % BSA gewaschen und erneut zentrifugiert. Nun diente die Gabe von 150 μ l 0,1%igem Triton-X-100 bei 3minütiger Inkubation auf Eis der Permeabilisierung der Zellen. Hieraufhin wurde wiederholt gewaschen und dann erfolgte pro Sediment im Behältnis das Hinzufügen von 50 μ l TUNEL-Mixtur, zusammengesetzt aus einem Anteil der enzymatischen Lösung mit TdT und aus zehn Anteilen der Färbungslösung mit fluoreszenz-konjugiertem dUTP (In Situ Cell Death Detection Kit) Boehringer [Mannheim, BRD]). Zusätzlich wurden Kontrollansätze

einmal mit 50 µl PBS-Puffer mit Kalzium und Magnesium mit 1 % BSA und einmal mit 50 µl Färbungslösung ohne das Enzym versehen.

In der folgenden einstündigen Inkubation bei 37 °C im lichtgeschütztem Wärmeschrank geschah in den fixierten und permeabilisierten Monozyten die Ligierung des FITC-konjugiertem dUTP mit Hilfe des Enzyms TdT an die DNA-Strangbrüche apoptotischer Zellen [25,30,55,136,140,162].

Anschließend wurden die Proben wiederum vermehrt mit PBS-Puffer mit Kalzium und Magnesium und 1 % BSA gewaschen und zum Schluss in 750 µl Natriumacid aufgenommen und unmittelbar darauf im Durchflußzytometer gemessen oder der unten aufgeführten Immunfluoreszenzmikroskopie zugefügt.

2.7.3 Nachweis intrazellulärer Caspase-3-Aktivität

Die Caspasen (*Cysteine requiring aspartate protease*) spielen eine große Rolle in der Steuerung der Apoptose-Signalkaskade und sind der Motor der Apoptose. Sie werden durch externe Apoptose-Stimuli aktiviert und spalten in mehreren Reaktionsschritten die unterschiedlichsten Substrate und sorgen so für die Weiterleitung der Apoptose-signale innerhalb der Zelle. Generell existieren die Caspasen (z.B. Caspase-1/ICE und Caspase-3/ CPP32 oder Caspase-8/FLICE) als inaktive Proenzyme, die in apoptotischen Zellen eine Prozessierung durch eigene Proteolyse oder mit Spaltung durch andere Proteasen erfahren [5,52].

Caspase-3 (CPP32, Yama, apoptain) ist ein intrazelluläres Schlüsselenzym, das innerhalb der frühen Apoptosestadien aktiviert wird, und dann proteolytisch andere Caspasen schneidet und aktiviert, sowie mit relevanten Bestandteilen des Zytoplasmas (z.B. Bcl-2, D4-GDI) und des Kerns (z.B. PARP) interagiert [27,47,62,99,166,193,194]. Der durchflußzytometrische Nachweis in der aktiven Form dient so als Marker der frühen Apoptose [5,135].

Nach der Abnahme der Monozyten und der Fixierung in 4%igem Paraformaldehyd und einiger Waschschriffe mit Natriumacid, erfolgte zum Pellet die Darreichung von 120 µl Saponin zur Permeabilisierung der Zellmembran zusammen mit 15 µl einer polyklonalen, Phycoerythrin(PE)-konjugierten Antikörper-Lösung (Pharmingen [San Diego,

USA]), wobei die Antikörper nur die aktive Form humaner Caspase-3 erkannten. Die Inkubation dauerte 25 Minuten bei 4-8 °C und schließlich konnte, nach erneuten Waschschrritten mit Natriumacid, der Anteil aktiver Caspase-3 in der Durchflußzytometrie analysiert werden.

2.7.4 Detektion des monozytären Oberflächenrezeptors CD14

Der multifunktionale Rezeptor CD14 ist ein Oberflächenantigen von Monozyten und Makrophagen, welches unter anderem als Bindungsstelle für LPS-Komplexe und zur Interaktion mit anderen apoptotischen Zellen vorliegt. In der Literatur ist allerdings auch aufgeführt, dass ein Anstieg der CD14-Expression Monozyten vor programmiertem Zelltod bewahrt und eine Herunterregulation von CD14 Apoptose verursacht. So ist die Regulation der CD14-Expression ein früher Mechanismus der das Weiterleben oder das Absterben von Monozyten vermittelt und als durchflußzytometrisch messbarer Marker erste Hinweise im Prozeß der Apoptose zu erkennen gibt [64,65,68,96,159].

Nach Ablösen und Waschen mit 0,05%igem Natriumacid wurden die Monozyten 30 Minuten im Kühlschrank bei 4°C mit einem monoklonalem FITC-konjugiertem Antikörper gerichtet gegen menschliches CD14 (Becton Dickinson [Heidelberg, BRD]) inkubiert. Nach der Inkubation und zweimaligem Waschen, konnte dann die Oberflächenexpression an CD14 von je nach Ansätzen vitalen oder apoptotischen Monozyten in der Durchflußzytometrie bestimmt werden.

2.7.5 Detektion der Thrombozytenaktivierung anhand der CD62P-Expression (α -Granula-Sekretion)

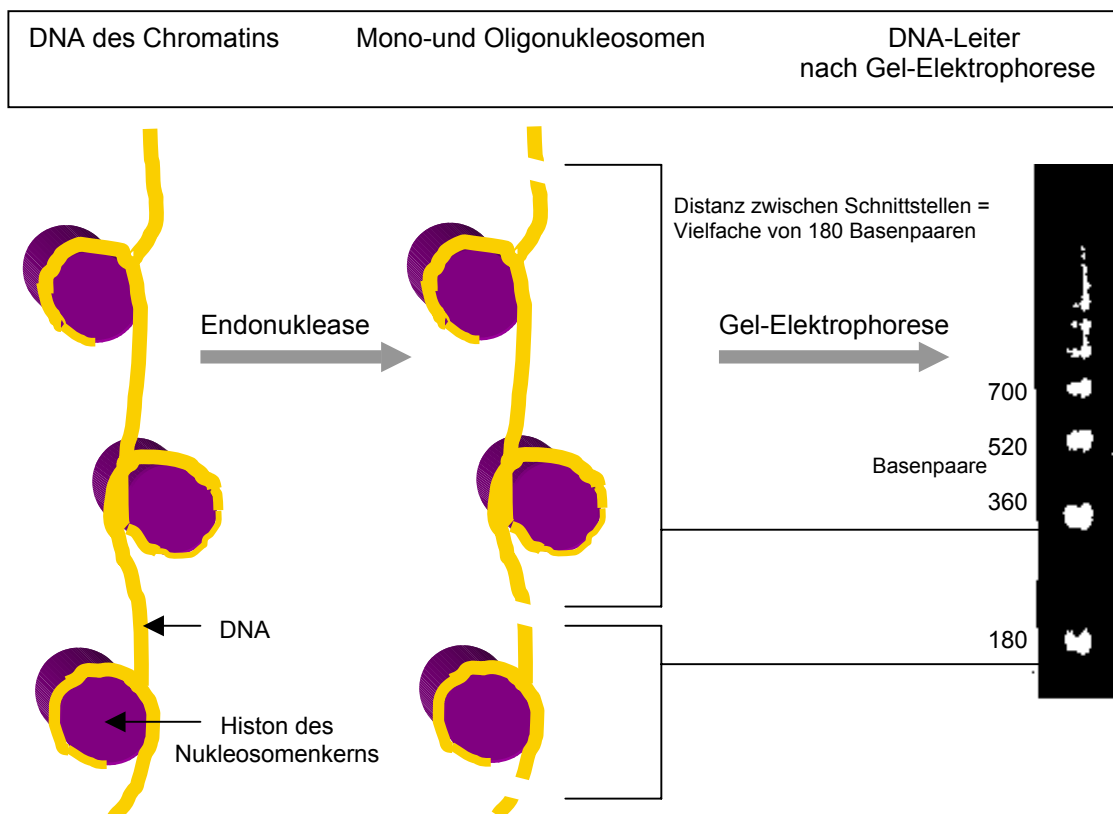
Bei der Aktivierung von humanen Thrombozyten werden aus intrazellulären α -Granula Inhaltsstoffe über das offene thrombozytäre Kanälchensystem transportiert und mit der äußeren Membran verschmolzen. Einer dieser freigesetzten Stoffe ist P-Selektin. Über die Expressionsdichte dieses α -Granulaproteins, auch CD62P und GMP-140 bezeichnet, kann der Aktivierungszustand der Thrombozyten bestimmt werden.

Am Anfang wurde eine Konzentration von 10×10^6 Thrombozyten pro 100 μ l Thrombozytenpuffer in einem 2-ml-Eppendorf-Gefäß eingestellt und 60 Minuten mit 1%igem Paraformaldehyd fixiert. Hieraufhin wurde die Thrombozyten einmalig mit PBS-Puffer ohne Kalzium und Magnesium gewaschen und nach der Sedimentierung durch eine 10 Minuten dauernde Zentrifugation bei $2000 \times g$ erfolgte die Markierung durch einen monoklonalen FITC-gefärbten Antikörper gegen CD62P (Coulter Immunotech [Krefeld, BRD]). Hierzu wurden 10 μ l des anti-CD62P-Antikörpers auf 10×10^6 Thrombozyten in 100 μ l Pufferlösung pipettiert und 60 Minuten bei Raumtemperatur unter Abdunkelung inkubiert. Zum Abstoppen dienten 1 ml PBS-Puffer ohne Kalzium und Magnesium und nach erneuter Zentrifugation und Verwerfung des Überstandes wurden die markierten Thrombozyten in 1 ml Hapes/Tyrode-Puffer aufgenommen und eine durchflußzytometrischen Bestimmung der P-Selektin-Expression auf der Thrombozytenoberfläche durchgeführt [38,91,172].

2.8 Gelelektrophoretischer Apoptosenachweis

Apoptotische Monozyten können mit der Untersuchung der Degradation der DNA detektiert werden. Der DNA-Abbau wird durch Endonukleasen hervorgerufen, die in apoptotischen Zellen induziert werden und die DNA hydrolytisch in Fragmente von 180 Basenpaaren (bp) aufspalten, entsprechend dem Abstand zwischen 2 Nukleosomen. Diese 180 bp-Fragmente können klassischerweise elektrophoretisch als sogenannte DNA-Leiter nachgewiesen werden. Jede „Sprosse“ dieser Leiter hat dann eine Länge von einem Vielfachen des Nukleosoms [27,30].

Abb. 2.7 : DNA-Fragmentation und Gel-Elektrophorese
[modifiziert nach Boehringer, Mannheim, BRD]



Die Isolation der DNA erfolgte gemäß Anleitung (GenomicPrep Cells DNA Isolation Kit (Amersham pharmacia biotech [Freiburg, BRD])). Bei der folgenden Verfahrensweise wurden je Ansatz die DNA von $3-5 \times 10^6$ Zellen extrahiert und auch die hierfür vorgegebenen Volumenzahlen eingesetzt.

Nach der Standardinkubationszeit von 72 h wurden die Monozyten pro Versuchsansatz mit 600 μl Lyse-Reagenz im well abgelöst und in ein 2-ml-Eppendorf-Gefäß gegeben. Der Überstand der wells war zuvor in einem 15-ml-Zentrifugationsröhrchen gesammelt und 10 min bei $2000 \times g$ zentrifugiert und das verbleibende Sediment auch mit einem Teil des Lyse-Reagenz versehen worden. Die Inkubationszeit des dann zusammengeführten Lysepuffers betrug 60 min bei 37°C im Wärmeschrank.

Das Zell-Lysat wurde nun mit 3 μl einer RNase A Lösung für 45 min bei 37°C behandelt. Nach der Abkühlung der lysierten Zellen im Lysepuffer diente die Gabe von 200 μl einer Protein-Präzipitations-Lösung und die Zentrifugation von 3 min bei $16.000 \times g$ der Ausfällung des Proteins, welches eine feste braune Ablagerung am Boden des Zentrifugenröhrchens bildete.

Die überstehende DNA-Lösung wurde in ein neues 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß, das bereits 600 μl 100%igen Isopropanol enthielt, überführt und das ausgefällte Protein wurde verworfen. Nun wurden die Proben etwa 50mal invertiert, bis weiße DNA-Fäden zusehen waren. Danach erfolgte eine Zentrifugation von 2 Minuten bei $16.000 \times g$. Nachdem der Überstand verworfen und das DNA-Sediment kurz getrocknet war, wurde 600 μl 70%iger Ethanol hinzugesetzt und es erfolgte eine gründliche Durchmischung, eine erneute 2-minütige Zentrifugation bei $16.000 \times g$ und eine anschließende Abnahme des Überstandes mit einer Trocknung der Proben für 15 Minuten. Abschließend wurden die Proben nach der DNA-Präzipitation in 60 μl DNA-Konservierung-Puffer über Nacht bei Raumtemperatur rehydriert.

Am folgenden Tag wurde zunächst ein 1,5 % Agarosegel versetzt mit 15 μl Fluoreszenz-Farbstoff Ethidiumbromid mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt und die Elektrophoresekammer mit 1,2 Liter TAE-Puffer aufgefüllt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den aromatischen Ringsystemen der Nukleotide und leuchtet bei Anregung durch UV-Licht rot-orange.

Von den rehydrierten Proben wurden pro Versuchsansatz 25 μl mit 3,75 μl Laufpuffer zur Sichtkontrolle und Probenbeschwerung in einem 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß vermischt und von dieser Suspension 25 μl vorsichtig in die jeweiligen Taschen des Gels einpipettiert. Parallel zu den aufgetragenen Ansätzen wurde als Standard eine DNA 123 bp Leiter (Sigma Chemicals [St. Louis, USA]) als Kontrolle benutzt. Nach dem Eintauchen des Gels in die Flüssigkeit und das Einhängen in die Elektrophoresekammer, betrug die Laufzeit 40 Minuten bei einer Spannung von 120 V. Danach wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer herausgenommen und auf einen UV-Schirm gelegt und das angelagerte Ethidiumbromid mit UV-Licht bestrahlt und die dann aufleuchtenden DNA-Banden und DNA-Leitern wurden abfotografiert [68,88,162,197].

2.9 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Die Monozyten zeigten typische morphologische Veränderungen in den Prozessen der Apoptose und auch Phagozytose, die mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie evaluiert wurden.

Die Monozyten wurden von den 24-well-Kulturplatten heruntergewaschen und die Zellsuspension 10 Minuten bei $2000 \times g$ zentrifugiert und das verbliebene Zellsediment in 1 % Glutaraldehyd mit 0,1 M Natrium-Cacodylat-Salzsäure-Puffer (pH 7,4) für 60 Minuten bei 4 °C fixiert. Danach wurden die Zellen für weitere 60 Minuten in 1 % Osmium-Tetraoxid mit 0,15 M Natrium-Cacodylat-Salzsäure-Puffer nachfixiert. Weiterhin wurden die Zellen gewaschen und durch Zugabe aufsteigender Ethanolkonzentrationen dehydriert und im nächsten Präparationsschritt in Epoxy Resin (Epon 815) eingebettet.

Hiernach erfolgte die Herstellung von ultradünnen Schnitten mit einem Diamantschneider und die Montage auf einem 150 Maschen großem Kupfernetz. Zur Nachbehandlung der Schnitte diente der Einsatz von gesättigtem Uranyl-Acetat für 20 Minuten und von 2%igem Bleicitrat für 1 Minute, je bei Raumtemperatur.

Die Zellen konnten dann mit einem Phillips 410 Elektronenmikroskop bei einer Spannung von 60 kV betrachtet und examiniert werden [68,162].

2.10 Immunfluoreszenzmikroskopie

Neben den transmissions-elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die Monozyten in der Regel mit einem Lichtmikroskop bei 400facher Vergrößerung beobachtet und zudem wurden einige Betrachtungen unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskopes durchgeführt.

Diese Analysen bezogen sich zum einen auf den immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis apoptotischer Zellen mit Einsatz der TUNEL-Methode und zum anderen auf die Darstellung der Phagozytose der Monozyten von Thrombozyten, deren Membran fluoreszierend gefärbt war.

Zunächst wurden die Monozyten in den dargestellten Immunfluoreszenzfärbungen markiert und danach mit einer Cytospin-Zentrifuge auf Objektträgern angehäuft. Hierauf wurde ein Tropfen Glycerin aufgetragen und alles mit einem Deckgläschen bedeckt.

Dann folgte mit Hilfe eines Grün-(FITC)-Filters und einer 600fachen Vergrößerung die Untersuchung der fluoreszierenden Monozyten unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop, je nach den oben beschriebenen Versuchsdurchführungen.

Hierbei wurde immer zunächst eine Kontrollaufnahme im Durchlicht, d.h. ohne Fluoreszenzanregung, durchgeführt, so dass mögliche Artefaktbildungen ausgeschlossen und direkte Vergleiche mit den Fluoreszenzbildern angestellt werden konnten. Der Grün-(FITC)-Filter war bereits bei der Durchlichtfotographie vorgeschaltet, so dass die Fotos einen gewissen Grünstich aufwiesen. Erst hiernach wurden dann in der Immunfluoreszenzmikroskopie die Fluochrome in den Zellen mit einem Laser angeregt und mit Verwendung des Grün-(FITC)-Filter die fluoreszierenden Monozyten abfotographiert.

2.11 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse wurde als Software das Programm Excel von Microsoft Office für Windows'98 angewandt.

Als Lagemaß diente der Mittelwert und als Streuungsmaß die Standardabweichung. Die statistischen Tests für alle parametrischen Daten waren der Student's t-Test und die Varianzanalyse. Unterschiede und zweiseitige Fehlerwahrscheinlichkeiten (p-Werte) wurden auf einem Niveau von $p < 0,05$ als signifikant und von $p < 0,01$ als stark signifikant und von 0,001 als höchst signifikant angesehen und gedeutet.

Alle Experimente wurden mindestens fünfmal durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Suppression der monozytären Apoptose durch Thrombozyten

3.1.1 Protektion monozytärer Apoptose induziert durch Serum-Deprivation durch aufsteigende Anzahlen an Thrombozyten

Die Monozyten wurden in Kulturmedium mit 5 % FCS und mit 0,2 % FCS kultiviert. Nach etwa 20 h Vorinkubation, erfolgte die Zugabe von unterschiedlichen Thrombozytenzahlen. Danach blieben Monozyten und Thrombozyten bis zum Ende der Standardinkubationszeit von 72 h nach dem Aussetzen der Monozyten oder ungefähr 52 h nach dem Hinzufügen der Thrombozyten zusammen. Hierauf folgte der quantitative Apoptosenachweis mittels PI-Färbung. Durch die spezifische Bindung des Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI) an die DNA war die durchflußzytometrisch erfasste Fluoreszenz der Zellen abhängig vom verbliebenen DNA-Gehalt.

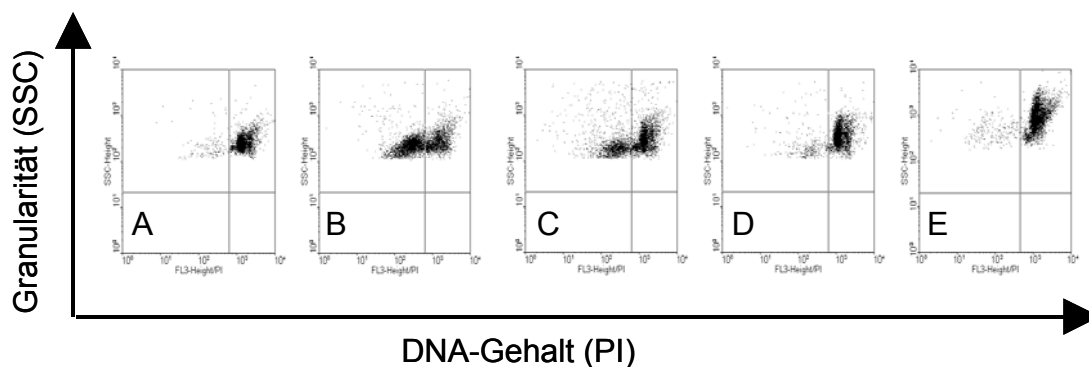


Abb. 3.1 : Darstellung des DNA-Gehaltes (PI) und der Granularität (SSC) von Monozyten kokultiviert mit Thrombozyten im Dotplot

Die Monozyten wurden in Medium mit 5 % (A) und 0,2 % (B) FCS kultiviert und dann mit aufsteigenden Thrombozytenzahlen im Verhältnis 1/10 (C), 1/20 (D) und 1/40 (E) bei 0,2 % FCS kokultiviert.

Es zeigte sich ein hoher PI-Gehalt bei der Probe mit 5 % FCS und eine deutliche Verschiebung in den Quadranten mit wenig PI-Fluoreszenz bei Entzug von FCS (Abb. 3.1 A/B). So wurde beim grundlegenden Ansatz mit 0,2 % FCS ohne Thrombozyten ein insgesamt niedriger DNA-Gehalt und damit eine DNA-Fragmentation detektiert, die auf apoptotische Monozyten hinwies. Mit der Gabe von Thrombozyten zum 0,2 % FCS Ansatz verschob sich die Zellpopulation im Dotplot eindeutig auf die Seite mit intensiver PI-Fluoreszenz, d.h. es lagen mehr Zellen mit hohem DNA-Gehalt und daraus resultierend mehr vitale Monozyten vor. Durch ansteigende Konzentrationen von Thrombozyten im Kulturmedium konnte ein stetiger Anstieg an PI-Fluoreszenz und somit eine Zunahme von Monozyten ohne DNA-Fragmentation und gleichzeitig ein Anstieg der monozytären Granularität (SSC) im Dotplot beobachten werden (Abb. 3.1 C-E).

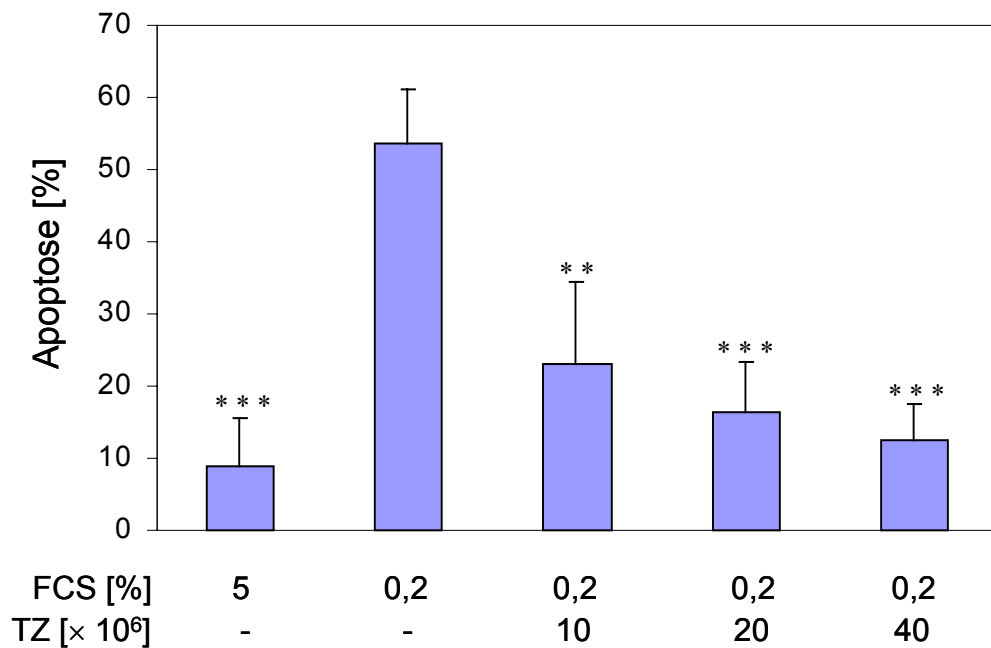


Abb. 3.2 : Monozytäre Apoptose ausgelöst durch deprivierte FCS-Konzentration und die Suppression der Apoptose durch aufsteigende Anzahlen an Thrombozyten (TZ).

Der prozentuale Grad der Apoptose wurde mittels PI-Färbung erfasst. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen von jeweils 14 Messungen angegeben. Eine Signifikanz von ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ war je zum Standardansatz von 0,2 % FCS feststellbar.

Die Berechnung der Daten von 14 Versuchen ergab einen etwa fünffachen Anstieg der Apoptoserate der Monozyten bei 0,2 % FCS im Vergleich zum Ansatz mit 5 % FCS im Kulturmedium nach einer Standardinkubationszeit von 72 h (Abb.3.2).

Das Hinzufügen von Thrombozyten beim 0,2 % FCS-Ansatz im Verhältnis 1/10 verringerte den Apoptosegrad der Monozyten stark signifikant. Eine Verdopplung und Vervierfachung der Thrombozytenanzahl führte zu einer weiteren höchst signifikanten Abnahme der mit PI-Färbung ermittelten Apoptoserate.

Insgesamt konnte die monozytäre Apoptose, ausgelöst durch Deprivation von Serum, durch die Gabe von unterschiedlichen Thrombozytenzahlen konzentrationsabhängig supprimiert werden.

3.1.2 Auswirkung der Koinkubationszeit mit Thrombozyten auf die Apoptoseprotektion von Monozyten

Zur Untersuchung, wie viel Einwirkungszeit der Thrombozyten auf die Monozyten erforderlich ist, um einen Schutzeffekt auf die Apoptose der Monozyten auszuüben, wurden Monozyten und Thrombozyten im Zeitraum von 2, 20 oder 45 Stunden gemeinsam inkubiert. Bei der Kokultivierung von 2 h oder 20 h wurde nach dieser Zeit der Überstand aus dem Well entfernt und neues Kulturmedium mit 0,2 % FCS ohne Thrombozyten hinzugefügt und die Monozyten weiter bis zur Standardinkubationszeit von insgesamt 72 h nach dem Aussetzen der Zellen in Kultur gehalten. Die gemeinsame Inkubation von 52 h entsprach der standardgemäßen Kokultivierung. Das Anfärben mit PI diente der Apoptosemessung.

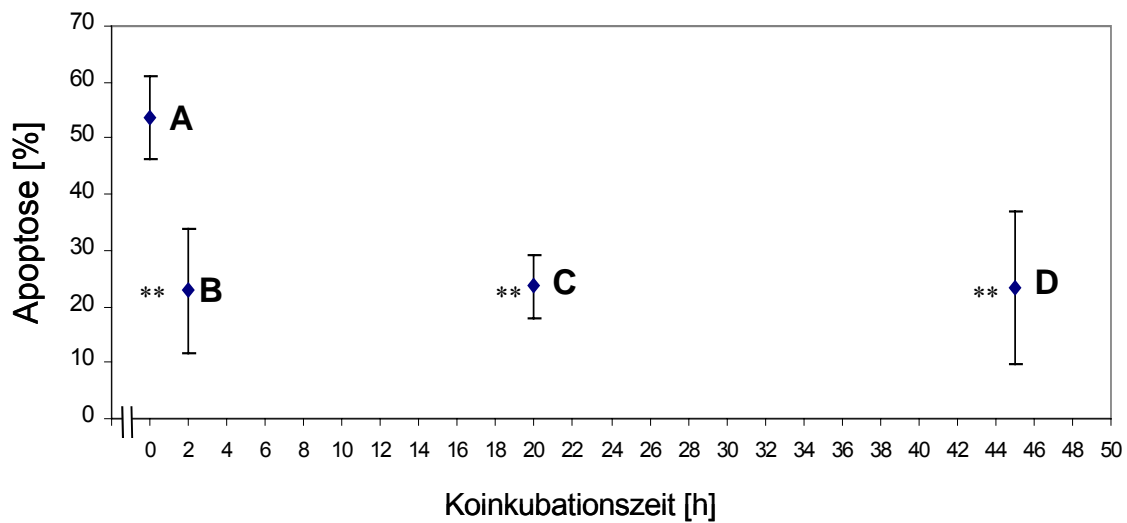


Abb. 3.3 : Einfluss der Koinkubationszeit von Monozyten mit Thrombozyten auf die Apoptose der Monozyten.

Die Monozyten wurden entweder 72 h allein in 0,2 % FCS (A) kultiviert oder in 0,2 % FCS 2 h (B), 20 h (C) oder 45 h (D) gemeinsam mit 10×10^6 Thrombozyten inkubiert.

Die Apoptoserate wurde je nach 72 h mittels PI-Färbung errechnet.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz betrug ** $p < 0,01$.

Wieder konnte eine stark signifikante Reduzierung der monozytären Apoptoserate bei Gabe von Thrombozyten über die basale Kokultivierungszeit von ca. 45 h im Bezug auf den Kontrollansatz mit 0,2 % FCS aufgezeigt werden (Abb. 3.3 D). Aber auch in den Zeitintervallen von sogar nur 2 h oder 20 h der gemeinsamen Inkubation, war eine stark signifikante Supprimierung des Apoptosegrades der Monozyten in gleicher Weise erkennbar (Abb.3.3 B/C).

Auch wenn in den meisten Versuchsdurchführungen eine Kokultivierungszeit von etwa 45 h eingehalten wurde, so schien eine Einwirkungszeit der Thrombozyten auf die serumreduzierten Monozytenkultur von nur 2 h auszureichen, um denselben Schutzeffekt auf die monozytäre Apoptose auszulösen.

3.1.3 Expression von CD95/FAS auf Monozyten

Zu Beginn dieser Versuchserie wurde der CD95/FAS-Rezeptor-Nachweis auf Monozyten geführt. Hierbei fand eine 72-stündige Inkubation der Monozyten in Medium mit 5 % FCS und eine Stimulation einiger Ansätze mit Interferon γ ($\text{IFN}\gamma$) in einer Konzentration von 100 ng/ml statt. Der CD95/FAS-Rezeptor wurde dann mit einem spezifischen PE-konjugiertem IgG_1 Antikörper nachgewiesen. Als Kontrolle wurde zusätzlich ein unspezifischer IgG_1 Antikörper (Isotypenkontrolle), der auch mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE markiert war, eingesetzt.

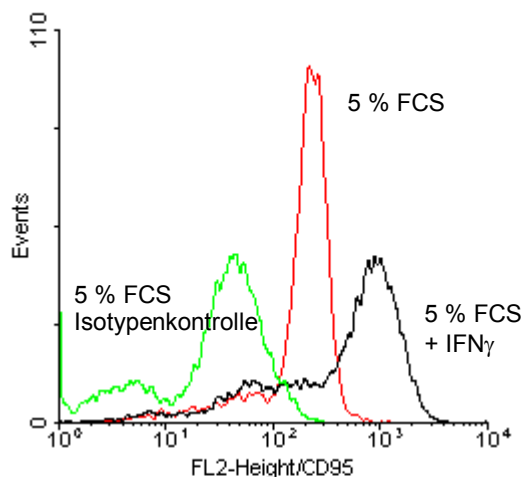


Abb. 3.4 : Histogrammdarstellung des CD95/FAS-Rezeptor auf Monozyten.

Nachweis bei 5 % FCS und Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$.

Als Isotypenkontrolle diente ein unspezifischer IgG_1 -Antikörper.

Es war mit dem spezifischen Antikörper eine basale CD95-Expression der Monozyten in Kulturmedium mit 5 % FCS anhand der Signalintensität belegbar. Auch der Unterschied zwischen dem unspezifischen Antikörper (Isotypenkontrolle), der allgemeine Bindungsstellen für IgG_1 auf Monozyten anfärbte, und dem spezifischen Antikörper, der hauptsächlich die CD95/FAS-Antigene erkannte, wurde aufgezeigt.

Die logarithmische Verschiebung des Histogramms in Richtung erhöhte Fluoreszenzintensität bei der Stimulation der Monozyten mit Interferon γ ließ eine starke Erhöhung der basalen CD95-Expression ausmachen.

3.1.4 Suppression der Apoptose von Monozyten induziert durch α CD95/FAS mAb durch Thrombozyten

Ein wichtiger Induktor des programmierten Zelltodes war die Interaktion zwischen dem gegen CD95/FAS gerichteten, monoklonalen Antikörper und dem Rezeptorprotein CD95/FAS. Die Monozyten wurden in Kulturmedium mit 5 % FCS mit dem α CD95/FAS-Antikörper mit einer Konzentration von 500 ng/ml stimuliert. Nach der Vorinkubation von 20 h wurden 10×10^6 Thrombozyten zugegeben und nach einer gemeinsamen Kultivierung bis zu einer Standardinkubationszeit von 72 h wurde der Grad der Apoptose mittels PI-Färbung bestimmt.

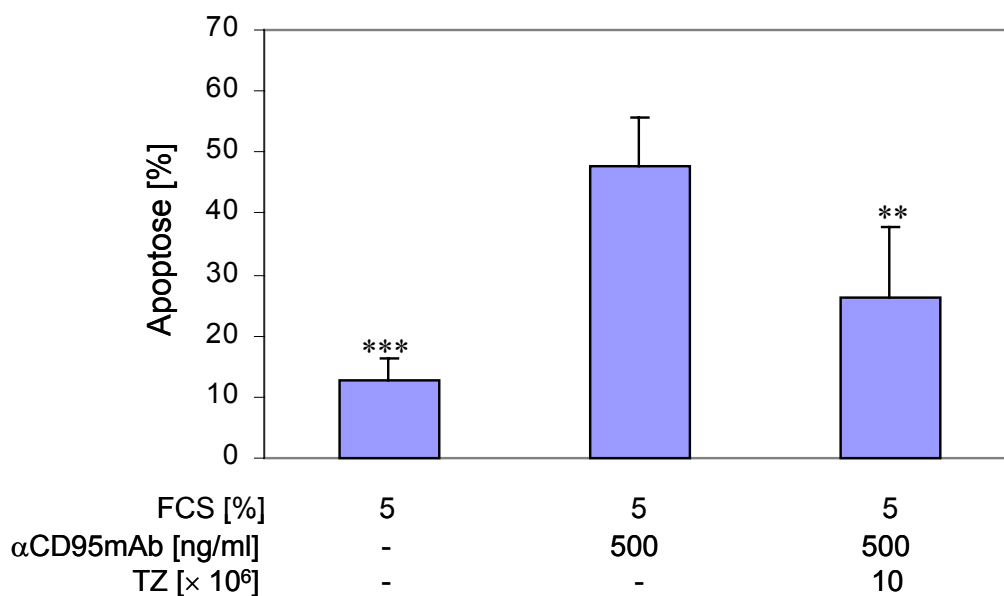


Abb. 3.5 : Apoptose durch Stimulation mit α CD95/FAS mAb und Schutzeffekt durch Thrombozyten (TZ).

Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen von 8 unabhängigen Experimenten angegeben. Die Signifikanz betrug ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Die Vitalität der Monozyten in Kulturmedium mit 5 % FCS wurde durch die geringe Apoptoserate verdeutlicht. Durch die Stimulation mit α CD95/FAS mAb konnte ein deutlicher, prozentualer Anstieg an apoptotischen Monozyten induziert werden (Abb. 3.5). Auch hier war eine stark signifikante Reduzierung des Grades an monozytärer Apoptose bei Gabe von Thrombozyten feststellbar.

3.1.5 Einfluss von Thrombozyten auf die monozytäre Apoptose induziert durch IL-4

Da Interleukin 4 (IL-4) als apoptoseinduzierende Agenz bei Monozyten diskutiert wird, wurde als weiterer Stimulus zur Anregung monozytärer Apoptose die Einwirkung von Interleukin 4 mit einer Konzentration von 10 U/ml auf Monozyten in Kulturmedium mit 5 % FCS geprüft. Anschließend wurde wiederum der thrombozytäre Effekt getestet. Mit der PI-Färbung wurde der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen ausgewertet.

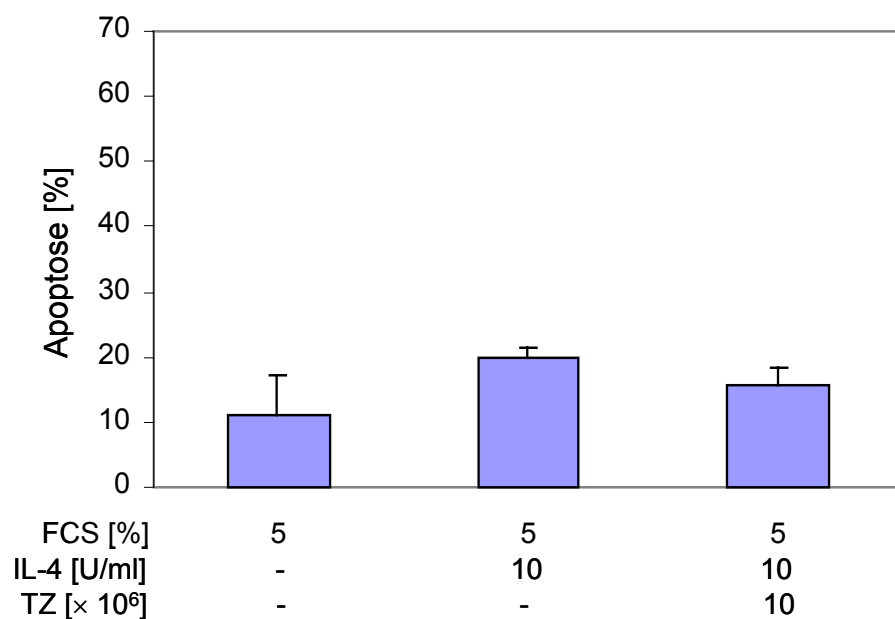


Abb. 3.6 : Auslösung von Apoptose durch Inkubation von Interleukin 4 (IL-4) und Effekt der Thrombozyten (TZ).

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 5 Versuchen.

Durch die Stimulation mit Interleukin 4 konnte eine gewisse Erhöhung der Apoptose-rate in Bezug auf den Kontrollansatz mit 5 % FCS erkannt werden (Abb. 3.6). Weiterhin wurde durch die Thrombozyten diese Apoptoseinduktion geringfügig aufgehoben. Sowohl die Apoptoseauslösung mit Interleukin 4, als auch der Schutzeffekt durch die Thrombozyten bewegen sich im Rahmen von 5-10 % Unterschied im Grad der Apoptose und waren jeweils zum Ansatz mit 5 % FCS nicht signifikant.

3.2 Nachweis monozytärer Apoptose mittels TUNEL und die Effekte der Thrombozyten

Durch die apoptotische DNA-Fragmentierung entstehen zahlreiche 3'-Hydroxyl-Enden in der DNA. Das exogene Enzym terminale Deoxynukleotidyltransferase markiert mit fluoreszenzgekoppelten Nukleotiden diese einzel- oder doppelsträngigen Bruchstellen. Diese können durchflußzytometrisch gemessen und im Histogramm ausgewertet oder im Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Monozyten wurden in den Standardansätzen mit 5 % FCS, 0,2 % FCS und 5 % FCS mit α CD95/FAS mAb in Kultur gehalten und bei den beiden letztgenannten Ansätzen auch mit 10×10^6 Thrombozyten kokultiviert. Allerdings betrug hier die Gesamtkubationszeit nur 36 h, da die Veränderungen früh auftraten.

In den Histogramm-Darstellungen diente je Ansatz eine Probe, die ohne fluoreszenzkonjugierte Nukleotide im TUNEL-Assay behandelt worden war, als ungefärbte Kontrolle. Die FITC-konjugierten Proben ließen per se eine Verschiebung in Richtung höherer Signalintensität erkennen. Ferner wurde bei der Auswertung ein Marker in etwa bei Beginn des zweiten Kurvengipfels bei hoher Fluoreszenzintensität hineingelegt und immer gleich belassen. Die Prozentzahlen gaben die relativen FITC-Signale unter dem Marker und damit einen vergleichenden Grad der Apoptose an.

Aus den Analysen der Histogramme konnte registriert werden, dass beim vitalen Ansatz mit 5 % FCS nur sehr wenige Bruchstellen der DNA vorlagen. Hingegen war bei den Ansätzen mit 0,2 % FCS und 5 % FCS mit α CD95/FAS mAb ein zweiter Gipfel der Kurve bei hoher Signalintensität und damit ein deutliches Ausmaß an DNA-Fragmentierung bemerkbar (Abb. 3.7). Mit der Zugabe von Thrombozyten verringerte sich die Apoptoserate der Monozyten wieder. Die Fotos aus der Immunfluoreszenzmikroskopie untermauerten die graphischen Aussagen (Abb. 3.7). Sie wiesen im Vergleich zum basalen Ansatz mit 5 % FCS relativ viele FITC-markierte Monozyten bei den Proben mit Apoptoseauslösung auf. Bei Thrombozytengabe konnte nur wenige fluoreszierende Zellen lokalisiert werden.

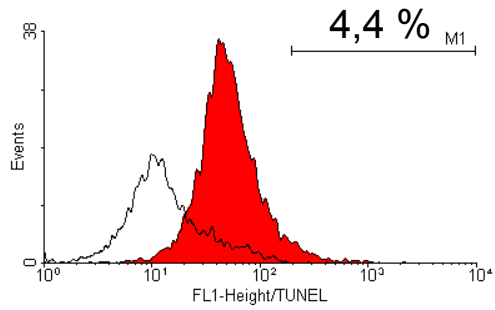
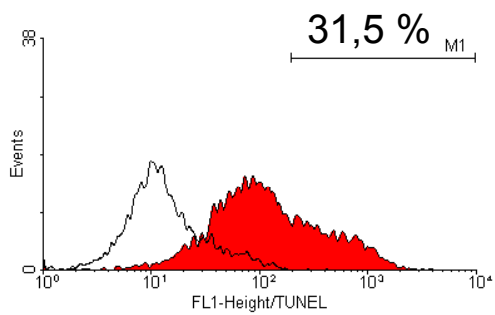
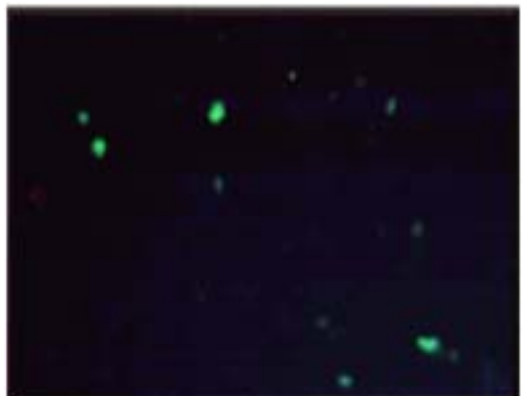
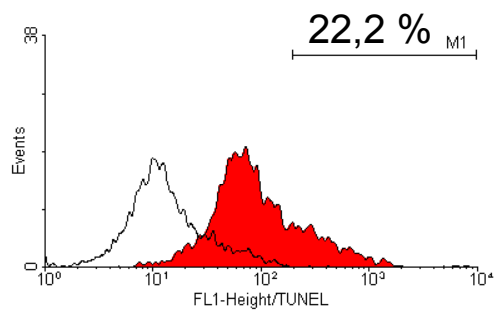
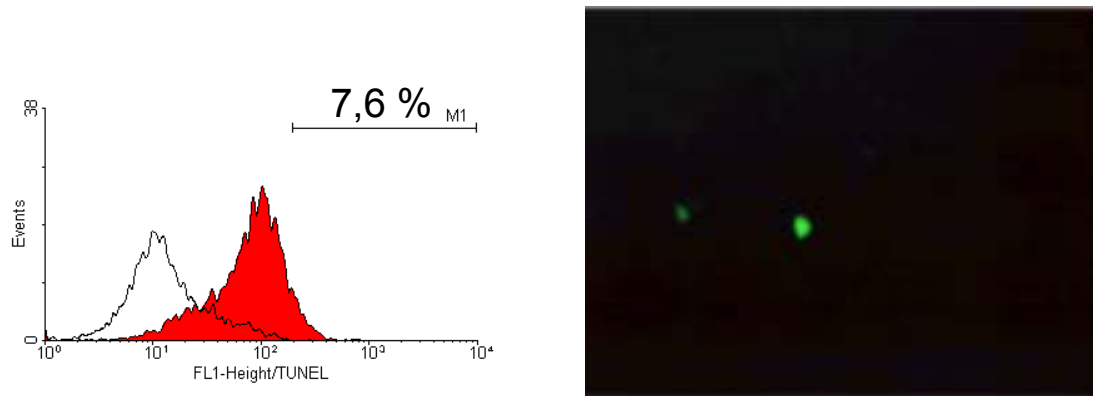
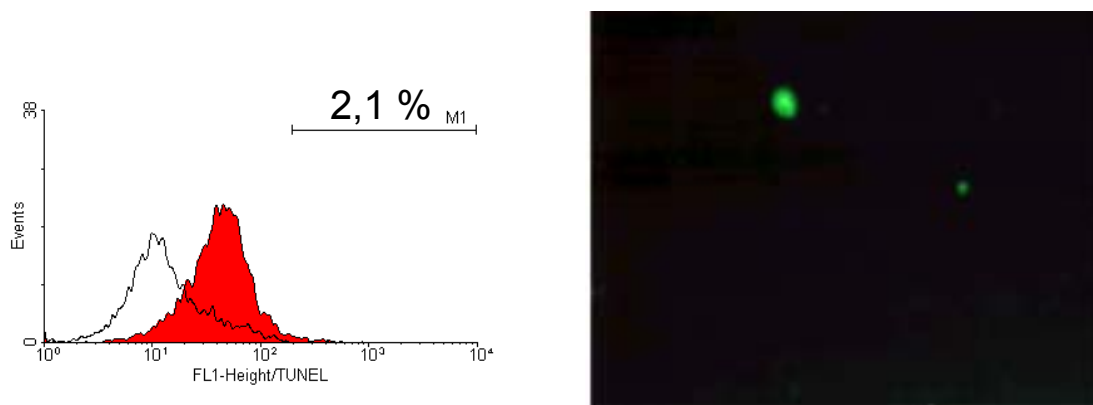
Abb. 3.7.1: Monozyten in 5 % FCS**Abb. 3.7.2: Monozyten in 0,2 % FCS****Abb. 3.7.3: Monozyten in 5 % FCS + α CD95 mAb**

Abb. 3.7.4: Monozyten in 0,2 % FCS + Thrombozyten**Abb. 3.7.5: Monozyten in 5 % FCS + α CD95 mAb + Thrombozyten****Abb. 3.7 : Linksseitig : Darstellung apoptotischer DNA-Fragmentierung bei Monozyten im Histogramm mit Hilfe der TUNEL-Methode.**

Die ausgefüllte Histogramm-Kurve entspricht jeweils der Signalintensität des Ansatzes im Gegensatz zur linken Histogramm-Kurve, die eine ungefärbten Kontrolle veranschaulicht. Die Zellen mit hoher Fluoreszenzintensität waren apoptotisch und konnten durchflußzytometrisch quantifiziert werden.

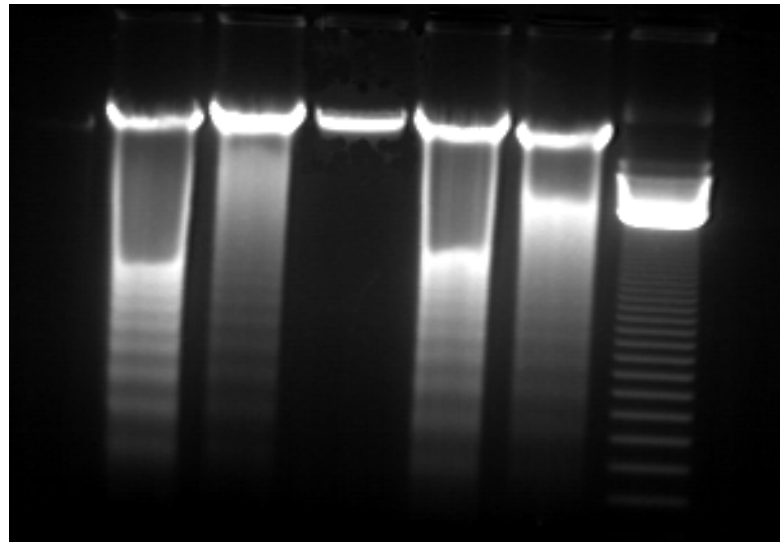
Rechtsseitig : Fotos von immunfluoreszierenden apoptotischer Monozyten.

Bei der TUNEL-Methode wurden 3'-Hydroxyl-Enden der fragmentierten DNA von Monozyten im Prozeß des natürlichen Zelltodes mit FITC-markierten Nukleotiden konjugiert. Diese Grünfärbung der markierten DNA-Fragmente wurde im Immunfluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung abfotografiert.

3.3 Gelelektrophoretischer Apoptose-Nachweis von Monozyten und die Effekte von Thrombozyten

Während der Apoptose kommt es typischerweise zu einer Degradation der DNA, die durch eine hydrolytische Fragmentation der DNA durch Endonukleasen hervorgerufen wird. Die internukleosomale Spaltung der chromosomalen DNA erfolgt in unterschiedlich große Fragmente. In der elektrophoretischen Auftrennung werden diese Fragmente in einer erkennbaren Leiter reflektiert.

Die Inkubation der Monozyten und die Kokultivierung mit Thrombozyten fand in den Standardansätzen in einer Gesamtzeit von 72 h statt.



FCS [%]	0,2	0,2	5	5	5	Standard
α CD95 mAb [ng/ml]	-	-	-	500	500	123 bp
TZ [$\times 10^6$]	-	10	-	-	10	

Abb. 3.8 : Prüfung der monozytären Apoptose anhand der DNA-Gelelektrophorese.

Repräsentative Abbildung für 5 unabhängige Versuche.

Die DNA von Monozyten, die in 0,2% FCS kultiviert wurden, zeigte eine deutliche Bandenbildung und diese gibt eine starke DNA-Fragmentation wider, wohingegen die Zugabe von Thrombozyten zu den serumdeprivierten Monozyten eine schwach ausgebildete DNA-Leiter erkennen ließ (Abb. 3.8 Spur 1 und Spur 2). Der Ansatz mit in 5 % FCS kultivierten Monozyten ließ keine DNA-Auftrennung erkennen (Abb. 3.8 Spur 3). Bei der Induktion der Apoptose von Monozyten durch die Applikation von α CD95/FAS mAb wurde der internukleosomale Zerfall der DNA belegbar (Abb. 3.8 Spur 4). Im Vergleich dazu konnte bei der Kokultivierung von Thrombozyten zu den mit α CD95/FAS mAb stimulierten Monozyten eine schwache Bandenbildung und somit eine geringere DNA-Fragmentation beobachtet werden (Abb. 3.8. Spur 5).

Durch die jeweilige Zugabe von Thrombozyten zeigte sich also insgesamt eine deutlich weniger stark ausgebildete DNA-Fragmentierung und damit ein geringerer Apoptosegrad.

3.4 Frühe monozytäre Apoptosestadien und die Auswirkungen von Thrombozyten

3.4.1 Einfluss von Thrombozyten auf die CD14-Expression von apoptoseinduzierten Monozyten

Die Regulation der Expression des multifunktionalen Oberflächenantigens CD14 von Monozyten kann erste Hinweise im Prozeß der Apoptose zu erkennen geben. So haben Studien den Nachweis erbracht, dass ein Anstieg der CD14-Expression mit einer Bewahrung der Monozyten vor programmierten Zelltod und eine Herunterregulation von CD14 mit einer gesteigerten Apoptose einhergeht.

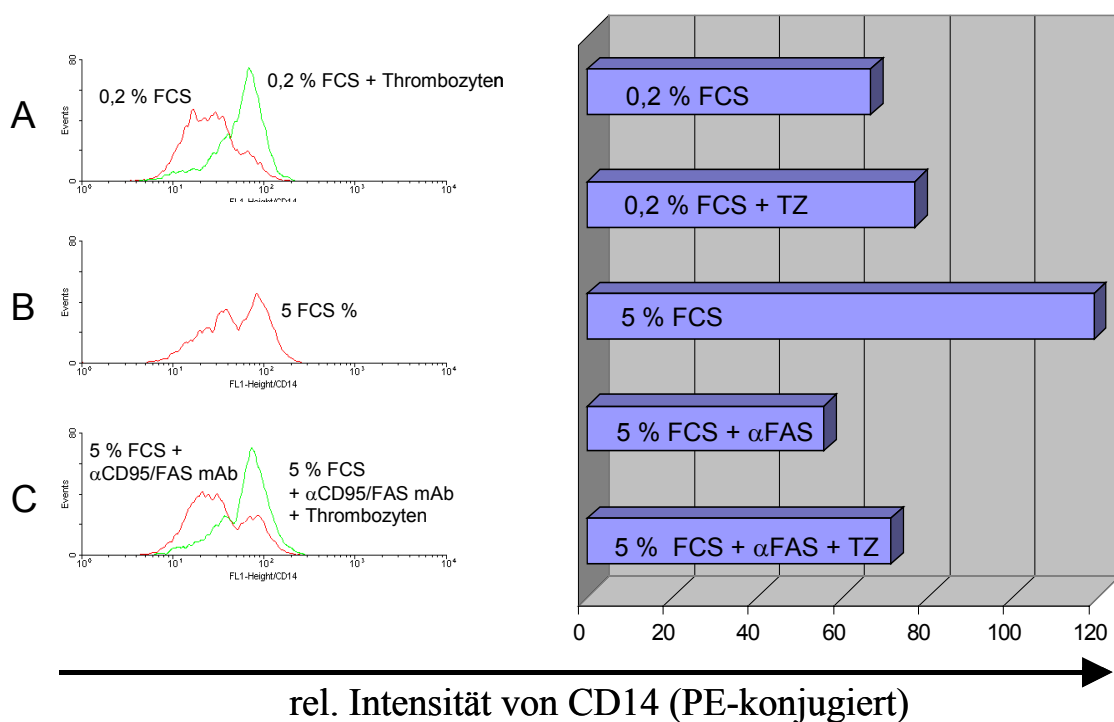


Abb. 3.9 : Effekte von Thrombozyten auf die CD14-Expression von Monozyten

Im Vergleich Monozyten in 0,2 % FCS ohne und mit Thrombozyten (A), Monozyten in 5 % FCS (B) und Monozyten in 5 % FCS + α CD95/FAS mAb ohne und mit Thrombozyten (C). Exemplarische Histogramme sowie Querbalkendiagramme aus den Mittelwerten von 6 unabhängigen Versuchen. Die Abszisse zeigt die relative Fluoreszenzsignalintensität an.

In dem Ansatz, bei dem 5% FCS supplementiert wurde, konnte eine starke CD14-Expression der Monozyten detektiert werden (Abb. 3.9. B). Im Vergleich hierzu zeigten die Ansätze mit 0,2% FCS mit oder ohne Thrombozyten sowie die Ansätze mit α CD95/FAS mAb mit oder ohne Thrombozytengabe parallel zur gesteigerten Apoptoserate eine verminderte monozytäre CD14-Expression, wobei jeweils eine Erhöhung der Signalintensität an fluoreszenzmarkierten CD14-Rezeptoren auf den Monozyten bei der Gabe von Thrombozyten zu beobachten war (Abb. 3.9 A und C). Die Zusammenfassung der Einzelversuche und die Darbietung im Querbalkendiagramm verdeutlicht ergänzend die aufgeführten Aussagen.

3.4.2 Einfluss von Thrombozyten auf die intrazelluläre Caspase-3-Aktivität von apoptoseinduzierten Monozyten

Verschiedene Caspasen sind bekannt, sehr frühe Stadien der Apoptose zu vermitteln. Die Caspasen werden als Proenzyme synthetisiert, proteolytisch aktiviert und spalten selber in mehreren Reaktionsschritten die unterschiedlichsten Substrate. Caspase-3 ist dabei ein intrazelluläres Schlüsselenzym, das bei der Auslösung von Apoptose durch unterschiedliche Effektoren verantwortlich ist. Der durchflußzytometrische Nachweis der Caspase-3 in der aktiven Form mit Hilfe eines polyklonalen PE-konjugierten Antikörper diente so als Marker der frühen Apoptose.

Hierzu wurden die Monozyten mit einem verminderten Serumanteil des Mediums und in Gegenwart von α CD95/FAS mAb als Apoptosestimuli inkubiert und es wurde der Einfluss von Thrombozyten über eine kürzere Gesamtinkubationszeitraum von 36 h auf die Caspase-3-Aktivierung durchflußzytometrisch untersucht.

Zunächst wurde ein signifikant höheres Vorliegen an aktiver Caspase-3 bei den durch Serumentzug (Abb. 3.10 A) oder Applikation von α CD95/FAS mAb (Abb. 3.10 B) apoptoseinduzierten Monozyten im Gegensatz zu den vitalen Zellen bei 5 % FCS auffällig. So konnte beim Ansatz mit 0,2 % FCS in Bezug auf den Ansatz mit 5 % FCS kultivierten Monozyten eine Verdopplung der Signalintensität gemessen werden. Durch zusätzliche Gabe von Thrombozyten konnte die Caspase-3-Aktivierung und damit die Apoptoserate deutlich gesenkt werden (Abb. 3.10 A). Bei den Ansätzen mit α CD95/FAS mAb stimulierten Monozyten führte eine Kokultivierung mit Thrombozyten dagegen zu keiner signifikanten Reduktion der aktiven Form der Caspase-3 (Abb. 3.10 B).

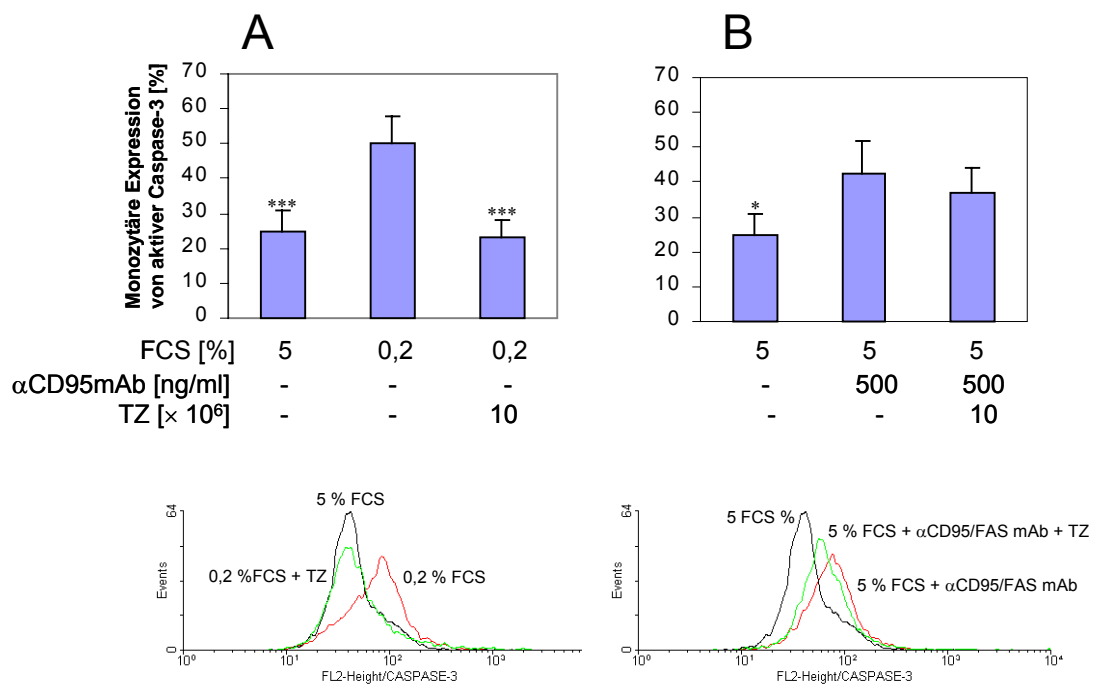


Abb. 3.10 : Durchflußzytometrische Messung der aktiven Form an Caspase-3 im Zytoplasma von Monozyten.

Die Bestimmung der Caspase-3-Aktivierung erfolgte bei mit 5 % FCS oder 0,2% FCS kultivierten bzw. mit αCD95/FAS mAb stimulierten Monozyten mit oder ohne Zugabe von Thrombozyten (TZ).

Die Diagramme zeigen die relativen Signalintensitäten aus 7 berechneten Versuchen mit einer Signifikanz von *** $p < 0,001$ und * $p < 0,05$.

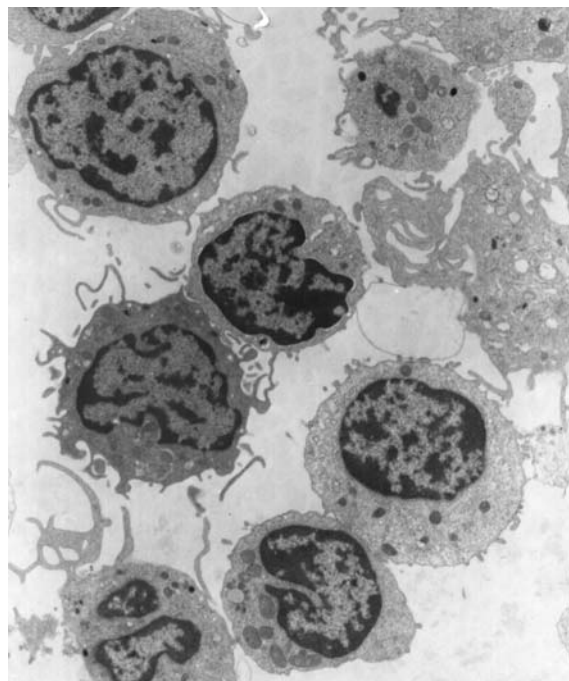
Die exemplarischen Histogramme beinhalten je drei überlappende Kurven der Standardansätze.

3.5 Untersuchungen unter Anwendung der Transmissions-Elektronenmikroskopie

Als erstes wurde die Morphologie von vitalen Monozyten und Thrombozyten beobachtet. Danach wurden zum einen die typischen morphologischen Kennzeichen der Apoptose, ausgelöst durch Serumdeprivation und Stimulation mit α CD95/FAS mAb, und zum anderen die zellulären Veränderungen im Prozess der Phagozytose bei Gabe von Thrombozyten und bei der Verwendung von Latex-Partikeln analysiert.

Abb. 3.11.1 :

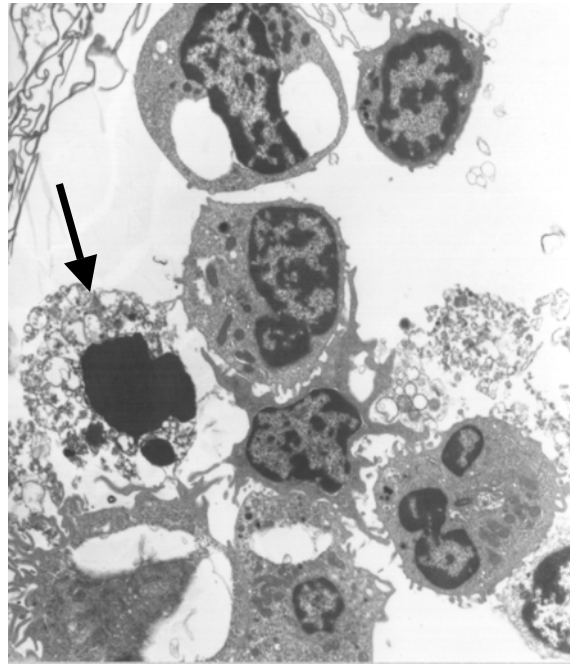
Monozyten bei 5 % FCS
(Vergrößerung von 3400fach)



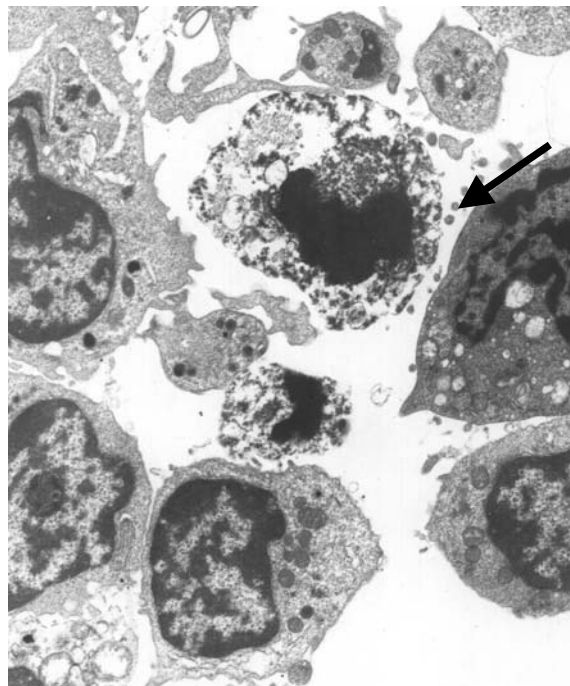
Vor allem war der kennzeichnende große bohnenförmige Kern der Monozyten zu erkennen. Die Zellkerne mit einem lockeren Chromatingerüst zeigten eine meist gelappte, eingekerbte und unregelmäßige Form und trotz der ausgedehnten Zelloberflächen (Größe 10-15 μ m) lag die Kern-Plasma-Relation eindeutig auf der Seite des Kerns. Im Zytoplasma konnten gut entwickelte Organellen detektiert werden, wie zahlreiche Mitochondrien und ein ausgeprägter Golgi-Apparat, sowie elektronendichte Granula, welche Lysosomen entsprachen, die unter anderem Enzyme wie z.B. Lysozym, saure Hydrolasen oder Peroxidasen u.v.a. enthalten. Außerdem waren an den äußeren Zellmembranen zahlreiche Mikrovilli und Ausstülpungen zu sehen (Abb. 3.11.1).

Abb. 3.11.2 :

Monozyten bei 0,2 % FCS
(Vergrößerung 3400fach)

**Abb. 3.11.3 :**

Monozyten bei 5 % FCS
und mit α CD95/FAS mAb
(Vergrößerung 3400fach)



In den TEM-Fotos der Monozyten, die mit 0,2 % FCS oder 5 % FCS in Gegenwart von α CD95/FAS mAb kultiviert wurden, zeigten sich verschiedene morphologische Anzeichen der Apoptose (Abb.3.11.2 und Abb. 3.11.3).

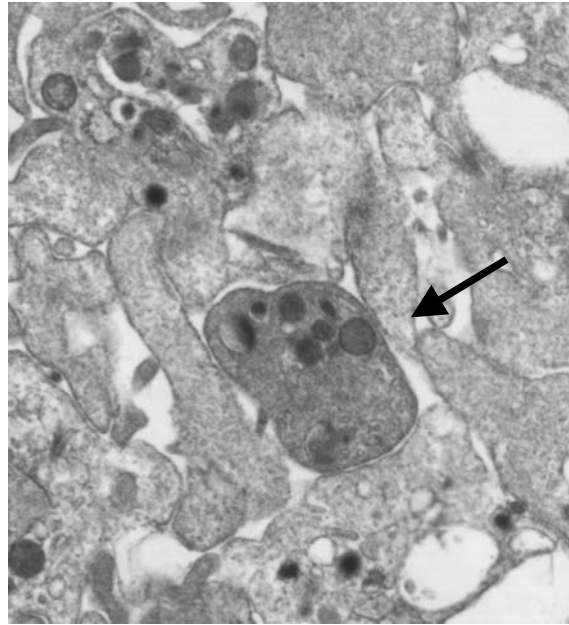
Die Zellvolumina waren teilweise reduziert, wenngleich die intrazellulären Organellen größtenteils noch intakt erschienen. In einigen Zellkernen zeigte sich eine Aggregation des Chromatins und die damit verbundene elektronenmikroskopische Verdichtung des Zellkerns. Neben der nukleären konnte auch eine zytoplasmatische Verdichtung erfasst werden. Im Zytoplasma wurden Bläschen und die randständige Formation von sogenannten apoptotischen Körperchen aus unterteilten Kern- und Plasmabestandteilen als Zeichen der Fragmentation der Zellen registriert. Als weiteres Merkmal apoptotischer Zellen zeigten sich nur noch vereinzelt fingerartige Ausstülpungen an der unversehrten, aber gekräuselten Zellmembran.

Allerdings konnte bei bestimmten Monozyten auch eine Chromatinverklumpung, eine Degeneration der Organellen und des Zytoplasmas und ein Verlust an Membranintegrität gesehen werden. Dies waren dann eher Kennzeichen sehr später Apoptosestadien oder der terminierten sekundären Nekrose.

Auf den TEM-Aufnahmen sind neben den apoptotischen Zellen auch noch vitale Zellen und präparationstechnische Artefakte an intrazellulären Veränderungen oder Zellschrott zu verzeichnen (Abb.3.11.2 und Abb. 3.11.3).

Abb. 3.11.4 :

Thrombozyten bei 0,2 % FCS
(Vergrößerung 10500fach)

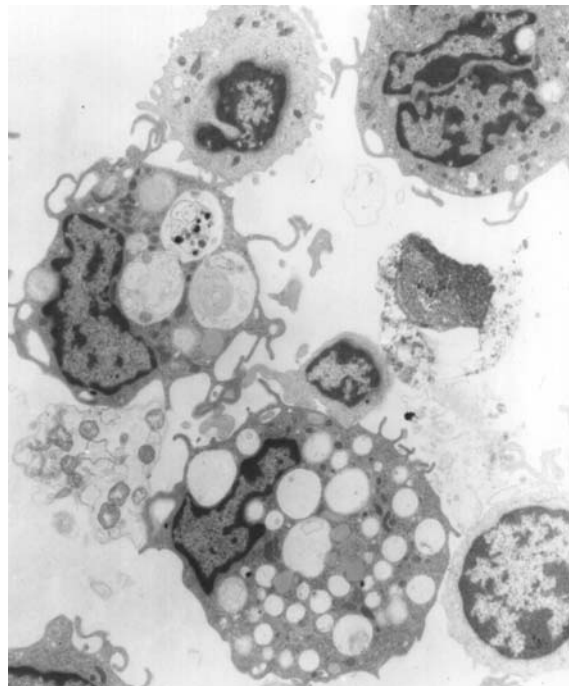


In der Mitte der unteren Hälfte der Aufnahme war ein kernloser Thrombozyt zu sehen (Ab. 3.11.4). Dieser wies im nichtaktivierten Zustand eine typische diskoidale Form auf. Im zentralen Zytoplasma konnte eine unterschiedlich elektronendichte Granulation festgestellt werden. Diese bestand aus α -Granula, die zahlenmäßig am meisten vorhanden sind und verschiedenste Proteine für eine Reihe von biologischen Funktionen (z.B. Adhäsion, Aggregation) beinhalten, und ferner aus lysosomalen Granula, die hydrolytische Enzyme ähnlich den Lysosomen enthalten, und aus elektronenoptisch dichten Granula, die eine Reihe von niedermolekularen Verbindungen (z.B. ADP, ATP, Serotonin, Ca^{2+}) zum Inhalt haben. Ferner wurden im marginalen Zytoplasma Anschnitte von Mikrotubuli in unterschiedlichen Verlaufsrichtungen, die zum ausgeprägten kanalikulären Membransystem gehören, identifiziert.

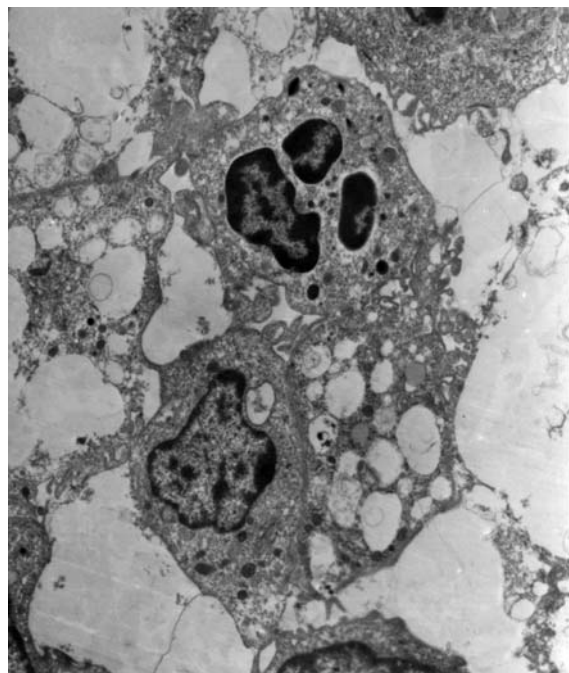
In anderen Teilen der Aufnahme waren zahlreiche deformierte und degranulierte Thrombozyten zu erkennen und in der obersten linken Ecke des hochaufgelösten TEM-Fotos entpuppte sich ein ganzes Konglomerat an verschiedenen Granula wahrscheinlich als ein Thrombozytenaggregat. Diese thrombozytären Klumpen konnten zum einen durch Aktivierung der Thrombozyten und zum anderen einfach durch die Aufbereitung bei der Präparation der Schnitte bedingt sein.

Abb. 3.11.5 :

**Monozyten bei 0,2 % FCS
und Gabe von Thrombozyten**
(Vergrößerung 3400fach)

**Abb. 3.11.6 :**

**Monozyten bei 5 % FCS
und mit α CD95/FAS mAb
und Gabe von Thrombozyten**
(Vergrößerung 3400fach)



Auf den ersten Blick wurde bei den untersuchten Monozyten, kultiviert in 0,2 % FCS mit Thrombozyten, eine ausgesprochene Vielzahl an größeren Vakuolen, verschiedenen Granula und Einschlüssen sichtbar (Abb.3.11.5). Bei genauerer Betrachtung insbesondere der mittleren Zelle konnte eine Assoziation zwischen den ovalen, dekompenzierten und intrazellulären Partikeln und der elektronenmorphologischen Struktur von Thrombozyten hergestellt werden. In den intrazytoplasmatischen Thrombozyten der mittleren Zelle waren nur noch sehr wenige elektronendichte Granula, dafür aber ein aufgelöstes Membransystem auffindig zu machen. Auch wurde in dem unteren Monozyten die Fusionierung von monozytären Granula und Lysosomen, die Zersetzungsenzyme wie saure Hydrolasen, neutrale Proteasen, Peroxidasen und Lysozym enthalten, mit den eingeschlossenen thrombozytären Partikeln nachweisbar. Hier herrschte anscheinend bereits ein weitergehender Abbau vor, da kleinere Proportionen der aufgenommenen Teilchen vorlagen. Außerdem wurden offensichtlich die Zellkerne der Monozyten durch die zytoplasmatischen Umbauprozesse im Rahmen der Ingestion an den Zellmembranrand abgedrängt.

Allerdings konnten trotz der Serumdeprivation keinerlei Hinweise auf Apoptose gefunden werden. Die Zellkerne waren intakt und die Zellmembran erschien mit den gewohnten Ausstülpungen (Abb.3.11.5).

Parallel zu den beschriebenen intrazellulären Veränderungen bei Deprivation von Serum und Thrombozytengabe stellte sich das Bild beim Ansatz mit 5 % FCS und α CD95/FAS mAb sowie mit Gabe an Thrombozyten dar (Abb.3.11.6). Hierbei waren auf den TEM-Aufnahmen auch die eingeschlossenen korpuskulären Elemente bei Abbauprozessen durch z.B. lysosomale Enzyme lokalisierbar, wenngleich bei dem vorliegenden Fotoausschnitt nicht die gleiche Vielzahl wahrnehmbar war. Die zweidimensional ovalen und elektronendurchgängigen Einschlüsse zeigten nur noch vereinzelte, zwiebelschalenartig angehäufte Membranen und kaum intrakorpuskuläre Granula.

Bei den elektronenoptischen Auswertungen konnten auch bei diesen Versuchsbedingungen trotz des apoptoseinduzierenden Antikörpers gerichtet auf den CD95/FAS-Rezeptor keine typischen Kennzeichen der Apoptose der Monozyten festgestellt werden.

Abb. 3.11.7 :

**Monozyten bei 0,2 % FCS
und Gabe von Latex-Partikeln**
(Vergrößerung 3400fach)

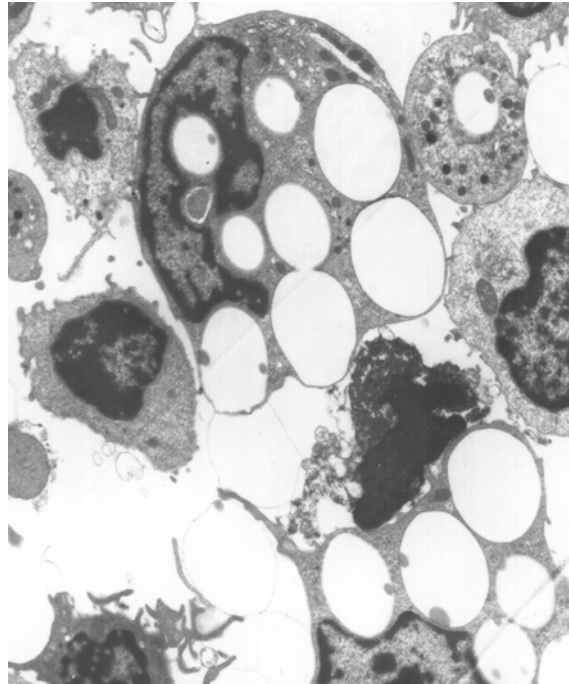
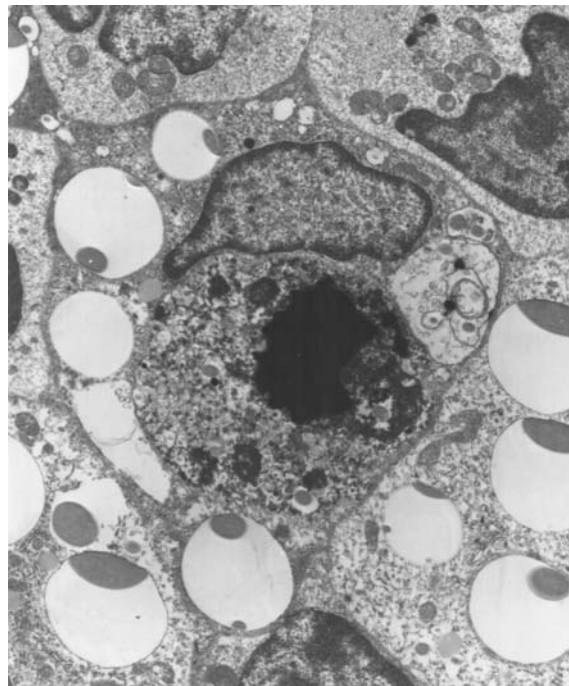


Abb. 3.11.8 :

**Monozyten bei 5 % FCS
und mit α CD95/FAS mAb
und Gabe von Latex-Partikeln**
(Vergrößerung 3400fach)



Die eingesetzten Latex-Mikropartikel bestanden aus polymerisiertem Styren, das elektronendurchlässig war, und sie hatten einen Durchmesser von 3,0 μm , der dem Durchschnitt von Thrombozyten entsprach. Zur besseren Aufnahme durch Monozyten waren die Latex-Teilchen im Vorhinein mit nicht hitzeinaktiviertem FCS opsonisiert worden.

Es zeigte sich eine Ansammlung der Latex-Partikel im Inneren der Monozyten (Abb.3.11.7 und Abb. 3.11.8). Diese Partikel wiesen jedoch keine Verschmelzungen mit Zellorganellen wie Lysosomen und anderen Granula auf. Des Weiteren waren die Latex-Mikropartikel manchmal nur durch eine sehr dünne zytoplasmatische Brücke von der äußeren monozytären Zellmembran getrennt.

Die häufig zum Rand der Monozyten abgedrängten Zellkerne zeigten Merkmale der Chromatin-Kondensation. Wenngleich die Zellorganellen im Zytoplasma in geringerer Anzahl vorlagen als bei unbehandelten Monozyten, schienen sie aber durchaus intakt zu sein. Weiterhin waren an der Zellmembran der Monozyten, die die Partikel phagozytiert hatten, keine Mikrovilli und Ausstülpungen registrierbar.

Die elektronenmikroskopisch erfassbaren Veränderungen nach der Phagozytose von opsonierten Latex-Mikropartikeln und zur Apoptose der Monozyten galten sowohl für die mit Serumdeprivation, als auch für die mit $\alpha\text{CD95/FAS}$ mAb behandelten Zellen.

3.6 Phagozytose und Apoptose von Monozyten

3.6.1 Phagozytoseinduktion durch Zymosan A und Latex-Mikropartikel und der Einfluss auf die Apoptose von Monozyten im Vergleich zu Thrombozyten

Um Nachforschungen über die monozytäre Phagozytose und das gleichzeitige Verhalten der Apoptose anzustellen, wurden Monozyten nicht nur mit Thrombozyten, sondern auch mit zwei sehr unterschiedlichen Reagenzien, Latex-Partikel und Zymosan A, kultiviert.

Die aus Zellwänden von *Saccharomyces cerevisiae*, einem Hefepilz, gewonnene Substanz Zymosan A und die Latex-Mikropartikel waren zuvor mit nicht hitzeinaktiviertem FCS opsonisiert worden. Die Kokultivierung dieser Reagenzien mit Monozyten, bei denen durch Deprivation von FCS-Serum die Apoptose induziert werden sollte, fand in gleicher Weise wie die der Thrombozyten statt. Abschließend wurde durchflußzytometrisch mittels Propidiumjodid der natürliche Zelltod der Monozyten gemessen.

In diesem Versuch zeigte sich beim grundlegendem Ansatz mit 0,2 % FCS eine deutlich niedrigere PI-Signalintensität, die gleichbedeutend mit einer erhöhten Fragmentation der DNA der Monozyten war und damit einen höheren Anteil apoptotischer Zellen als bei der Kokultivierung mit Thrombozyten darstellte (Abb. 3.12). Bei der Probe mit zusätzlicher Thrombozytengabe verschoben sich die Prozentzahlen eindeutig auf die Seite mit intensiver Fluoreszenz, d.h. es lagen 30 % mehr Zellen mit hohem DNA-Gehalt und so ohne Fragmentation der DNA und damit gleichbedeutend an vitalen Monozyten vor. Außerdem wurde eine Erhöhung der Granularität der Monozyten bei Gabe von Thrombozyten beobachtet.

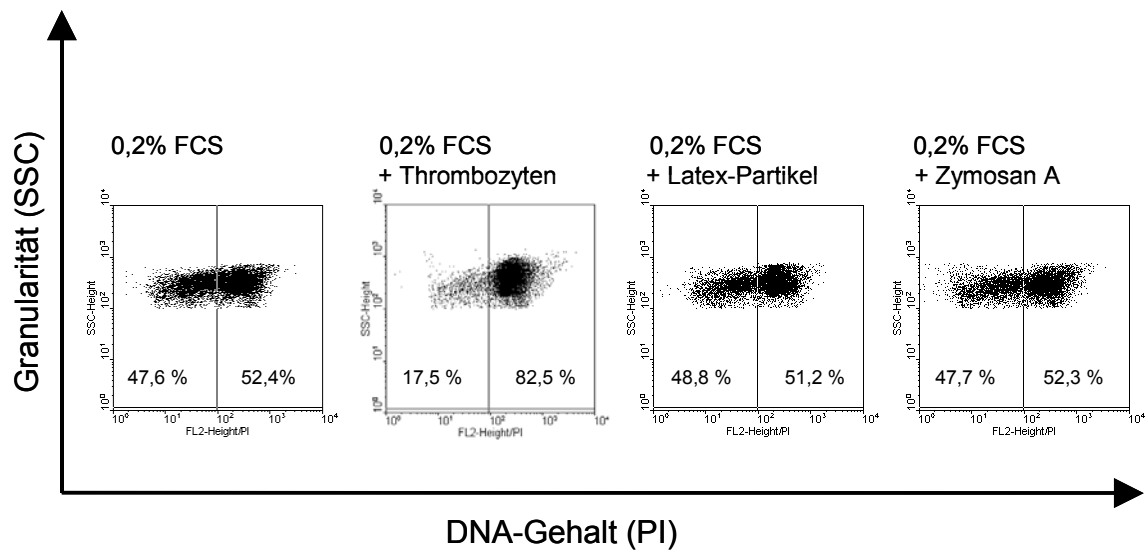


Abb. 3.12 : Effekte verschiedener Phagozytose-induzierender Reagenzien und von Thrombozyten auf die Apoptose von Monozyten bei Deprivation von Serum.

Beispielhafte Dotplots aus einem Versuch von insgesamt 5 unabhängigen Experimenten.

Die Prozentzahlen gaben die relative Signalintensität pro Quadrantenhälfte an.

Durch die Zugabe von Latex-Partikeln oder Zymosan A konnte dagegen eine wiederum erniedrigte PI-Signalintensität und dadurch eine genauso hohe Apoptoserate detektiert werden, wie beim Ansatz mit Monozyten in 0,2 % FCS enthaltenden Medium. Diese Phagozytose induzierenden Substanzen führten somit nicht zu einer Verminderung der Apoptoserate und insgesamt war bei diesem Versuch die Suppression monozytärer Apoptose ausgelöst durch Serumentzug spezifisch für Thrombozyten.

3.6.2 Auswirkungen von löslichen thrombozytären Faktoren auf die Apoptose von Monozyten

Als erstes wurde die Einwirkung von Thrombozyten, die durch einen feinporigen Membraneinsatz im Well von den adhärenen Monozyten getrennt waren, auf die Apoptose von serumdeprivierten Zellen untersucht. Auch wenn die direkte Interaktion zwischen Monozyten und Thrombozyten für die Kokultivierungszeit durch die Membran unterbunden war, so konnten lösliche Faktoren diese Schranke dennoch überwinden.

Die Bestimmung der Apoptoserate basierte auf der durchflußzytometrischen Messung der PI-Fluoreszenz der Monozyten.

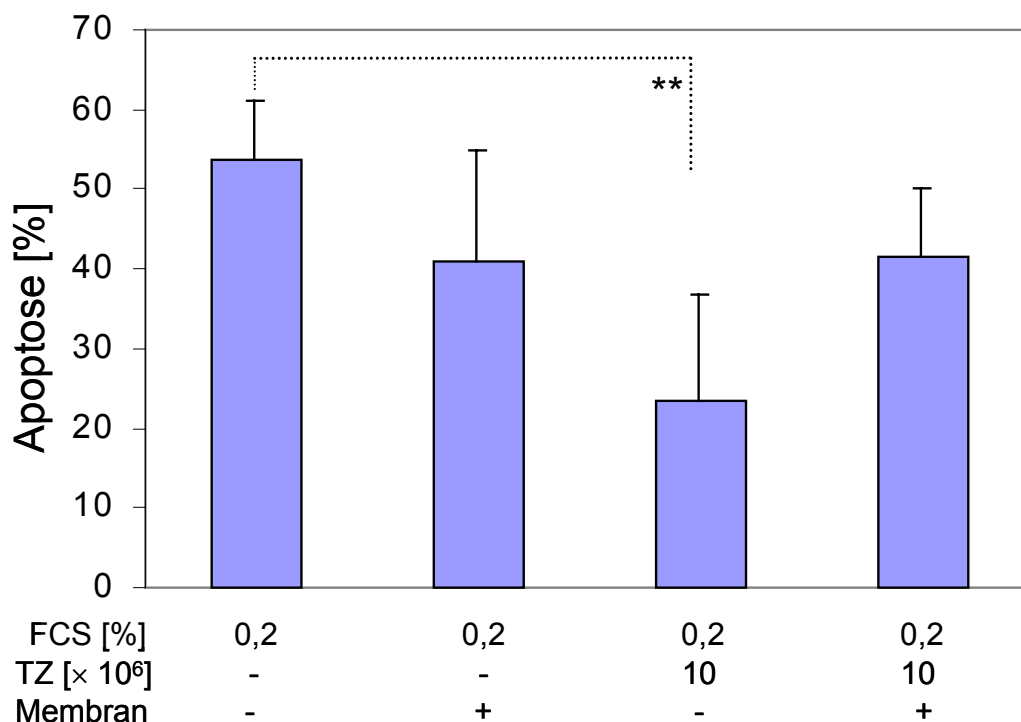


Abb. 3.13 : Auswirkungen der Unterbindung des direkten Kontaktes zwischen Monozyten und Thrombozyten (TZ) durch den Einsatz feinporiger Membranen.

Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen von 5 unabhängigen Versuchen angegeben. Eine Signifikanz von ** $p < 0,01$ war zwischen dem Kennzeichen gegeben.

Im Vergleich zur signifikanten Suppression der monozytären Apoptose durch Thrombozyten ohne zellundurchlässige Membraneinsätze, führte die Unterbindung des Zell-Zell-Kontaktes durch die eingesetzten Membranen bei der Kokultivierung von Monozyten und Thrombozyten zu keiner Reduktion der Apoptoserate (Abb. 3.13). Ein Einfluss sezernierter oder löslicher thrombozytärer Faktoren auf die monozytäre Apoptose konnte damit ausgeschlossen werden. Die kleinere Diskrepanz, dass der Einsatz der Membran zu der basalen Monozytenkultur bei 0,2 % FCS eine geringfügige Verringerung an apoptotischen Zellen mit sich führte, konnte mit der Annahme begründet werden, dass beim Herausnehmen des Membraneinsatzes nach der Gesamtkubationszeit von 72 h einige abgelöste, apoptotische Monozyten in der Suspension an der Membran klebten und mit weggerissen worden waren.

Als zweites wurden die Thrombozyten zuvor einer Behandlung mit einer Apparatur ausgesetzt, die die Zellen sowohl mechanisch als auch mit Hilfe von Ultraschallwellen fragmentierte. Ein Teil der Suspension erfuhr dann eine Filtrierung durch eine Membran, die nur für die löslichen Inhaltsstoffe passierbar war. Dieses thrombozytäre Filtrat oder auch die Lösung der Thrombozyten-Fragmente wurden wie auch die vitalen Thrombozyten den serumdeprivierten Monozyten hinzugegeben und nach der Standardinkubationszeit wurde mit Hilfe der PI-Färbung durchflußzytometrisch die Apoptose der Zellen bestimmt.

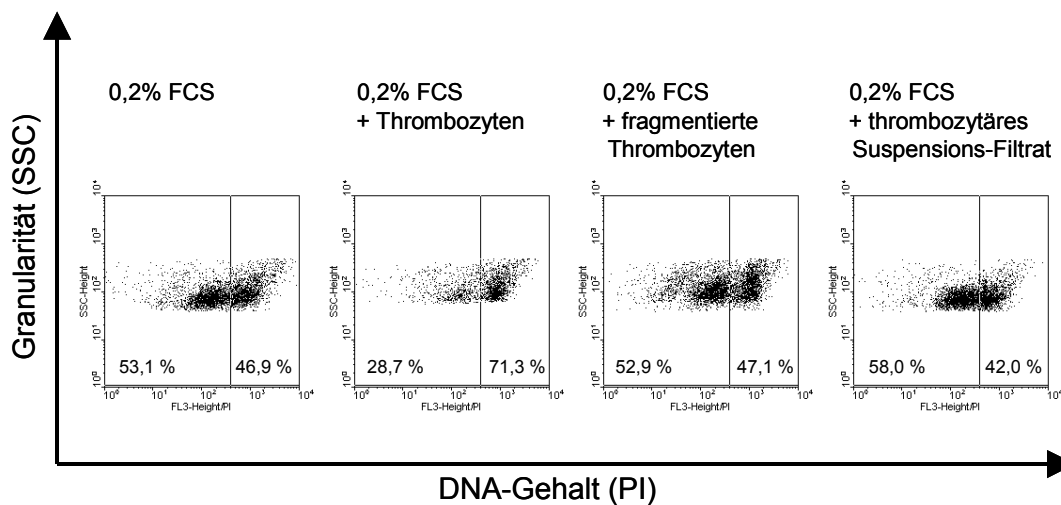


Abb. 3.14 : Effekte von vitalen und fragmentierten Thrombozyten bzw. thrombozytärer Inhaltsstoffe auf die monozytäre Apoptose ausgelöst durch Serumentzug.

Exemplarische Darstellung aus 6 Experimenten.

Die Prozentzahlen gaben die relative Signalintensität an.

Zunächst konnten in etwa gleiche Prozentzahlen auf den Seiten mit hoher oder niedriger PI-Signalintensität beim Kontrollansatz mit 0,2 % FCS erfasst werden. Eine deutliche Verschiebung zugunsten der logarithmisch großen Signalwerte an PI-Fluoreszenz zeigte eine weitestgehend erhaltene chromosomale DNA der Monozyten und damit eine Verminderung der monozytären Apoptose bei der Kokultivierung mit Thrombozyten an (Abb.3.14).

Die Kultivierung der Monozyten mit den fragmentierten Thrombozyten oder mit dem thrombozytären Filtrat hatte keinen Einfluss auf die basale, monozytäre Apoptose.

3.7 Monozytäre Phagozytose von Thrombozyten

3.7.1 Fluoreszenzmarkierung der Thrombozytenmembran

In einigen Experimenten wurden fluoreszierende Reporter-Moleküle (PKH 67 Green Fluorescent Cell Linker (FITC-konjugiert)) in die Zellmembran der Thrombozyten inkorporiert und mittels Durchflußzytometrie analysiert.

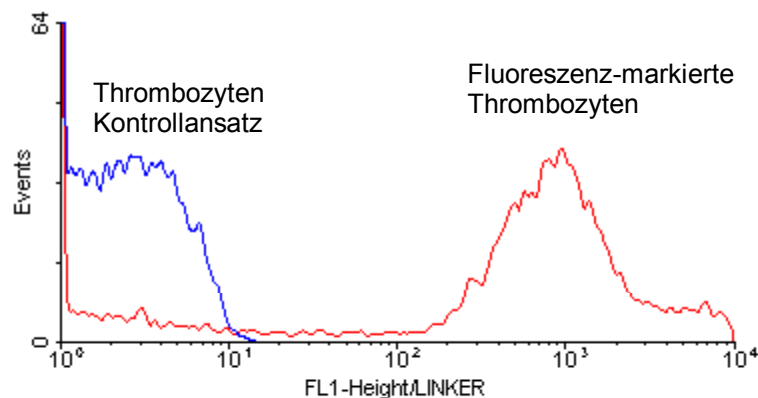


Abb. 3.15 : Repräsentatives Histogramm mit ungefärbten und Fluoreszenz-markierten Thrombozyten.

Die Membranen der Thrombozyten wurden mit FITC-fluoreszierenden Molekülen konjugiert.

Die Auswertung bezog sich auf die reine Thrombozytenpopulation.

Im Gegensatz zur Kontrollkurve mit nicht angefärbten Thrombozyten konnte eine hohe Signalintensität bei den an der Membran FITC-konjugierten Thrombozyten bestätigt werden (Abb.3.15). Dazu waren zuvor reine Thrombozytenpopulationen im Durchflußzytometer betrachtet worden. So wurde für die weiteren Analysen der Interaktionen zwischen Monozyten und Thrombozyten eine eindeutige Markierung der Thrombozyten durch die Inkorporation der fluoreszierenden Teilchen in die Membran gewährleistet.

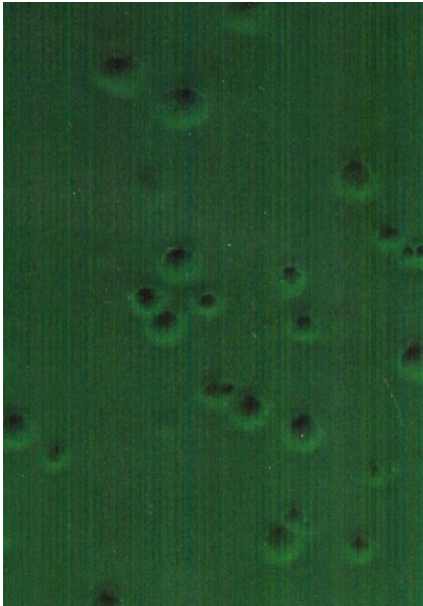
3.7.2 Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Phagozytose von fluoreszenzmarkierten Thrombozyten durch Monozyten

Nach der Gesamtinkubationszeit von 72 h waren zunächst allein Monozyten, kultiviert in Medium mit 0,2 % FCS, betrachtet worden. Dabei konnten keinerlei Zellen im Fluoreszenzlicht festgestellt werden, wenngleich die Kontrollaufnahme im Durchlicht eine Vielzahl an vorliegenden Monozyten belegte (Abb. 3.16.1).

Ferner wurde eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Monozyten durchgeführt, die nach etwa 20-stündiger Inkubation für 1 h mit membranmarkierten, fluoreszierenden Thrombozyten kokultiviert und danach mit neuem Medium mit 0,2 % FCS ohne Thrombozyten bis zur Standardgesamtzeit von 72 h inkubiert worden waren. Bei der Fluoreszenzaufnahme konnten einige nun Fluoreszenzlicht ausstrahlende Monozyten beobachtet werden, wobei die membraninkorporierten Fluochrome der Thrombozyten offensichtlich im Inneren oder an der Zellmembran der Monozyten wiederzufinden waren (Abb. 3.16.2). Dies deutete darauf hin, dass die fluoreszierenden Thrombozyten von den Monozyten phagozytiert worden waren oder aber zumindest eine Adhärenz der Thrombozyten an den Monozyten vorlag.

Abb. 3.16.1 : Monozyten bei 0,2 % FCS (Vergrößerung 600fach)

Durchlichtaufnahme



Fluoreszenzbild

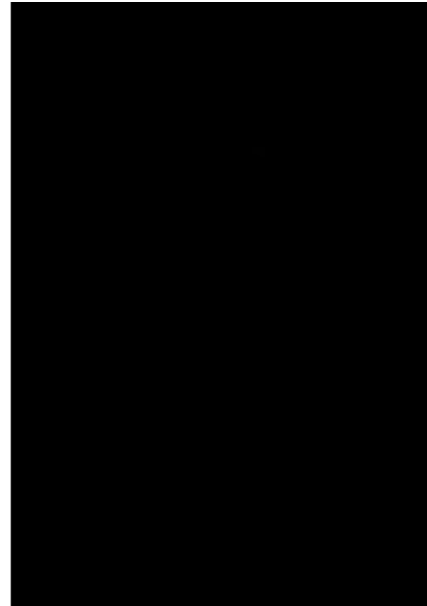
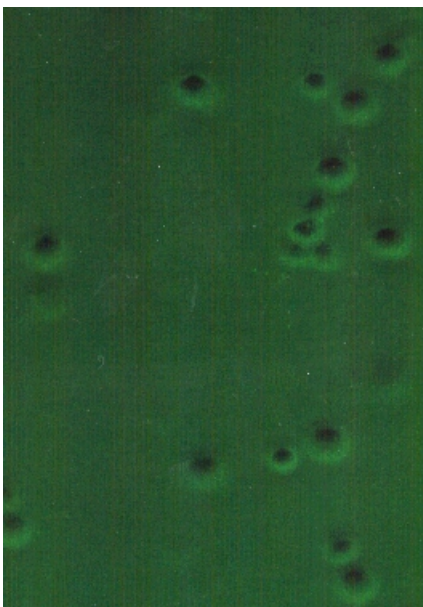
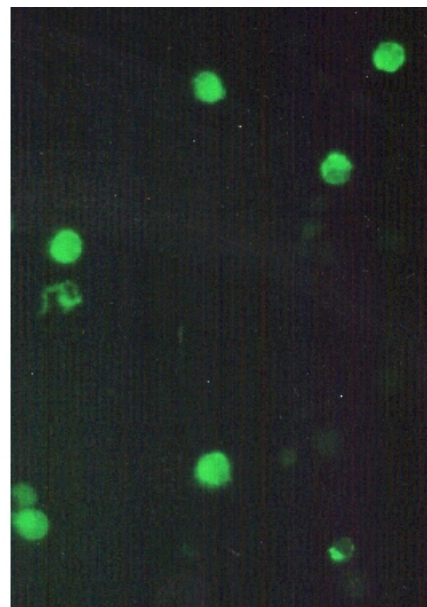


Abb. 3.16.2 : Monozyten bei 0,2 % FCS und nach der Kokultivierung mit fluoreszierenden Thrombozyten (Vergrößerung 600fach)

Durchlichtaufnahme



Fluoreszenzbild



3.7.2 Inhibition der Phagozytose durch Cytochalasin D und Reduktion der thrombozytären Apoptoseprotektion von Monozyten

Die Fähigkeit der Zellen zur Phagozytose ist abhängig von der Polymerisation von F-Aktin. Cytochalasin D hat eine hohe Bindungsaffinität besonders zu F-Aktin und blockiert die Elongation der Aktin-Filamente im Zytoskelett der Zellen. Somit kann Cytochalasin D als Inhibitor der Phagozytose eingesetzt werden.

Bei dem methodisch im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Assay wurden 30 Minuten vor der Thrombozytengabe Cytochalasin D gelöst in DMSO in einer Konzentration von 30 μM und DMSO in der zugehörigen Verdünnung als Kontrolle zu den Monozyten gegeben. Anschließend folgte die Interaktion mit an der Membran Fluoreszenzmarkierten Thrombozyten im Zeitraum von 1 Stunde. Danach wurden die kompletten Überstände der Proben vorsichtig abgenommen, die Wells mit den adhärenen Monozyten einmal ausgewaschen und dann mit neuem Medium mit oder ohne Stimulantien versehen. Die entweder durch Serumdeprivation oder durch $\alpha\text{CD95/FAS}$ mAb apoptoseinduzierten Monozyten wurden nach der Standardinkubationszeit von 72 Stunden durchflußzytometrisch oder immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert, um mit der Anwendung der PI-Färbung den Apoptosegrad und gleichzeitig den phagozytierten Inhalt an fluoreszierenden Thrombozyten zu messen. Hierbei war eine FACS-Einstellung eingegeben worden, die anhand der Größen- und Granularitätseingabe nur den monozytären Bereich auswählte.

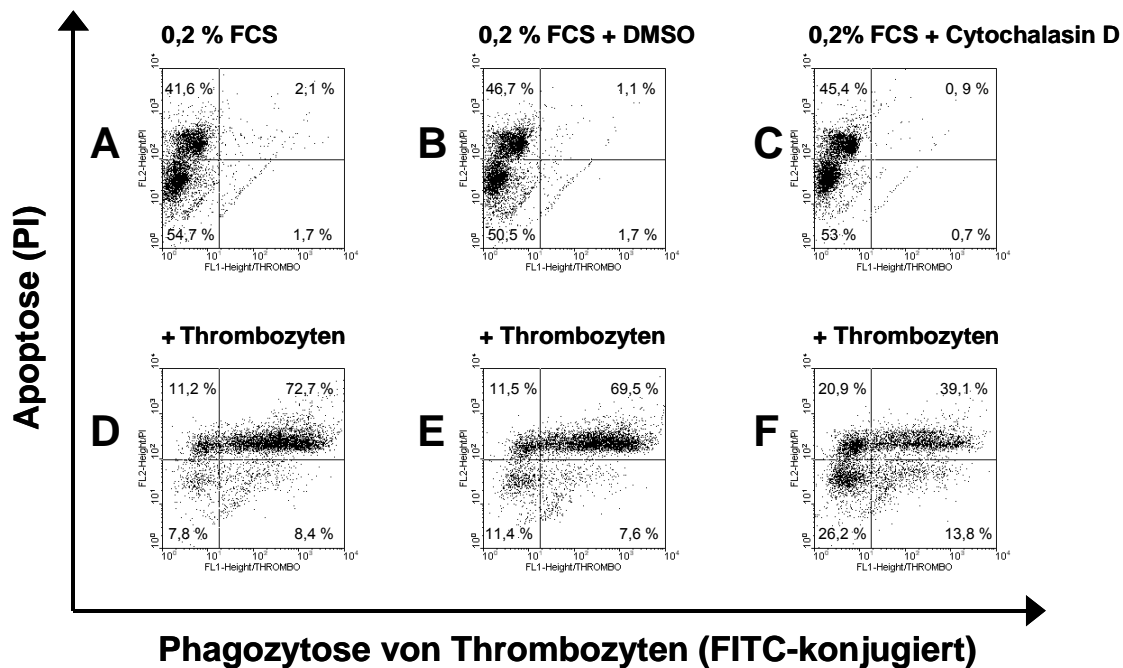


Abb. 3.17 : Effekte von Cytochalasin D auf die Apoptose der Monozyten und die Phagozytose von Fluoreszenz-markierten Thrombozyten in Kulturmedium mit 0,2 % FCS.

Die Apoptoserate wurde über die Detektion der PI-Signalintensitäten ermittelt. Dabei war ein hoher Grad an monozytärer Apoptose durch niedrige PI-Signale und damit durch das Vorliegen von fragmentierter DNA determiniert.

Die Phagozytose oder die Adhärenz von Thrombozyten wurde mittels des Membran-Fluoreszenz-Markers PKH 67 Green Fluorescent Cell Linker (FITC-konjugiert) analysiert.

Dargestellt sind die exemplarischen Dotplots aus einem von 5 unabhängigen Versuchen.

Bei den Ansätzen ohne Thrombozyten wurden jeweils ähnliche PI-Signalintensitäten detektiert und damit etwa gleichgroße Apoptoseraten erfasst. Es bestand eine Apoptoserate der Monozyten nach der Kultivierung in Medium mit 0,2 % FCS über die Inkubationszeit von 72 h von 54,7 % (Abb. 3.17.A), die sich auch durch Stimulation mit Cytochalasin D (Abb. 3.17.B) oder durch das Lösungsmittel DMSO (Abb. 3.17.C) über insgesamt 90 Minuten kaum veränderte. Die Gabe von Thrombozyten führte dagegen zu

einer deutlichen Erhöhung der PI-Signale und zu einer signifikanten Abnahme an apoptotischen Zellen auf 16,2 % (7,8 % + 8,4 %). Gleichzeitig führte die Kokultivierung mit Fluoreszenz-markierten Thrombozyten zu einer deutlichen Anhebung der FITC-Signalintensitäten und daraus ließ sich folgern, dass über 70 % der Monozyten fluoreszierende Thrombozyten ingestiert hatten oder dass eine Adhärenz zwischen Monozyten und Thrombozyten vorlag (Abb. 3.17.D). Hingegen wurde beim Hinzufügen des Phagozytoseinhibitors Cytochalasin D und Kokultivierung mit Thrombozyten eine Steigerung der monozytären Apoptoserate auf 40 % (26,2 % + 13,8 %) und eine signifikante Reduktion der Anzahl an Monozyten mit phagozytierten oder adhärennten Thrombozyten auf 39,1 % beobachtet (Abb. 3.17.F).

Der Einsatz von Cytochalasin D, das über einen Eingriff ins Zytoskelett der Monozyten eine Hemmung der Phagozytose bewirkt, erhärtete die Hypothese von der Ingestion der Thrombozyten durch apoptisierende Monozyten, wenngleich die Stimulans Cytochalasin D in der recht kurzen Zeit der Inkubation basal keine Wirkung auf die Monozyten ausübte, die die Apoptoserate der Zellen bei Serum-Entzug verändert hätte.

Die hier vorliegenden Ergebnisse der Effekte von Cytochalasin D auf die Phagozytose von Thrombozyten und die Apoptose der Monozyten, herbeigeführt durch Serum-Entzug, stellten sich bei der Induktion des natürlichen Zelltodes durch α CD95/FAS mAb in ähnlicher Weise dar.

3.7.3 Adhärenz oder Ingestion von fluoreszenzmarkierten Thrombozyten durch apoptotische Monozyten

Zur Bestätigung der Phagozytose der membranmarkierten Thrombozyten durch die Monozyten und zur weiteren Unterscheidung, ob die Thrombozyten nur an den Monozyten adhärten oder aber von den Monozyten aufgenommen worden waren, erfolgte nach der Gesamtkubationszeit von 72 h die Anwendung der Substanzen Trypsin/EDTA-Lösung und Trypanblau.

Zum einen sollte die mögliche Adhärenz der FITC-konjugierten Thrombozyten an den Monozyten durch das Enzym Trypsin sowie durch den Entzug von Ca^{2+} -Ionen, die eine wichtige Rolle bei der Adhärenz spielen, mit dem Einsatz von EDTA aufgelöst werden.

Zum anderen wurde Trypanblau verwendet, um die Grünfärbung der Thrombozyten zu unterdrücken. Diese Auslöschung der Fluoreszenz konnte allerdings nur möglich werden, wenn lediglich eine Adhäsion, aber keine Ingestion, der membranmarkierten Thrombozyten von außen an der Zellmembran der Monozyten vorlag.

Als Grundlage wurde der Einfluss von Trypanblau und der Trypsin/EDTA-Lösung auf an der Membran FITC-inkorporierte reine Thrombozytenpopulationen getestet.

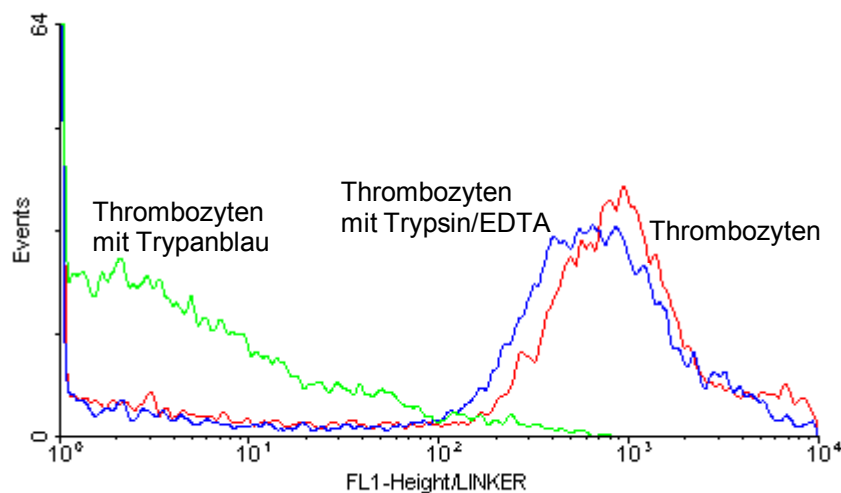


Abb. 3.18 : Repräsentatives Histogramm von membrangefärbten Thrombozyten und Einsatz der Trypsin/EDTA-Lösung und von Trypanblau.

Die Auswertung bezog sich auf die reine Thrombozytenpopulation.

Die Kontrollkurve bezüglich der Thrombozyten mit FITC-Membranmarkierung war von hohen Signalintensitäten geprägt, was sich durch die Gabe der Trypsin/EDTA-Lösung zu den membranmarkierten Thrombozyten nur unwesentlich änderte. Im Gegensatz hierzu führte das Hinzufügen von Trypanblau zu einer fast vollständigen Unterdrückung der FITC-Fluoreszenz an den Membranen der Thrombozyten, da der Farbstoff Trypanblau die Grünfluoreszenz überlagerte und im durchflußzytometrischen Kanal für das grüne Lichtspektrum keine Signale aufgenommen werden konnten (Abb. 3.18).

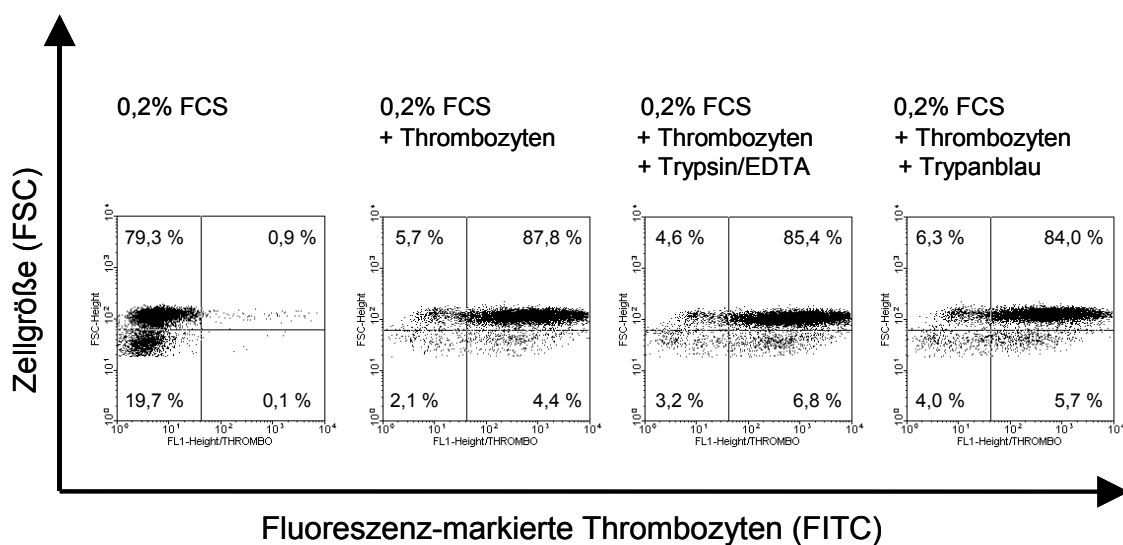


Abb. 3.19 : Exemplarische Dotplots von Monozyten zusammen mit membranmarkierten Thrombozyten und Einsatz von Trypsin/EDTA-Lösung und Trypanblau.

Dargestellt ist die monozytäre Zellgröße und die Anzahl der ingestierten, FITC-markierten Thrombozyten.

Zur Analyse der Monozytenpopulationen diente die Auftragung der Eigenschaft Zellgröße gegen die FITC-Intensitäten der markierten Thrombozyten, die entweder an den Monozyten hafteten oder aufgenommen worden waren. Zuvor war anhand der durchflußzytometrischen Einstellung anhand der Größeneingabe der monozytäre ohne den thrombozytären Zellbereich ausgewählt worden. Beim apoptoseauslösenden Ansatz mit der Kultivierung der Monozyten in Medium mit 0,2 % FCS konnte ein Hinweis auf

den Prozeß der Apoptose gefunden werden, da ca. 20 % Monozyten mit einer kleineren Zellgröße vorlagen. Erfolgte danach die Thrombozytengabe, wurde eine beinahe komplette Verlagerung der Monozytenpopulation in den rechten oberen Quadranten mit hohen Fluoreszenzintensitäten und maximaler Zellgröße registriert. Dies war zum einen ein Anzeichen, dass sich nun die membranmarkierten Thrombozyten an oder in den Monozyten befanden, und zum anderen, dass die Monozyten mit der Thrombozytengabe Vitalität aufwiesen, wie sich anhand der Zellgröße zeigte. Die Inkubation der Monozyten mit einer Trypsin/EDTA-Lösung zur enzymatischen und chemischen Abtrennung der vielleicht adhärennten Thrombozyten zeigte keine Veränderungen in den Prozentangaben des zugehörigen Dotplots. Ferner führte der Einsatz von Trypanblau zu keiner möglichen Überlagerung der FITC-Fluoreszenz von eventuell an der monozytären Zellmembran gebundenen Thrombozyten. Dies war nur damit begründbar, dass sich die markierten Thrombozytenmembranen im Inneren der Monozyten befinden mussten und so für eine Auslöschung der Grünfluoreszenz mit Trypanblau unzugänglich waren (Abb. 3.19).

Die Tatsache, dass eine Überlagerung der FITC-Signalintensität durch Trypanblau nicht möglich war und die Applikation der Trypsin/EDTA-Lösung keine Auswirkungen zeigte, deutete darauf hin, dass der größte Teil der membranmarkierten Thrombozyten nicht lediglich adhäriert, sondern von den apoptotischen Monozyten phagozytiert worden war.

3.8 Anwendung von Rezeptorinhibitoren

3.8.1 Expression von CD40 auf Monozyten

Zunächst wurde die CD40-Expression auf Monozyten untersucht. Hierzu erfolgte über die Gesamtinkubationszeit von 60 h eine Kultivierung der Monozyten in Kulturmedium mit 5 % FCS und eine Stimulation der CD40-Expression mit Interferon γ (IFN γ) in einer Konzentration von 100 ng/ml oder mit dem Granulozyten/Monozyten-Wachstumsfaktor (GM-CSF) in einer Konzentration von 100 U/ml. Das monozytäre CD40-Antigen wurde dann mit einem spezifischen FITC-konjugiertem IgM Antikörper nachgewiesen. Ein unspezifischer IgM Antikörper, der allgemeine Bindungsstellen für IgM auf Monozyten erkannte und auch mit dem Fluorchrom FITC verbunden war, diente als Färbungskontrolle.

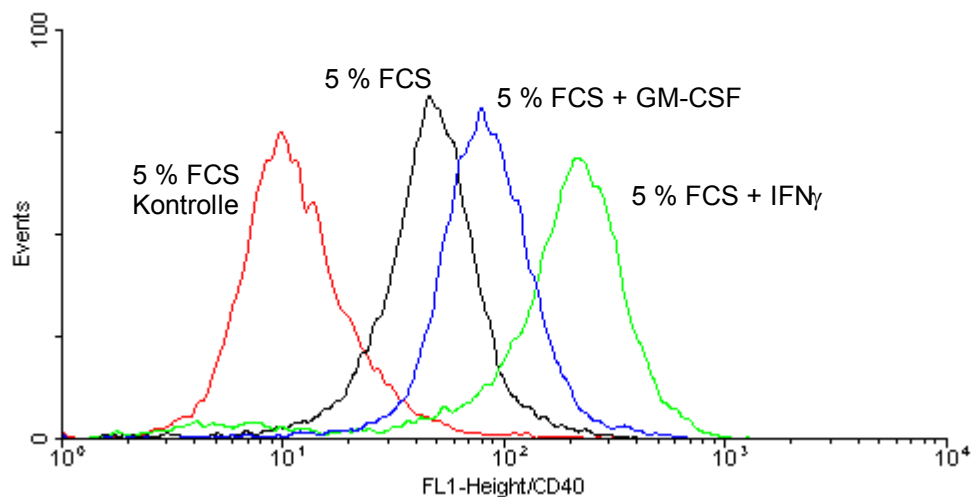


Abb. 3.20: Exemplarisches Histogramm über den Nachweis von CD40 auf Monozyten.

Kultivierung bei 5 % FCS und Stimulation mit IFN γ und GM-CSF.

Als Kontrolle wurde ein unspezifischer IgM Antikörper eingesetzt.

Mit Hilfe des spezifischen Antikörpers konnte eine basale CD40-Expression der Monozyten bei 5 % FCS aufgezeigt werden. Dabei war ein großer Unterschied an Signalintensitäten zur unspezifischen Kontrolle bemerkbar. Die Stimulation der Monozyten mit GM-CSF führte dann zu einer gesteigerten CD40-Expression, die durch die Gabe von Interferon γ noch weiter gesteigert werden konnte (Abb. 3.20).

Damit wurde die Expression von CD40-Rezeptoren auf vitalen Monozyten eindeutig belegt und durch das Zytokin Interferon γ und insbesondere durch den Wachstumsfaktor GM-CSF konnte eine deutliche Steigerung der exprimierten CD40-Antigene induziert werden.

3.8.2 Blockierung des CD40-Rezeptors auf Monozyten

Nun sollte die Interaktion zwischen monozytären CD40-Rezeptor und thrombozytären CD40-Liganden und ein möglicher Einfluss auf die Reduktion der Apoptoserate von Monozyten durch Thrombozyten abgeklärt werden.

Dazu wurden Monozyten in Medium mit 0,2 % FCS kultiviert und der CD40-Rezeptor durch Hinzufügen eines monoklonalen Antikörpers in den Konzentrationen 0,1 $\mu\text{g/ml}$ oder 10 $\mu\text{g/ml}$ spezifisch blockiert. Hierauf folgte dann nach 20-stündiger Vorinkubation die Gabe der Thrombozyten und die Kokultivierung bis zur Gesamtinkubationszeit von 72 h mit anschließender PI-Färbung zur Ermittlung des Apoptosegrades.

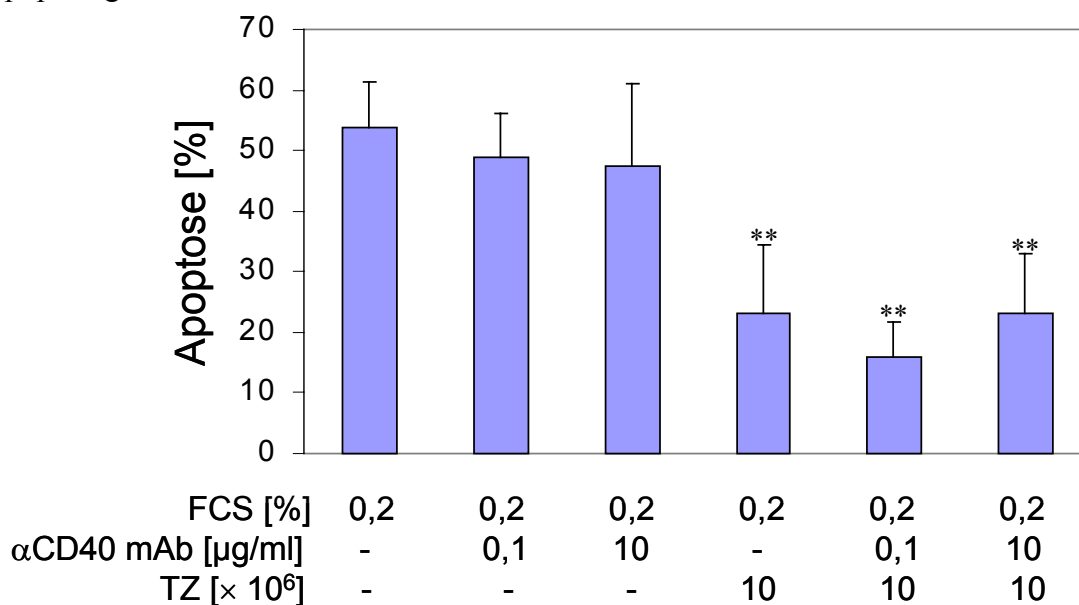


Abb. 3.21 : Inhibition des CD40-Rezeptors und der Effekt auf den Apoptoseschutz der Monozyten bei 0,2 % FCS durch Thrombozyten (TZ).

Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen von 7 unabhängigen Messungen angegeben. Eine Signifikanz von $**p < 0,01$ war jeweils zum Vergleichsansatz gegeben.

Bei der Betrachtung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Ansätze ohne Thrombozyten fielen zunächst in etwa gleich hohe Apoptoseraten von ca. 50 % auf, so dass die bloße Darreichung des blockierenden, CD40-spezifischen Antikörpers kaum einen Einfluss bezüglich des natürlichen Zelltodes auf die serumdeprivierten Monozyten ausübte.

Die Gabe der Thrombozyten führte dann nicht nur beim Basisansatz mit 0,2 % FCS allein, sondern auch bei den Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen des inhibierenden Antikörpers gerichtet auf CD40 zu einer Reduktion der Prozentzahlen an apoptotischen Monozyten auf Werte von ca. 20 %. Hierbei war jeweils zum betreffenden Vergleichsansatz ohne Thrombozyten ein Signifikanz von $p < 0,01$ errechenbar. Ein entscheidender Unterschied oder gar eine konzentrationsabhängige Beeinflussung im Vergleich der Ansätze mit Blockade des CD40-Antigens zum Standardansatz mit Thrombozyten bei 0,2 % FCS konnte in keinster Weise registriert werden (Abb. 3.21).

So war kein Einfluss der Blockierung der Interaktion zwischen monozytärem CD40-Rezeptor und thrombozytärem CD40-Liganden auf die Verhinderung der Apoptose der Monozyten durch die Thrombozyten feststellbar.

3.8.3 Blockierung des CD14-Rezeptors auf Monozyten

Die Regulation der Expression des multifunktionalen Rezeptors CD14 diente bereits als früher Apoptoseindikator. Er ist aber hauptsächlich auch ein Oberflächenantigen, welches als Bindungsstelle für LPS-Komplexe und als Kooperationsstelle zur Phagozytoseaktivität vorliegt. Da dieser Rezeptor eine sehr weitläufige und untergliederte Proteinstruktur aufweist, wurden zwei verschiedene Klone an Antikörpern eingesetzt, die je unterschiedliche Epitope des Oberflächenantigens CD14 erkannten und besetzten.

Die gegen CD14 gerichteten Antikörper der monoklonalen Klone My4 und Mem18 wurden in je einer Konzentration von 1 µg/ml zu Monozyten gegeben, die in Medium mit 0,2 % FCS kultiviert wurden. Weiter folgte nach 20 Stunden die Thrombozytengabe und am Ende der Kokultivierungszeit nach der Gesamtkubationszeit der Monozyten von 72 h die Apoptosebestimmung der Monozyten unter Zuhilfenahme der PI-Färbung.

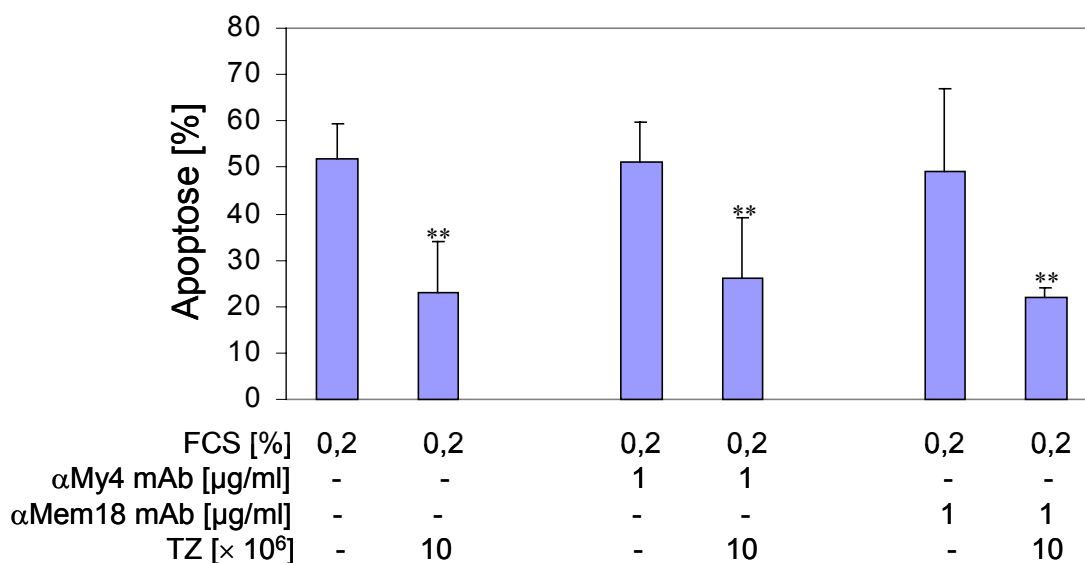


Abb. 3.22 : Auswirkungen der blockierenden Antikörper My4 und Mem18 gerichtet auf den CD14-Rezeptor auf den Apoptoseschutz der Monozyten durch Thrombozyten (TZ).

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von jeweils 6 unabhängigen Experimenten. Eine Signifikanz von ** $p < 0,01$ war je zum Vergleichsansatz gegeben.

Im Vergleich zum linken Teil des Balkendiagramms ohne Zusatz der Antikörper zeigte die Applikation des monoklonalen Antikörpers Klon My4, zu sehen im mittleren Sektor, keinerlei nennenswerte Unterschiede bezüglich der Apoptoseraten bei 0,2 % FCS ohne oder mit Thrombozyten. Im rechten Abschnitt der Graphik war die Blockierung des CD14-Rezeptors mit dem Antikörper Klon Mem18 abgebildet. Auch hier konnten kaum geänderte Prozentzahlen der Apoptoserate wahrgenommen werden (Abb. 3.22).

Somit zeigte sich bei der Gabe der verschiedenen Epitope von CD14 besetzenden Antikörper der Klone My4 und Mem18 zu den serumdeprivierten Monozyten kein Unterschied im Apoptosegrad der Monozyten im Bezug auf die Kontrollansätze ohne Antikörper-Zugabe, sowohl bei der Kokultivierung mit Thrombozyten als auch ohne Thrombozyten.

Schlussendlich führte auch die Verhinderung der Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten über den Weg des CD14-Oberflächenantigens zu keiner Auswirkung auf die Suppression der monozytären Apoptose durch Thrombozyten.

3.8.4 Einfluss von Adhäsionsinhibitoren auf den Apoptoseschutz von Monozyten durch Thrombozyten

In mannigfachen Versuchsserien wurde durch das Hinzufügen der unterschiedlichsten Inhibitoren im Rahmen der Kokultivierung versucht, die Adhäsion und gegenseitige Interaktion der Thrombozyten und Monozyten so zu unterbinden, dass der monozytäre Apoptoseschutz durch Thrombozyten nicht zustande kommen konnte. Dabei kamen zum einen blockierende Antikörper als auch inhibierende Reagenzien gegen thrombozytäre Adhäsionsantigene oder monozytäre Phagozytoserezeptoren zum Einsatz.

Zunächst waren die Inhibitoren mit den Monozyten oder den Thrombozyten getrennt vorinkubiert worden, um eine Bindung der blockierenden, monoklonalen Antikörper oder der adhäsionshemmenden Reagenzien zu erreichen, und dann erst erfolgte die gemeinsame Kokultivierung über etwa 1 h von Thrombozyten und Monozyten zusammen mit den adhäsionsverhindernden Substanzen. Diese wurden in zahlreichen Experimenten in verschiedenen Konzentrationen und in unterschiedlichen Kombinationen getestet. Nach der gemeinsamen meist einstündigen Inkubation wurde der Überstand aus den Wells der Kulturplatten abgenommen und neues Medium mit einem Gehalt von 0,2 % FCS ohne Antikörper-Zusatz hinzugefügt. Die Monozyten verblieben schließlich bis zur durchflußzytometrischen Untersuchung, mit der Auswertung der Apoptoseraten nach 72 Stunden Gesamtinkubationszeit, noch weitere ca. 40 bis 52 Stunden in Kultur.

Grundsätzlich war bei den Kontrollansätzen ohne Inhibitoren ein Schutz vor Apoptose der serumdeprivierten Monozyten durch Thrombozyten zu erkennen, obwohl anstatt der in den vorausgegangenen Experimenten verwendeten Zellzahl von 10×10^6 hierbei teilweise eine geringere Anzahl von nur 5×10^6 Thrombozyten eingesetzt wurde. Durch die Verringerung der Thrombozytenanzahl sollte eine bessere blockierende Besetzung der dann insgesamt auch geringeren Zahl an thrombozytären Rezeptoren mit den adhäsionshemmenden Substanzen gewährleistet werden.

Inhibitoren / mAb	Effekte
<i>gerichtet auf thrombozytäre Rezeptoren :</i>	
RGDS	negativ
CD41a	negativ
CD62P	negativ
<i>gerichtet auf monozytäre Rezeptoren :</i>	
Phospho-L-serine	negativ
CD14	negativ
CD36	negativ
CD40	negativ

Abb. 3.23 : Zusammenfassende Tabelle über die Auswirkungen verschiedener thrombozytärer oder monozytärer Rezeptorinhibitoren auf die Verhinderung des Apoptoseschutzes der Monozyten kultiviert in Medium mit 0,2 % FCS durch Thrombozytengabe.

Auf der Seite der Thrombozyten wurde zum einen CD62P (GMP-140, P-Selektin) und zum anderen CD41a (GP IIb/IIIa Komplex) mit spezifischen monoklonalen Antikörpern in Konzentrationen von 20-40 µg/ml blockiert. Beide thrombozytären Antigene spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten. Zusätzlich erfolgte zur Modifizierung des CD41a-Komplexes und zur Unterbrechung weiterer Adhäsionswege die Anwendung des Peptides RGDS und als Kontrolle die Gabe der inaktiven Form RGES in einer Konzentration von 1 mM. Dabei kann die RGD-Sequenz als Adhäsionsprotein an differente Integrine, wie dem Rezeptor CD41a, binden und als konkurrierender Ligand thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren blockieren.

Auf der Seite der Monozyten wurde zum einen das Oberflächenantigen CD36 durch einen monoklonalen Antikörper in der Konzentration von 20 mg/ml besetzt. Über eine Einbeziehung von Thrombospondin, einem Brückenmolekül, das zwischen Oberflächenstrukturen von Zellen, wie dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor und dem CD36-Rezeptor kooperativ bindet, können durch den CD36-Rezeptor andere Zellen adhärirt werden.

Zum anderen kam Phospho-L-serine als spezifischer Inhibitor des Phosphatidylserine-Rezeptors in einer Konzentration von 1 mM zum Einsatz. Hiermit sollte die monozytäre Erkennung der Thrombozyten anhand ihrer membranständigen Phosphatidylserinreste unterbunden werden. Zu den Rezeptoren auf Monozyten, die zu einer Erkennung von Phosphatidylserinresten an Oberflächenmembranen anderer Zellen fähig sind, zählen neben dem noch nicht näher identifiziertem, spezifischem Phosphatidylserin-Rezeptor, der oxidiertes LDL bindende Rezeptor CD68, Annexine, die als Proteingruppe Phospholipide in der Anwesenheit von Ca^{2+} binden können, und Scavenger-Rezeptoren der Klasse II, wie CD36. Somit wurden diese weiteren monozytären Rezeptoren ebenfalls durch Phospho-L-serine kompetitiv blockiert. Auf die Ergebnisse im Zusammenhang mit der Blockierung der CD14- und CD40-Rezeptoren von Monozyten soll hier nicht weiter eingegangen werden, da sie bereits in den vorangegangenen Kapiteln ausführlich erläutert worden sind.

Insgesamt zeigte sich also keine Veränderung der Apoptoserate von serumdeprivierten Monozyten in Gegenwart von Thrombozyten durch die eingesetzten monozytären oder thrombozytären Adhäsionsinhibitoren.

3.9 Suppression der Apoptose von Monozyten durch aktivierte Thrombozyten

3.9.1 Thrombozytenaktivierung und CD62P-Expression

Nach der Blutentnahme und der Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP) wurden die Thrombozyten nicht nur in isotonem Hepes/Tyrode-Puffer versetzt mit Apyrase sondern auch mit einem hypotonen Puffer aufbereitet und gewaschen, der eine Natriumchlorid-Konzentration von 21 mmol im Gegensatz zu 137 mmol beim isotonen Hepes/Tyrode-Puffer aufwies und nicht mit Apyrase zur Aggregationshemmung der Thrombozyten versetzt worden war.

Da Thrombozyten abhängig vom Aktivierungszustand CD62P (P-Selektin) auf der Thrombozytenoberfläche exprimieren, konnte mit Hilfe eines FITC-gefärbten CD62P-Antikörpers der Aktivierungsgrad der Thrombozyten durchflußzytometrisch bestimmt werden.

Im Vergleich zur Ausgangskontrolle der unaktivierten Thrombozyten, die direkt aus plättchenreichem Plasma genommen wurden, konnte nur eine geringfügige Steigerung der CD62P-Expression bei den in Hepes/Tyrode-Puffer aufgearbeiteten Thrombozyten gesehen werden. Somit waren diese Thrombozyten im Laufe der verschiedenen Zentrifugationsschritte fast überhaupt nicht voraktiviert worden. Im Gegensatz hierzu wurden bei den in hypoosmolaren Puffer gewaschenen Thrombozyten extrem hohe FITC-Signale und damit eine sehr viel höhere CD62P-Expression gleichbedeutend mit einer massiven Aktivierung registriert (Abb. 3.24.B).

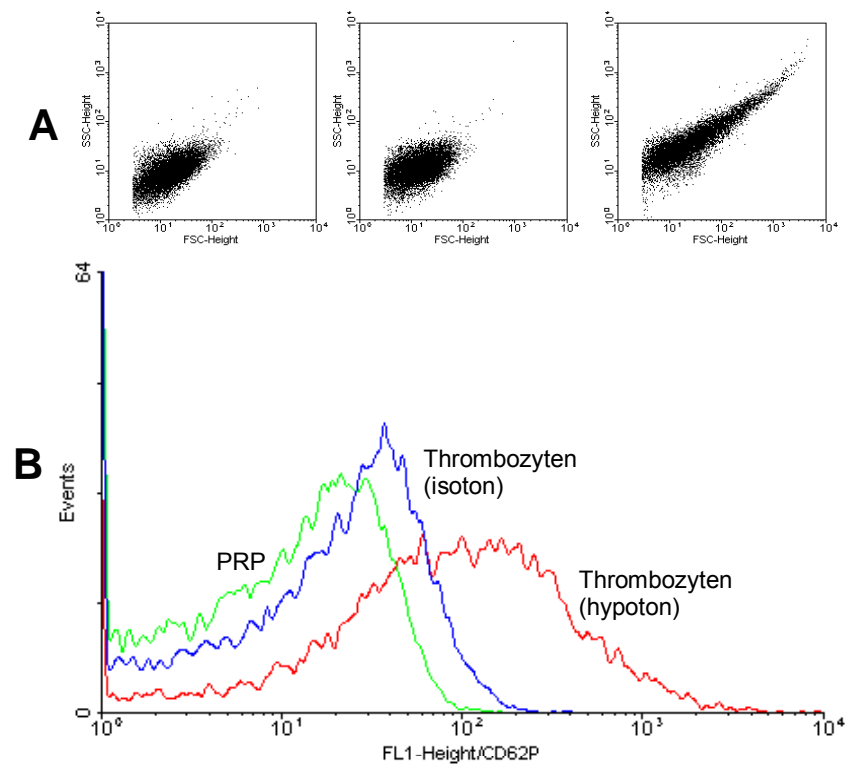


Abb. 3.24 : **A:** Dotplot-Darstellung der Thrombozytenpopulation, durchflußzytometrisch detektiert bezüglich der Zellmerkmale Größe (FSC) und Granularität (SSC).

B: Aktivitätsmessung von Thrombozyten anhand des Markers CD62P.

Die Thrombozyten wurden in Puffer unterschiedlicher Osmolarität aufbereitet.

Die über den jeweiligen Kurven abgebildeten Dotplots zeigten sowohl bei dem Ansatz der Thrombozyten im PRP als auch im isotonen Hepes/Tyrode-Puffer eine homoge ovale Zellwolke entsprechend der von unstimulierten Thrombozyten. Hingegen zeigte der Dotplot der durch herabgesetzte Osmolarität stimulierten Thrombozyten eine ansteigende Ausziehung der Zellwolke in Hinblick auf höhere Granularität und Größe. Dieser Formwandel der Thrombozytenpopulation deutete auf eine Aktivierung und auf eine teilweise Bildung von Thrombozyten-Aggregaten hin (Abb. 3.24.A).

3.9.2 Suppression der monozytären Apoptose durch aufsteigende Anzahlen an aktivierten Thrombozyten

Hieraufhin wurden dann nach etwa 20-stündiger alleiniger Vorinkubation von serum-deprivierten Monozyten unterschiedliche Konzentrationen, der durch den hypotonen Puffer stimulierten und aktivierten Thrombozyten, zugefügt. Nach 52 stündlicher Kocultivierung wurde ein quantitative Apoptosenachweis mittels PI-Färbung durchgeführt.

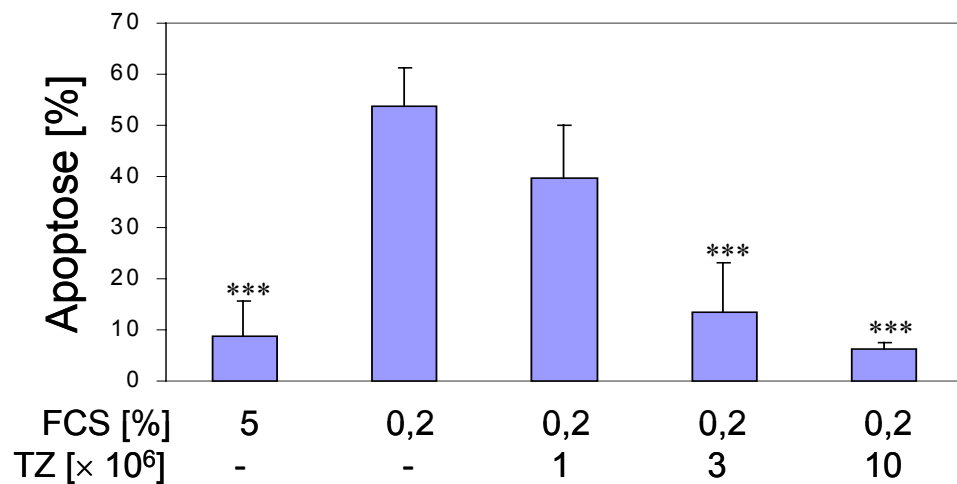


Abb. 3.25 : Monozytäre Apoptose ausgelöst durch Kultivierung in Medium mit 0,2 % FCS und die Suppression der Apoptose durch aufsteigende Anzahlen an Thrombozyten (TZ), die durch Hyposmolarität voraktiviert waren.

Der prozentuale Grad der Apoptose wurde mittels PI-Färbung erfasst. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen von 10 Messungen angegeben.

Eine Signifikanz von *** $p < 0,001$ war je zum Standardansatz von 0,2 % FCS feststellbar.

Im Vergleich zum Einfluss von durch Verwendung isotoner Pufferlösung nicht voraktivierten Thrombozyten auf die monozytäre Apoptoserate (Abb. 3.2), zeigte sich bei der Zugabe von durch hypotoner Pufferlösung voraktivierten Thrombozyten eine signifikante Reduktion des Apoptosegrades bereits bei geringeren Thrombozytenzahlen (Abb. 3.25).

Schon bei einer Gabe von 1×10^6 Thrombozyten zu den Monozyten in Medium mit 0,2 % FCS trat eine sichtbare Verringerung der Apoptoserate ein. Beim Hinzufügen von 3×10^6 aktivierten Thrombozyten war dann eine höchst signifikante Suppression der monozytären Apoptoserate zu verzeichnen und der Apoptosegrad der serumentzogenen Monozyten wurde sogar durch die Gabe von 10×10^6 hypoton vorstimulierter Thrombozyten auf einen ähnlichen Stand wie bei vitalen Monozyten in Medium mit 5 % FCS Medium-Gehalt abgesenkt. Im Vergleich zu 10×10^6 in isotonen Hepes/Tyrode-Puffer aufgearbeiteten und damit unstimulierten Thrombozyten (Abb. 3.2) konnte eine deutlich geringere Prozentzahl an monozytärer Apoptose bei der Kokultivierung mit 10×10^6 aktivierten Thrombozyten detektiert werden (Abb. 3.25).

3.9.3 Korrelation zwischen monozytärer Apoptoserate und Thrombozytenaktivierung mittels CD62P-Expression

Um den Zusammenhang zwischen der Reduktion der Apoptoserate der Monozyten durch Thrombozyten und dem thrombozytären Aktivierungsgrad zu untersuchen, wurden zunächst die mittleren Signalintensitätswerte an CD62P-Expression der Blutplättchen bei Aufbereitung in isotonen oder hypotonen Puffer ermittelt. Ferner konnten die Differenzen aus der Apoptoserate bei 0,2 % FCS und den Prozentzahlen an Apoptose der Ansätze bei serumdeprivierten Monozyten mit 10×10^6 entweder unstimulierten oder aber aktivierten Thrombozyten ausgerechnet werden. Das ergab den jeweiligen Grad des Apoptoseschutzeffektes. Nun wurde die Beziehung zwischen monozytärem Apoptoseschutz und thrombozytärer CD62P-Expression in einer Graphik veranschaulicht.

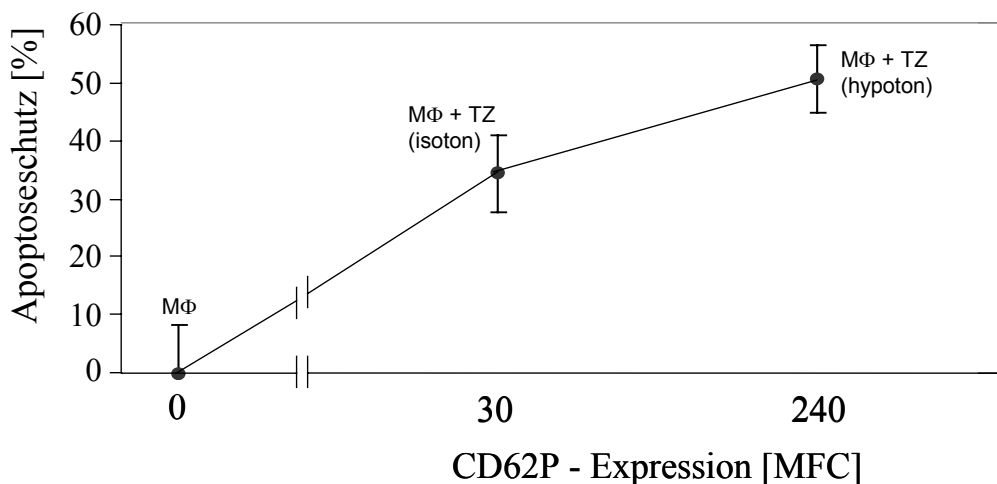


Abb. 3.26 : Zusammenhang zwischen monozytärem (MΦ) Apoptoseschutz und thrombozytärer (TZ) Expression an CD62P nach der Aufbereitung der Thrombozyten in isotonen oder hypotonem Puffer.

Als Ausgangspunkt diente der Kontrollansatz mit Monozyten bei 0,2 % FCS ohne die Kokultivierung mit Thrombozyten und damit ohne monozytäre Apoptosesuppression. Bei der Gabe von in isotonem Puffer aufgearbeiteten Thrombozyten war eine nur geringe Steigerung der CD62P-Expression bei einer gleichzeitigen deutlichen Reduktion der Apoptoserate der Monozyten zu sehen. Hingegen zeigte die hohe CD62P-Expression bei der Verwendung einer hypotonen Pufferlösung eine starke Voraktivierung der Thrombozyten an und gleichzeitig wurde hierbei mit der Gabe dieser aktivierten Thrombozyten eine noch stärkere Suppression des monozytären Apoptosegrades ausgelöst (Abb. 3.25).

So bestand eine eindeutige Abhängigkeit zwischen der Verhinderung der Apoptose der Monozyten durch Thrombozyten und der Oberflächenexpression von CD62P als thrombozytärer Aktivierungsmarker.

4 Diskussion

4.1 Apoptose von Monozyten

Die Apoptose von Monozyten ist bei heterogenen Reaktionen des Immunsystems, wie im Rahmen von inflammatorischen [47,105,162] sowie atherosklerotischen [152,163,164] Prozessen, von immenser Bedeutung. Dabei wird der physiologische und programmierte Zelltod von Monozyten durch differente pro- und antiapoptotischen Faktoren beeinflusst [4,9,27,50,107]. Noch immer sind aber bei der Induktion sowie Inhibition der monozytären Apoptose eine Vielzahl von Mechanismen, einschließlich der molekularen Ebene [117,131], nicht vollständig analysiert und Gegenstand weiterer, intensiver Forschung.

4.1.1 Induktion der Apoptose von Monozyten durch Serumdeprivation

Als Ausgangslage wurde die Apoptose der Monozyten durch die Deprivation der FCS-Konzentration im Kulturmedium von 5 % FCS auf 0,2 % FCS ausgelöst. Dabei war ein höchst signifikanter Anstieg der monozytären Apoptoserate nach der Standardinkubationszeit von 72 h ermittelbar. Dies deckte sich mit Aussagen in der Literatur, dass sich unstimulierte Monozyten kultiviert in niedrigen Serum-Konzentrationen spontaner Apoptose unterziehen [50]. Es waren vor allem Mangan und Koautoren die als erste beschrieben, dass Apoptose bei kultivierten Monozyten in Abwesenheit exogener Stimulation initiiert und konstant in Kulturen mit niedrigen Serum-Supplementen beobachtet werden konnte [68,105].

4.1.2 Induktion der Apoptose von Monozyten durch α CD95/FAS mAb

Als ein weiterer Induktionsmechanismus des programmierten Zelltodes von Monozyten diente der Signaltransduktionsweg über den CD95/FAS-Rezeptor [28,117].

Vorab wurde die basale Expression des Oberflächenrezeptors CD95/FAS der Monozyten kultiviert in Medium mit 5 % FCS und sodann eine Hochregulation der Rezeptordichte nach einer Aktivierung der Monozyten durch die Stimulation mit Interferon γ durchflußzytometrisch nachgewiesen. Bereits vor einigen Jahren konnte eine Arbeitsgruppe um Mayumi und Sumimoto genauso eine Steigerung der Oberflächenexpression des CD95/FAS-Antigen durch Interferon γ demonstrieren und eine erhöhte Empfindlichkeit der mit Interferon γ sensitivierten Zellen auf die Apoptoseinduktion mit agonistischen CD95-Antikörpern bekunden, wie ebenso von Varela und Rivas aufgezeigt [176,189].

Zur Induktion der Apoptose wurden die in Kulturmedium mit 5 % FCS kultivierten Monozyten mit einem agonistischen Antikörper gerichtet auf CD95/FAS inkubiert. Nach der Interaktion des monoklonalen Antikörpers α CD95/FAS mAb mit dem CD95/FAS-Rezeptor wurde ein höchst signifikanter Anstieg der Anzahl an apoptotischen Monozyten detektierbar. Dieser Effekt entsprach der Literaturmeinung. So berichteten Grage-Gribenow und Ernst, dass sowohl freie CD95-Liganden als auch direkte Zell-Zell-Kontakte mit T-Lymphozyten, die vermehrt CD95L als Oberflächenantigen exprimieren, die monozytäre Apoptose erwirken können [58]. In den letzten Jahren konnte darüber hinaus aufgeführt werden, wie ein möglicher Weg der Signaltransduktion stattfindet: Nachdem der CD95-Ligand extrazellulär an den CD95/FAS-Rezeptor ligiert hat, wird zunächst über die intrazelluläre Domäne des Rezeptors eine FAS-assoziiertes Protein zusammen mit der Procaspase-8 rekrutiert. Dabei wird über eine Proteolyse die Caspase-8 aktiviert. Diese führt zu einer proteolytischen Spaltung der Pro-Caspase-3 in die aktive Form Caspase-3. Die Caspase-3 induziert intranukleäre Enzyme zur DNA-Fragmentation und so zur Initiierung der Apoptose [9,29,138,181]. Außerdem wurde in der Literatur in der engen Kooperation zwischen Caspase-Kaskade und antiapoptotischen Signalen eine regulative Verminderung der Expression des antiapoptotischen Proteins bcl-2 nach der Gabe von Antikörpern gegen den CD95/FAS-Rezeptor beschrieben [52,100,110,186].

4.1.3 Induktion der Apoptose von Monozyten durch Interleukin 4

Als Apoptosestimulus wurde zudem das anti-inflammatorische Zytokin Interleukin 4 bei Monozyten in Kulturmedium mit 5 % FCS eingesetzt. Interleukin-4 kann unter anderem zu einer Suppression der monozytären Sekretion der antiapoptotischen Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-6 und Prostaglandin E₂ führen [64,178].

In den Versuchen konnte zwar ein Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen um etwa 10 Prozent, allerdings nicht im Signifikanzniveau, festgestellt werden. Dieser Effekt der geringgradigen Apoptoseinduktion von Interleukin-4 bei Monozyten ging konform mit den Studien von Heidenreich, wenngleich dort von einer deutlichen Steigerung der monozytären Apoptoserate durch Interleukin-4 berichtet wurde [68]. Allerdings erfuhren dort die Monozyten eine Kultivierung in 10 % AB-Serum im Gegensatz zu dem hier verwendeten Kulturmedium mit 5 % FCS. Die geringere Serum-Supplementation konnte in den hiesigen Ansätzen eine weniger starke Voraktivierung der Monozyten bedeuten, da veröffentlicht wurde, dass Serum-Faktoren wahrscheinlich zu einer Aktivierung von Monozyten führen und ähnlich stimulierende Effekte wie der Einfluss von IL-1, TNF α oder LPS auslösen können [105]. Die Arbeit von Mangan über die Erforschung der monozytären Apoptose nach der Stimulation mit Interleukin-4 beschreibt eine Reduktion der Überlebensrate nur bei den Zellen, die mit IL-1, TNF α oder LPS vorstimuliert waren, nicht aber bei frisch isolierten, ruhenden Monozyten, kultiviert in Kulturmedium mit 0,1 % humanem Serumalbumin [106,107]. Diese Entdeckungen in Kombination mit den Ausführungen von Heidenreich führten zu der Annahme, dass die Kultivierung bei 5 % FCS-Gehalt nur eine partielle Voraktivierung der Monozyten auslöste und folglich die Apoptoseinduktion mit Interleukin-4 nicht vollständig erfolgen konnte.

4.2 Monozyten und Thrombozyten

Die Entwicklung und Progression atherosklerotischer, thrombotischer [39,76,152,164] oder inflammatorischer [41,54,124] Prozesse basiert auf Interaktionen zwischen Monozyten und Thrombozyten. Zudem besteht eine Abhängigkeit von den beiderseitigen destruktiven wie protektiven Aktivitäten der involvierten Zellen [112,116] sowie deren Lebensdauer [27,43,155,195]. Insbesondere der physiologisch regulierte Zelltod von Monozyten determiniert den Fortgang der immunologischen Reaktionen [105]. Bisher sind allerdings keine Veröffentlichungen bekannt, die die Auswirkungen von Thrombozyten auf die Apoptose von Monozyten beschreiben.

4.2.1 Suppression der monozytären Apoptose durch Thrombozyten

In einem *in vitro*-System wurde in dieser Arbeit unter einem hohen Signifikanzniveau herausgefunden, dass apoptoseinduzierte Monozyten durch die Kokultivierung mit Thrombozyten vor dem programmierten Zelltod bewahrt blieben.

Nach eingehenden Recherchen und dem jetzigen Stand der Literatur gibt es bis dato keinerlei Publikationen, die *in vitro* einen protektiven Effekt von Thrombozyten auf die Apoptose von Monozyten aufzeigen. Die Inhibition der Apoptose von humanen Neutrophilen durch Thrombozyten wurde hingegen bereits von einer argentinischen Arbeitsgruppe um Andonegui berichtet [7]. Insofern lassen sich Vergleiche zwischen neutrophilen Granulozyten und Monozyten ziehen, da beide mononukleären Zellarten im Laufe der Hämatopoese aus einer gemeinsamen Stammzelle hervorgehen [17] und in vielen Untersuchungen zur Adhäsion von Thrombozyten sowohl an Neutrophilen als auch an Monozyten beide Zellarten gleichartig behandelt werden [81,148,149,171].

Die Protektion der monozytären Apoptose durch Thrombozyten zeigte sich zum einen nach der unspezifischen Apoptoseinduktion durch die Deprivation der FCS-Konzentration im Kulturmedium und zum anderen nach der direkten Induktion apoptotischer Signaltransduktionswege über den CD95/FAS-Rezeptor.

In Bezug auf die Stimulation der Monozyten mit Interleukin-4 ergab sich trotz einer nicht signifikanten Apoptoseauslösung ein geringgradiger, aber ebenso nicht signifikanter Schutzeffekt nach der Gabe von Thrombozyten.

4.2.3 Konzentrationsabhängigkeit der Suppression der monozytären Apoptose durch Thrombozyten

Im Rahmen der Auslösung der monozytären Apoptose durch Serumentzug konnte eine Abhängigkeit des Effektes der Apoptosesuppression durch unaktivierte Thrombozyten von der eingesetzten Menge an Thrombozyten und damit vom Verhältnis Thrombozyten zu Monozyten belegt werden. Diese Ergebnisse gehen konform mit Untersuchungen argentinischer Wissenschaftler bezüglich unterschiedlicher Verhältniszahlen von Thrombozyten zu neutrophilen Granulozyten, wobei etwas andere Thrombozytenzahlen dargereicht wurden [7].

4.2.4 Eine zweistündige Kokultivierungszeit erzielt die Apoptose- Protektion von Monozyten durch Thrombozyten

Bei der Untersuchung, ob die Zeit der Kokultivierung von Thrombozyten mit Monozyten einen Einfluss auf die thrombozytäre Suppressionswirkung der monozytären Apoptose hat, wurde das Faktum entdeckt, dass bereits eine zweistündige gemeinsame Inkubation eine hoch signifikante Verminderung der Apoptoserate der Monozyten auslöste. Diese Auswirkungen auf den Grad der monozytären Apoptose waren kongruent im Vergleich zu einem 20 oder gar 45 Stunden dauerndem Zeitintervall der Kokultivierung. Eine Zeitkinetik konnte nicht festgestellt werden. Diesbezüglich wurden in voneinander unabhängigen Studien von Jungi und Rinder publiziert, dass eine vollständige Adhärenz von Thrombozyten an Monozyten nach etwa 30 bis 60 Minuten vorlag [81,148]. Da die Adhäsion die beginnende Grundlage der Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten bildet, war der Zeitrahmen von 2 Stunden der gemeinsamen Kultivierung ausreichend, um einen Schutzeffekt der Thrombozyten auf die monozytäre Apoptose herbeizuführen. Allerdings wurde in der Mehrzahl der hiesigen Versuchsdurchführungen als Standard eine Koinkubationszeit von etwa 42 bis 52 Stunden gewählt.

4.2.5 Quantitativer Nachweis der thrombozytären Protektion der monozytären Apoptose mittels Propidiumjodid

Die bisher erläuterten Ergebnisse wurden unter Verwendung des klassischen quantitativen Apoptosenachweises mittels Propidiumjodid-Färbung bei fixierten und permeabilisierten Monozyten ermittelt. Der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert dabei mit der DNA und der DNA-Gehalt der Zellen ist dann proportional zur Anzahl vitaler Zellen [34]. Umgekehrt enthalten die apoptotischen Zellen weniger hochmolekulare DNA [27] und es zeigt sich durchflußzytometrisch weniger PI-Fluoreszenzintensität. Die Prozentangaben der Apoptoserate ergaben sich dann im Laufe der computer-technischen Auswertung. Insgesamt ermöglichte diese Methodik einen sicheren quantitativen Apoptosenachweis. Die Gefahren der falschen Klassifikation von nukleären Fragmenten oder apoptotischen Körperchen als einzelne apoptotische Zellen oder das Erfassen einer minimalen Anzahl nekrotische als apoptotische Zellen konnte allerdings nicht gänzlich ausgeschlossen werden [30].

Die Suppression der monozytären Apoptose induziert durch unspezifische Serum-deprivation oder durch direkte Stimulation mit einem agonistischen Antikörper gerichtet auf den CD95/FAS-Rezeptor mit der Gabe von Thrombozyten wurde mit weiteren, unabhängigen Methoden des Apoptosenachweises überprüft.

4.2.6 Quantitativer und qualitativer Nachweis der thrombozytären Protektion der monozytären Apoptose mittels TUNEL-Assay

Mit Hilfe eines TUNEL-Assay wurde die Tatsache ausgenutzt, dass bei der apoptotischen DNA-Degradation in einem relativ frühen Apoptosestadium zahlreiche 3'-Hydroxyl-Enden in der DNA entstehen, die mit fluoreszenzgekoppelten Nukleotiden markiert und durchflußzytometrisch messbar oder in der Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden können [25,30,136].

Die Analysen der Histogramme zu den Ansätzen mit Serumentzug und Applikation von einem α CD95/FAS mAb ließen ein deutliches Ausmaß an Bruchstellen anhand der hohen Signalintensitäten erkennen, wohingegen bei den entsprechenden Ansätze mit Thrombozytengabe und dem Kontrollansatz mit vitalen Monozyten nur sehr wenige

markierte Bruchstellen registriert werden konnten. Hierbei war es von besonderer Bedeutung, dass eine Gesamtinkubationszeit von nur 36 Stunden vorgelegen hatte. Damit wurde gemäß der Literatur berücksichtigt, dass TUNEL-positive Monozyten hauptsächlich in den ersten 48 Stunden nach Apoptoseinduktion durch Serumdeprivation auftreten, wie Perlman anhand eines Balkendiagramms mit Bezug auf eine Zeitkinetik und mit immunfluoreszenzmikroskopischen Fotos berichtete [136].

Ergänzend bestätigten die Fotos aus der Immunfluoreszenzmikroskopie qualitativ in eindrücklicher Weise die Apoptos suppression der Monozyten durch Thrombozyten, da bei den Proben mit Apoptoseauslösung viele fluoreszierende Monozyten ersichtlich waren, aber im Vergleich nur wenige markierte Zellen nach der Kokultivierung mit Thrombozyten lokalisiert werden konnten.

4.2.7 Qualitativer Nachweis der thrombozytären Protektion der monozytären Apoptose mittels Gelelektrophorese

Die qualitative Bestimmung der apoptotischen DNA-Fragmentation wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese erbracht. Dabei entstand in der elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente eine sogenannte DNA-Leiter. Diese kennzeichnete die in einem spätem Stadium des Apoptoseprozesses eintretende internukleosomale Spaltung der chromosomalen DNA. Die DNA-Leiter aus Fragmenten, die Vielfache des Nukleosoms waren, wurde bei den Ansätzen der apoptoseinduzierten Monozyten ohne Kokultivierung mit Thrombozyten deutlich erkennbar. In der Literatur wurden nach der Apoptoseinduktion von Monozyten durch Serum-Deprivation [105] oder CD95/FAS-Stimulation [47] vergleichbare Ergebnisse gefunden. Jedoch lagen dort kürzere Inkubationszeiten von nur 16 oder 48 Stunden im Gegensatz zu der hier austarierten Gesamtinkubationszeit von 72 h vor. Nach der Kokultivierung der apoptoseinduzierten Monozyten mit Thrombozyten zeigte sich jeweils eine deutlich schwächere DNA-Bandenbildung und auf diese Weise reflektierte sich eine geringergradige DNA-Fragmentation. Somit konnte die Protektion der Thrombozyten vor monozytärer Apoptose auch qualitativ analysiert werden.

4.2.8 Qualitativer Nachweis der thrombozytären Apoptoseprotektion der Monozyten mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie

In Parallelität mit publizierten Abbildungen [27] und Aufnahmen [67,105,162] zur elektronenmikroskopischen Morphologie von vitalen Zellen mit intakten Strukturen des Zellkerns und des Zytoplasmas sowie morphologischen Kennzeichen von apoptotischen Zellen, wie die Kondensation des Kerns, die Degeneration der Organellen, die zytoplasmatische Hypervakuolisierung und dem Verlust der Membranausstülpungen unterstrichen die hiesigen Aufnahmen aus der Transmissionselektronenmikroskopie anhand der je typischen, morphologischen Merkmale nach der Induktion des programmierten Zelltodes der Monozyten und nach der Gabe von Thrombozyten den monozytären Apoptoseschutz durch Thrombozyten.

4.2.9 Steigerung der CD14-Expression von apoptoseinduzierten Monozyten durch kokultivierte Thrombozyten

Die regulative Expression des multifunktionalen Oberflächenantigens CD14 von Monozyten kann als Marker früher Apoptosestadien dienen. So haben vor allem Studien von Heidenreich aufgeführt, dass eine Stimulation von Monozyten mit LPS zu einem Anstieg der Anzahl an CD14-Rezeptoren einhergehend mit einer supprimierten Apoptose von Monozyten führt. Andererseits konnte durch die Modulation von Monozyten mit Interleukin-4 oder immunsuppressiven Medikamenten eine Depression der CD14-Membranmoleküle und eine Steigerung des monozytären Apoptosegrades registriert werden [65,68,96,159,162].

Tatsächlich wurde in den hiesigen Untersuchungen bei vitalen Monozyten kultiviert in Medium mit 5 % FCS eine hohe Anzahl des CD14-Antigens und bei durch Serumentzug oder Stimulation mit α CD95/FAS mAb apoptoseinduzierten Monozyten eine deutlich niedrigere CD14-Expression detektiert. Nach der Kokultivierung mit Thrombozyten konnte dann eine Erhöhung der CD14-Expression der apoptoseinduzierten Monozyten ausgemacht werden. Die Regulation der Expression des Oberflächenmarkers CD14 von apoptierenden Monozyten mit oder ohne Thrombozytengabe zeigte also eine Antiparallelität zur Apoptoserate. So wurde die

durchflußzytometrische Erfassung der regulativen Expression von CD14 als Indikator früh einsetzender Apoptose-Mechanismen von Monozyten herangezogen.

Nebenbei besteht das Oberflächenantigen CD14 als Bindungsstelle für Lipopolysaccharide (LPS) [89]. Diese können nach einer Bindung an den CD14-Rezeptor die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α und IL-1 β , induzieren und folgend Apoptose protektieren [47,58,65,68,138]. Obendrein ist eine Beteiligung des CD14-Rezeptors an der Erkennung und Phagozytose von apoptotischen Zellen bekannt [65,94,157]. Auch kann CD14 als biologischer Marker beim Screening und bei der Überwachung von systemisch-entzündlichen Erkrankungen und bei Patienten mit chronischem Nierenversagen eingesetzt werden [159].

4.2.10 Reduktion der Aktivierung von Caspase-3 in serumdeprivierten Monozyten durch Thrombozyten

Als zentrale Komponente der intrazellulären Regulationsmechanismen der Apoptose existiert ein proteolytisches System, indem die sogenannten Caspasen involviert sind [135,181,194]. Die Caspasen sind Teil einer intrazellulären Kaskade, die durch proapoptotische Signale aktiviert wird sowie bereits in frühen Stadien der Apoptose wirkt und schlussendlich zum programmierten Zelltod führt [181]. Der essentielle Mediator der Apoptose ist das Schlüsselenzym Caspase-3 [47,162]. Diese liegt als Kardinalstelle der zytoplasmatischen Caspase-Kaskaden und als Effektor auf intranukleäre Apoptosemechanismen vor. So kann die aktivierte Form der Caspase-3 über eine Einwirkung auf die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) oder auf Nukleasen die Fragmentation der DNA initiieren [99,135].

Mit Hinsicht auf die Suppression der monozytären Apoptose durch Thrombozyten, wurde der Einfluss der Thrombozyten über einen kürzeren Gesamtinkubationszeitraum von 36 h auf die monozytäre Expression der aktiven Form der Caspase-3 durchflußzytometrisch analysiert.

Zunächst war die Induktion der spontanen Apoptose von Monozyten durch Serumentzug mit einem höchst signifikant erhöhtem Vorliegen der aktivierten Caspase-3

charakterisierbar. Die Gabe von Thrombozyten führte dann zu einer höchst signifikanten Reduktion der Caspase-3-Aktivierung der serumdeprivierten Monozyten, in Parallelität zur Apoptoserate. Diesbezüglich wurde in einer Veröffentlichung von Fahy und Wewers nachgewiesen, dass eine Abhängigkeit der spontanen Apoptose von Monozyten zur Regulation der aktivierten Caspase-3-Expression besteht, indem eine Blockierung der Caspase-3-Aktivierung mit spezifischen Inhibitoren die Zellen vor Apoptose bewahrte [47].

Nach der Stimulation der Monozyten mit einem applizierten α CD95/FAS mAb wurde zwar ebenso ein signifikant gesteigertes Vorkommen der aktiven Caspase-3 detektiert, allerdings konnte die Kokultivierung mit Thrombozyten hierbei die monozytäre Expression der aktiven Form der Caspase-3 nicht signifikant reduzieren.

Veröffentlichungen zeigten, dass eine Bindung des FAS-Liganden an den FAS-Rezeptor die zytoplasmatische Rezeptordomäne in der Weise beeinflusst, dass eine Aktivierung der Caspase-8 ausgelöst werden kann. Die aktivierte Form der Caspase-8 kann dann direkt über eine Proteolyse die Aktivierung der Caspase-3 herbeiführen [9,194]. Dieser Signaltransduktionsweg wurde durch die Applikation des α CD95/FAS mAb zu den Monozyten hochspezifisch imitiert. Das nach der erfolgten Thrombozytengabe zu den mit α CD95/FAS mAb apoptosinduzierten Monozyten trotz einer reduzierten Apoptoserate keine signifikant verminderte Caspase-3-Aktivierung gemessen werden konnte, deutete vermutlich darauf hin, dass durch die rezeptorvermittelte Signalkaskade der direkte Regulationsweg zur Aktivierung der Caspase-3 durch thrombozytäre Faktoren nicht entscheidend beeinflusst wurde. Obwohl also hierbei keine Blockierung der Aktivierung der monozytären Caspase-3 durch die Kokultivierung von Monozyten und Thrombozyten feststellbar war, mussten thrombozytäre Faktoren mit anderen apoptotischen Regulationsmechanismen interferieren, um auch nach der Apoptoseinduktion der Monozyten mit der Stimulation durch α CD95/FAS mAb einen protektiven Effekt auf die monozytärer Apoptose durch Thrombozyten zu haben. So wurde publiziert, dass Wachstumsfaktoren die über den CD95/FAS-Rezeptor medierte Apoptose von Monozyten durch eine stimulierte Expression des antiapoptotischen Proteins bcl-2 verhindern konnten [62].

Hingegen wurde vermutet, dass bei serumdeprivierten Monozyten der mitochondriale Energiehaushalt geschädigt werden könnte, da durch die Kultivierung der Monozyten im Medium mit einem reduzierten Serumanteil eine deutliche Verminderung energiereicher Substrate vorlag. Aus der Literatur war bekannt, dass durch das Fehlen energiereicher Substrate die oxydative Phosphorylierung eingeschränkt ist und dadurch die Permeabilität der Mitochondrienmembran alteriert und Cytochrom c ins Zytosol von Monozyten freigesetzt werden kann. Extramitochondriales Cytochrom c kann dann im Zytoplasma mit dem energiereichen Molekül dATP und dem Adapterprotein APAF-1 komplexieren und darüber eine Aktivierung der Caspase-9 herbeiführen [32,59,100]. Die aktivierte Caspase-9 bewirkt eine proteolytische Spaltung der Pro-Caspase-3 zur Caspase-3 und über die aktive Form der Caspase-3 die Initiierung der Apoptose [100]. Durch die Kokultivierung von serumdeprivierten Monozyten mit Thrombozyten, konnten thrombozytäre, zytoplasmatische Komponenten als energiereiche Substrate zu einer Reaktivierung der oxydativen Phosphorylierung in den monozytären Mitochondrien führen. Folglich konnte über einen verminderten zytoplasmatischen Anteil von Cytochrom c und einer ausbleibenden Aktivierung der Caspase-9 eine Reduktion der Caspase-3-Aktivierung erlangt werden.

Die zytoprotektive Wirkung von Thrombozyten auf serumdeprivierte Monozyten geht sonach mit einer Reduktion der Aktivierung des monozytären, Apoptose-initiiierenden Signalkaskadenenzym Caspase-3 einher.

Separat bleibt aufzuführen, dass eine Stimulation von Thrombozyten mit einer Aktivierung der thrombozytären Caspase-3 einhergeht. Infolgedessen können apoptoseähnliche Regulationswege im Zytoplasma von Thrombozyten beobachtet werden [22,166,188,193]. Nun konnte in den Versuchsansätzen im thrombozytären Zytoplasma basal gegebenenfalls selber die aktivierte Form der Caspase-3 vorliegen, wenn auch vermutlich in einer geringen Menge. Sodann hätte die Gabe von Thrombozyten zu apoptoseinduzierten Monozyten einen Anstieg der durchflußzytometrisch erfassbaren, aktivierten Caspase-3 erwarten lassen. Da aber genau der gegenteilige Effekt eintrat, war der thrombozytäre Anteil an der gemessenen Gesamtmenge der aktivierten Caspase-3 vernachlässigbar.

4.3 Phagozytose und Apoptose von Monozyten

4.3.1 Die Suppression monozytärer Apoptose durch phagozytierte Thrombozyten

Aufgrund der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass anscheinend die Phagozytose von Thrombozyten durch apoptoseinduzierte Monozyten die Voraussetzung für die Protektion monozytärer Apoptose durch Thrombozyten darstellt.

Zunächst wurden bei der Betrachtung der TEM-Fotos typische, morphologische Kennzeichen der Apoptose, wie nukleäre Kondensation und zytoplasmatische Alterationen, bei durch Serumdeprivation sowie Stimulation mit α CD95/FAS apoptoseinduzierten Monozyten gesehen. Hingegen wurden nach der Kokultivierung von Thrombozyten mit apoptoseinduzierten Monozyten nicht nur keinerlei morphologische Hinweise auf apoptotische Monozyten gefunden, sondern in eindrucklicher Weise konnte eine Assoziation zwischen ovalen und intrazellulären Einschlusskörperchen und der elektronenmorphologischen Struktur von Thrombozyten vermutet werden. Somit unterstützten diese Untersuchungsergebnisse die Aussage, dass Thrombozyten die Apoptose von Monozyten supprimieren und zudem wurden durch die Transmissionselektronenmikroskopie ingestierte Thrombozyten im Zytoplasma von Monozyten sichtbar. Übereinstimmend konnte diesbezüglich von einer Arbeitsgruppe mit Brown und Savill ebenfalls mit TEM-Aufnahmen gezeigt werden, dass humane Makrophagen untergehende Thrombozyten phagozytieren. Sie untersuchten zunächst die wesentlichen Merkmale des thrombozytären Zelluntergangs und fanden dann in einem Phagozytose-Assay mit Makrophagen heraus, dass bereits nach einer Interaktion von 30 Minuten ein Großteil und nach 12 bis 24 Stunden fast alle Thrombozyten von 6-Tage-kultivierten Makrophagen ingestiert worden waren. Brown und Savill vermuteten, dass kultivierte Thrombozyten einen apoptoseähnlichen Zelluntergang vollziehen [22]. So wurde durch die hiesigen Untersuchungsergebnisse angenommen, dass untergehende Thrombozyten *in vitro* wie apoptotische Zellen erschienen, die dann mit Monozyten interagierten und zu einer Erkennung und Phagozytose durch Monozyten führten.

4.3.2 Die Phagozytoseinduktion durch Zymosan A und Mikropartikel führt zu keiner Suppression von monozytärer Apoptose

Durch die Gabe von Latex-Partikeln, die den durchschnittlichen, thrombozytären Durchmesser aufwiesen, anstelle von Thrombozyten zu kultivierten und apoptose-induzierten Monozyten sollte geklärt werden, ob die Signaltransduktion und intrazelluläre Prozessierung während der Phagozytose per se dazu führt, dass Monozyten aktiviert und die Apoptose unterdrückt wird.

Hierzu zeigten die TEM-Fotos, dass die opsonisierten Latex-Teilchen sich in großer Anzahl intrazellulär angesammelt hatten und so offensichtlich auch phagozytiert worden waren, aber bei den Monozyten Anzeichen des programmierten Zelltodes, wie Chromatin-Kondensation und ein Verlust der Mikrovilli registrierbar waren. Folglich bewirkte die Phagozytose von Latex-Partikeln keinen Schutz der monozytären Apoptose.

Um weitere Erkenntnisse über die Phagozytose von Monozyten und die gleichzeitige Beeinflussung der monozytären Apoptose zu erlangen, wurden in einer Versuchserie serumdeprivierte Monozyten mit Thrombozyten oder opsonisierten Latex-Partikeln sowie opsonisiertem Zymosan A kultiviert. Diesbezüglich waren die aus Zellwänden von *Saccharomyces cerevisiae* gewonnene Substanz Zymosan A sowie auch Latex-Mikropartikel [151,170] für eine hervorragende Ingestionsfähigkeit durch Monozyten bekannt [23,38]. Resultierend führte die Zugabe dieser Phagozytose induzierenden Substanzen zu keiner Verminderung der monozytären Apoptoserate und die Suppression monozytärer Apoptose ausgelöst durch Serumentzug war spezifisch für Thrombozyten. Im Hinblick auf diese Versuchsergebnisse liegt eine kontroverse Diskussion in der Literatur vor. So berichtet Flad, dass Latex-Partikel nicht vor spontaner Apoptose schützen, hingegen aber Zymosan eine Ausschüttung von TNF α induziert und die Bewahrung vor monozytärer Apoptose mit der Gegenwart von TNF α korreliert ist [50]. Im Gegensatz dazu wird in einer Veröffentlichung von Brown und Savill mitgeteilt, dass eine Ingestion von Zymosan durch Monozyten die Expression des FAS-Liganden und das Freisetzen einer aktiven, löslichen Form dieses Liganden fördert und damit eine Apoptoseinduktion bei nahestehenden Monozyten auslöst, dass aber Latex-Mikropartikel diesen proapoptotischen Effekt nicht induzierten [23].

4.3.3 Lösliche, thrombozytäre Faktoren haben keinen Einfluss auf die Apoptose von Monozyten

Weiter wurde abgeklärt, inwiefern die Bewahrung der Monozyten vor Apoptose auf eine intakte Morphologie der Thrombozyten angewiesen ist oder möglicherweise auf lösliche, thrombozytäre Faktoren beruht. So attestierte eine Arbeitsgruppe von Scheuerer und Peterson dem von aktivierten Thrombozyten ausgeschütteten Plättchenfaktor 4 eine fördernde Rolle beim monozytären Überleben [160]. Ebenso zählten Koxsch und Woinke eine Reihe von thrombozytären Plasmaproteinen, wie Fibrinogen, Serotonin und Albumin, auf, die zytoprotektiv auf Monozyten einwirken können [91].

Zum einen wurde eine Versuchserie unternommen, bei der die Thrombozyten durch einen feinporigen Membraneinsatz im Well von den am Plattenboden adhärenen Monozyten getrennt waren. Obwohl keine direkte Interaktion zwischen Thrombozyten und serumdeprivierten Monozyten stattfinden konnte, war die Membran für lösliche Faktoren passierbar. Diese separierte Kokultivierung von, durch Serumentzug ausgelöst, apoptierenden Monozyten mit Thrombozyten ergab im Vergleich zur signifikanten Suppression der monozytären Apoptose durch morphologisch, intakte Thrombozyten keine Reduktion der Apoptoserate. Mögliche protektive Effekte sezernierter, löslicher Faktoren der Thrombozyten konnten somit nicht nachgewiesen werden. Ex aequo waren Darlegungen einer argentinischen Arbeitsgruppe, die Neutrophile und Thrombozyten mit einer zellundurchlässigen, permeablen Membran getrennt voneinander kokultivierten und dabei keine Bewahrung vor Apoptose im Gegensatz zur Inhibition der neutrophilen Apoptose durch direkt interagierende Thrombozyten erkannten [7].

Zum anderen wurde in Versuchen aufgeklärt, ob das Hinzufügen von mechanisch und mit Hilfe von Ultraschallwellen fragmentierten Thrombozyten sowie von einem thrombozytärem Filtrat der gewonnenen Suspension zum Mediumüberstand der serumdeprivierten Monozyten die Apoptose beeinflusst. Die Kultivierung der apoptoseinduzierten Monozyten mit den fragmentierten Thrombozyten oder mit dem thrombozytärem Filtrat wies keine Effekt auf die basale, monozytäre Apoptose auf. Somit konnte die zytoprotektive Kapazität von morphologisch intakten Thrombozyten

auf die Apoptose von Monozyten durch fragmentierte oder lösliche Inhaltsstoffe der Thrombozyten nicht imitiert werden.

Insofern ergab sich aus den bisherigen Ergebnissen die Überlegung, dass ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen Thrombozyten und Monozyten für die Protektion der Monozyten vor Apoptose durch Thrombozyten unabdingbar war.

4.3.4 Inhibition der Phagozytose von Thrombozyten und Reduktion der Suppression der Apoptose von Monozyten

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von apoptoseinduzierten Monozyten kokultiviert mit membranmarkierten, fluoreszierenden Thrombozyten veranschaulichten, dass fluoreszierende Thrombozyten von den Monozyten phagozytiert worden waren oder aber zumindest eine Adhärenz der Thrombozyten an den Monozyten vorlag.

Um die Hypothese zu bekräftigen, dass die thrombozytäre Protektion der Monozyten auf der Phagozytose von vitalen Thrombozyten durch apoptoseinduzierte Monozyten basiert, wurde ein methodisch in dieser Arbeit entwickelter Assay eingesetzt.

Zunächst wurden Thrombozyten mit einem Membranfluoreszenzfarbstoff markiert [60-66]. Anschließend wurden die Einflüsse des Phagozytoseinhibitors Cytochalasin D analysiert. Diesbezüglich konnte in einer multiparametrischen, durchflußzytometrischen Untersuchung gleichzeitig die monozytäre Apoptoserate über die Detektion niedriger PI-Signalintensitäten und die Adhärenz oder Phagozytose von fluoreszenzmarkierten Thrombozyten determiniert werden.

In der Durchflußzytometrie war anhand der Größen- und Granularitätseingabe eine Unterscheidung zwischen monozytärer und thrombozytärer Zellpopulation gewährleistet und nur die Monozytenpopulation wurde ausgewählt.

Nach der Kultivierung von Monozyten ohne Thrombozyten in Medium mit 0,2% FCS zeigte sich ein hoher Grad an monozytärer Apoptose, indem niedrige PI-Signale und damit das Vorliegen von fragmentierter DNA detektiert wurden. Die Stimulation durch Cytochalasin D oder durch das Lösungsmittel DMSO über insgesamt 90 Minuten veränderte die Apoptoserate kaum.

Die einstündige Kokultivierung von serumentzogenen Monozyten mit Fluoreszenzmarkierten Thrombozyten führte dagegen zu einer signifikanten Abnahme der monozytären Apoptoserate. Gleichzeitig konnte eine deutliche Erhöhung der Signalintensitäten an FITC-Fluoreszenz gemessen werden. Dies wies darauf hin, dass eine große Anzahl der Monozyten fluoreszierende Thrombozyten ingestiert hatten oder eine Adhärenz zwischen beiden Zellarten bestand. Hierbei wurde durch die Verwendung des membraninkorporierten FITC-Markers eine Quantifizierung der Monozyten mit phagozytierten oder adhärennten Thrombozyten möglich. Methodisch ähnlich verwendeten Brown und Savill zur durchflußzytometrischen Quantifizierung einen anderen Fluoreszenzfarbstoff (CM-Orange) [22].

Hingegen wurde nach der Stimulation der Monozyten mit dem Phagozytoseinhibitor Cytochalasin D und der Kokultivierung der Monozyten mit Thrombozyten eine signifikante Reduktion der Anzahl an Monozyten mit ingestierten oder adhärennten Thrombozyten ersichtlich. Zudem zeigte sich gleichzeitig eine angestiegene Apoptoserate. Dabei waren die Monozyten 30 Minuten mit Cytochalasin D vorinkubiert und für die einstündige Kokultivierung mit Thrombozyten weiter mit dem Phagozytoseinhibitor stimuliert worden. Die in der Versuchsreihe eingesetzte Inkubationszeit mit Cytochalasin D von insgesamt 90 Minuten und die Konzentration von 30 μM waren aus der Literaturmeinung entnommen und abgeglichen worden [70,89,192]. Ergänzend zeigten die Kontrollansätze mit dem Hinzufügen des Lösungsmittels DMSO für Cytochalasin D keine Veränderungen, wie unter anderem auch durch Wan beschrieben wurde [192].

Cytochalasin D blockiert die Elongation der Aktin-Filamente durch eine hochaffine Bindung an F-Aktin [51] und inhibiert somit neben intrazellulären Signaltransduktionswegen die Modulation des auf Aktin basierenden Zytoskeletts [94]. Daher wurde die monozytäre Internalisierung der fluoreszenzmarkierten Thrombozyten durch ein blockiertes Aktin-Filament-System des Zytoskeletts der Monozyten verhindert. Auch in der Literatur ist Cytochalasin D als klassischer Phagozytoseinhibitor bekannt. So konnte eine konzentrationsabhängige [70] Reduktion der Phagozytose von fluoreszenzmarkierten E.coli durch Monozyten [70,89,192] sowie eine verminderte Ingestion von opsonisiertem Zymosan [38] nachgewiesen werden. Entgegen hatte

Cytochalasin D fast keine Wirkung auf die Endozytose von einem Heparin-bindenden Protein [70] und die Makropinozytose von LPS [89].

Zusammenfassend konnte also durch den Einsatz des Phagozytoseinhibitors Cytochalasin D mit einer Blockierung der monozytären Phagozytose von markierten Thrombozyten und einer gleichzeitigen Steigerung der monozytären Apoptoserate der Nachweis erbracht werden, dass die Phagozytose und nicht lediglich die Adhärenz der Thrombozyten die essentielle Bedingung für ein verlängertes Überleben apoptotischer Monozyten in Gegenwart von Thrombozyten ist.

4.3.5 Unterscheidung zwischen Adhärenz und Phagozytose

Zur Unterscheidung, ob membranmarkierten Thrombozyten an Monozyten adhären oder von diesen ingestiert worden waren und zur weiteren Bestätigung, dass Thrombozyten durch apoptoseinduzierte Monozyten phagozytiert werden, erfolgte nach der Kokultivierungszeit die Anwendung der Substanzen Trypsin/EDTA und Trypanblau.

Dabei sollte eine möglichen Adhärenz von FITC-konjugierten Thrombozyten an Monozyten durch eine enzymatische Trennung mit Hilfe des Enzyms Trypsin, wie im Methodenteil der Veröffentlichung von Brown und Savill geschildert [22], sowie durch die Komplexbildung der für eine Adhärenz grundlegenden Ca^{2+} -Ionen mit EDTA aufgelöst werden. Der Einsatz von Trypanblau wurde nach einer Einleitung von Wan und Lau durchgeführt [192], um gegebenenfalls die extrazelluläre Fluoreszenz der Monozyten mit adhären, fluoreszierende Thrombozyten zu unterdrücken.

Zugrundeliegend konnte bei der Testung der beiden Substanzen auf die reine, membrankonjugierte Thrombozytenpopulation ausgemacht werden, dass die Lösung Trypsin/EDTA fast keinen Einfluss auf die hohen Signalintensitäten der FITC-konjugierten Thrombozyten hatte, aber Trypanblau die Membranfluoreszenz der Thrombozyten beinahe vollständig auslöschte, da der blaue Farbstoff die grüne Fluoreszenz überlagerte. Dieser Kontrollversuch stimmte mit Angaben der Literatur überein, wobei die Fluoreszenz von FITC-markierten *E. coli* durch unterschiedliche Konzentrationen von Trypanblau unterdrückt werden konnte [192].

Nach einer durchflußzytometrischen Einstellung, die nur den monozytären Zellbereich auswählte, konnten hohe Fluoreszenzintensitäten und eine Anhebung der durchschnittlichen Zellgröße der Monozytenpopulation nach der Gabe von fluoreszenzmarkierten Thrombozyten detektiert werden. Die Steigerung der durchschnittlichen Zellgröße der Monozyten mit kokultivierten Thrombozyten im Gegensatz zu den apoptoseinduzierten Monozyten ohne Thrombozytengabe konnte als Anzeichen für monozytäre Vitalität gedeutet werden. Die Applikation der Trypsin/EDTA-Lösung zur enzymatischen und chemischen Ablösung von eventuell adhärenen Thrombozyten an Monozyten ergab keine Veränderungen. Daneben führte der Einsatz von Trypanblau nach der gemeinsamen Inkubationszeit von Monozyten und FITC-konjugierten Thrombozyten zu keiner Reduzierung der FITC-Signalintensitäten. Da somit eine extrazelluläre Überlagerung der Grünfluoreszenz mit Trypanblau nicht möglich wurde, konnte gefolgert werden, dass sich die fluoreszenzmarkierten Membranen der Thrombozyten im Intrazellularraum der Monozyten befinden mussten. Anhand der Ergebnisse dieser Versuche konnte unterschieden werden, dass der beträchtlichste Teil der membranmarkierten Thrombozyten nicht lediglich adhärent, sondern von den apoptoseinduzierten Monozyten phagozytiert worden war.

Insgesamt bestätigte sich wiederum die Ausgangshypothese, dass die Phagozytose von Thrombozyten durch apoptoseinduzierte Monozyten die Voraussetzung für die Protektion monozytärer Apoptose durch Thrombozyten ist.

4.3.6 Die Einflüsse der Phagozytose auf die Apoptose von Monozyten

Im Zusammenhang mit der Bedeutung der Phagozytose für die Apoptose der Monozyten werden in Abhängigkeit von der eingesetzten Internalisationssubstanz konträre Entdeckungen wiedergegeben und diskutiert.

So liegt zum Beispiel nach der Infektion von Monozyten mit *Staphylokokkus aureus* eine erhöhte Apoptoserate vor [61]. Dabei induziert die monozytäre Phagozytose der Bakterien einen proapoptotischer Signaltransduktionsweg, indem über die Interaktion zwischen FAS-Liganden und FAS-Rezeptoren sowie folgend durch eine Aktivitätssteigerung der Caspase-8 und Caspase-3 und durch eine mögliche Beteiligung von reaktiven Sauerstoffintermediaten der natürliche Zelltod der Monozyten initiiert wird [11,12]. Indes führt eine Infektion von Granulozyten mit *Staphylokokkus aureus* ebenso zu einer Phagozytose der Bakterien, allerdings zu einem verlängertem Überleben der Granulozyten [11].

Die Infektionen von Monozyten mit den Bakterien *Escheria coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella enteritidis* [11,50] ziehen analog zur monozytären Aufnahme der Bakterienspezies *Staphylokokkus aureus* [61] eine Apoptoseinitiierung der Monozyten nach sich.

Dagegen inhibiert das Bakterium *Chlamydia pneumoniae* die Apoptose von Monozyten [55]. Ebenso konnte bei einer Infektion von Monozyten mit niedrigen Dosierungen des intrazellulär, erscheinenden Mykobakterium *tuberculosis* über eine Freisetzung von Interleukin-1 β und TNF- α eine Suppression der monozytären Apoptose erfasst werden [50,58,140].

Außerdem geht die phagozytotische Beseitigung von gealterten Erythrozyten durch Monozyten und Makrophagen mit einer erhöhten Synthese von intrazellulären Hitze-Schock-Proteinen einher, die einen Schutz vor Apoptose bewirken und damit vermutlich einen physiologischen Mechanismus der Autoprotektion der Phagozyten repräsentieren [26].

Insgesamt konnte mit Bezug auf die vorliegenden Versuchsergebnisse und nach Kenntnis der Literaturmeinungen die Feststellung getroffen werden, dass die Phagozytose per se nicht zu einer Suppression der Apoptose von Monozyten führt. Infolgedessen war die Protektion der monozytären Apoptose im Rahmen der Phagozytose vom internalisierten Material abhängig und war spezifisch für Thrombozyten.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit wurde die Folgerung aufgestellt, dass die Phagozytose von Thrombozyten durch Monozyten über die Ingestion von thrombozytären Oberflächenmolekülen und intrazellulären Komponenten in die monozytären Phagolysosomen differente Kaskaden zum Überleben der Monozyten prozessiert, wie gezeigt an der verminderten Caspase-3-Aktivität und der vermehrten CD14-Rezeptor-Expression.

Bezugnehmend zur klinischen Immunologie wurde hypothetisch erwogen, dass die Protektion der Monozyten durch Thrombozyten ins antiinflammatorische Schema der Phagozytose einzuordnen ist. Diesbezüglich wurde in Publikationen nach der Aufnahme von Zellen durch Phagozyten von einer Zunahme immunsuppressiver Regulationswege berichtet, indem proinflammatorische Zytokine vermindert und antiinflammatorische Signale, wie Interleukin-6, Interleukin-10 und TGF- β , vermehrt freigesetzt wurden [46,67].

4.4 Effekte von Adhäsionsinhibitoren

Bei der Erforschung der Auswirkungen von Thrombozyten auf die Apoptose von Monozyten wurden verschiedene Oberflächenrezeptoren beider Zellarten mit einbezogen. Diesbezüglich wurde angenommen, dass blockierende Antikörper als auch inhibierende Reagenzien gegen thrombozytäre Adhäsionsantigene sowie monozytäre Phagozytoserezeptoren zu einer jeweiligen Blockierung der Adhäsion und damit zu einer Unterbindung der gegenseitigen Interaktion von Thrombozyten und Monozyten führen könnten.

Auf der Seite der Thrombozyten wurde zum einen der CD41a-Rezeptor, auch GP IIb/IIIa Komplex genannt und von großer Gewichtung bei der Fibrinogen-abhängigen Adhäsion von aktivierten Thrombozyten an Leukozyten [171,172], mit dem RGD beinhaltenden Peptid RGDS sowie mit einem blockierenden Antikörper (Klon P2) besetzt. Der eingesetzte Antikörper sollte besonders effizient die Kollagen und ADP vermittelte Aggregation von Thrombozyten verhindern [113]. Dies bewirkte bei Kehrel und Spangenberg eine signifikant verminderte Rosetten-Formation von ADP-aktivierten Thrombozyten und Monozyten und somit eine geringere Aggregation [171,172]. Hingegen konnten Silverstein und Nachman einige Jahre zuvor mit dem Tetrapeptid RGDS keine Inhibition der Bindung von Thrombozyten und Monozyten herausfinden. Sie berichteten aber von einer Beteiligung von Thrombospondin und dem Glykoprotein IV bei der Thrombozyten-Monozyten-Adhäsion und einer möglichen Interaktion von Fibrinogen mit CD41a [168]. Die Publikation einer Münchner Arbeitsgruppe von Neumann und Gawaz beschreibt in jüngster Zeit sogar eine therapeutische Option, in Hinblick auf akute Myokardinfarkte, mit der Blockade des Glykoproteins IIb/IIIa bei der Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten [126].

Zum anderen wurde der thrombozytäre CD62P-Rezeptor mit einem spezifischen Antikörper blockiert. Hierzu ist in der Literatur beschrieben, dass bei der Plättchenaktivierung Glykoproteine, wie CD62P, gleichzusetzen mit der Bezeichnung GMP-140 und P-Selektin, aus der Membran der intrazellulären α -Granula in die thrombozytäre Zytoplasmamembran integriert werden [121]. Demzufolge kann die

CD62P-Expression auf der Thrombozytenoberfläche als Aktivierungsmarker für z.B. Thrombin oder ADP stimulierte Thrombozyten dienen. Maßgeblich ist der CD62P-Rezeptor aber auch als Adhäsionsmolekül an der Bindung von Thrombozyten an Monozyten beteiligt [121,148,172]. Dabei ist weiter Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion, ob ein zugehöriger, ligierender Rezeptor auf Monozyten als CD15 existiert [172]. *In vitro* binden durch Thrombin aktivierte Thrombozyten über ein spezifisches Epitop von P-Selektin an Leukozyten [148,149] und durch die Inhibition des CD62P-Rezeptors zeigte sich eine reduzierte Rosetten-Bildung [171,172]. Ebenfalls wurde berichtet, dass aktivierte Thrombozyten über P-Selektin eine Ausschüttung von Sauerstoffradikalen der Monozyten induzieren konnten [121] und dass immobilisiertes P-Selektin die Phagozytose von Monozyten ansteigen ließ [38]. Dies führte folgend zu einer monozytären Freisetzung von TNF- α , das eine Schlüsselrolle bei Entzündungsreaktionen, Immunantworten und bei der Entwicklung einer Thrombose einnimmt [90]. Außerdem schien im Tiermodell P-Selektin der wichtigste Adhäsionsrezeptor von Thrombozyten bei der Rekrutierung von Leukozyten in Wundgebiete und bei der Progression der Atherosklerose zu sein [35].

In Kongruenz mit den Veröffentlichungen von Andonegui, der keine Auswirkungen der Inhibition von CD62P sowie CD41a mit unterschiedlichen Reagenzien und monoklonalen Antikörpern auf den Apoptoseschutz von Neutrophilen durch Thrombozyten feststellte [7], konnten auch in den hiesigen Versuchsdurchführungen keine Effekte der thrombozytären Adhäsionsinhibitoren auf die Bewahrung vor serumdeprivierter Apoptose von Monozyten durch Thrombozyten registriert werden.

Auf der Seite der Monozyten wurde der Phosphatidylserin-Rezeptor durch die Gabe von aggregationshemmenden, stereo-spezifischen Phospho-L-serin besetzt. Dabei konkurrierten Phosphatidylserine der Außenmembran von Thrombozyten und Phospho-L-serin kompetitiv um die monozytären Rezeptoren. Diesbezüglich ist noch ungeklärt, ob es sich um einen einzelnen, spezifischen Rezeptor oder um eine bereits identifizierte Rezeptorengruppe handelt [45]. Das Präsentieren von Phosphatidylserinen an der äußeren Seite der Plasmamembran ist eine Oberflächenveränderung, die bei apoptierenden Zellen auftritt und dann zu einer Erkennung der apoptotischen Zellen

durch Phagozyten, wie z.B. Monozyten, führen kann [42,44,45,67,157]. In neueren Abhandlungen wurde dazu veröffentlicht, dass Thrombozyten apoptoseähnliche Veränderungen während der Aktivierung [166,193] und auch einen konstitutiven Zelltod durch Ionomycin-Gabe [188] und Plasmaentzug [22] aufweisen, bei denen es unter anderem zu einer Externalisation von Phosphatidylserinen kommt.

Weiterhin erfolgte die Blockade der unterschiedlichen Epitope des CD14-Rezeptors mit monoklonalen Antikörpern der Klone My4 und Mem18. Neben der Funktion als wichtigster Rezeptor für bakterielle Lipopolysaccharide [89,143], ist CD14 als Oberflächenantigen auf Monozyten auch bei der Erkennung und Phagozytose von apoptotischen Zellen involviert [65,94,159].

Ebenfalls wurde der monozytäre Thrombospondin-Rezeptor mit einem blockierenden Antikörper besetzt. Dieser CD36-Rezeptor von Monozyten ist nicht zu verwechseln mit dem CD36-Rezeptor von Thrombozyten, der Kollagen binden [84] und mit Cholesteryl-Hämisuccinat [92] oder mit oxLDL [196] interagieren kann. Mehrere Integrine, wie $\alpha_v\beta_3$ oder $\alpha_4\beta_1$, werden mit dem monozytären Thrombospondin-Rezeptor assoziiert. Thrombozyten können über eine Kooperationsbrücke durch das extrazellulär vorkommende und sodann an der thrombozytären Membranaußenseite gebundene Thrombospondin ligiert werden, wie von Schmitz bezüglich atherosklerotischer Prozesse anschaulich dargestellt [164]. Übereinstimmend beschrieben bereits 1988 Silverstein und Nachman, dass die adhäsive Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten durch Thrombospondin und über das an der Oberfläche beider Zellen expremierte Glykoprotein IV, später als Thrombospondin-Rezeptor oder einfach CD36 definiert, vermittelt wird. Sie sahen durch den Einsatz von Antikörpern gegen den monozytären CD36-Rezeptor eine Inhibition der Rosetten-Formationen von Monozyten und Thrombozyten und damit eine verminderte Zell-Zell-Adhärenz [168]. Außerdem wird dem CD36-Rezeptor von Monozyten über die Adhäsion mit Hilfe von Thrombospondin-Brücken eine Beteiligung im Rahmen der Ingestion von apoptotischen Neutrophilen [42] und Eosinophilen [174] durch Monozyten nachgewiesen [157]. Zusätzlich wird auch eine indirekt Kooperation bei der Phosphatidylserin-Rezeptorbindung beschrieben [45,177].

Zusätzlich erfolgte in der Arbeit die Analyse der Interaktionen über den CD40-Rezeptor von Monozyten. Hierzu wurde zunächst die Expression von CD40 auf vitalen Monozyten eindeutig nachgewiesen und die Stimulation der Monozyten mit dem Zytokin $\text{INF}\gamma$ und insbesondere mit dem Wachstumsfaktor GM-CSF führte zu einer deutlichen Steigerung der exprimierten CD40-Antigene. Dies ging in Konzentration, Zeitkinetik und Signalintensität mit den Ergebnissen von Alderson konform [2]. CD40 ist ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie und der monozytäre CD40-Rezeptor interagiert vor allem mit dem natürlichen Liganden CD40L, der vor allem auf aktivierten, CD4-positiven T-Helferzellen präsentiert wird. Diese Interaktion kann zu einer Aktivierung der Zellen mit vermehrter Zytokinproduktion von IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 [2,144,190] und insbesondere zu einer CD40L-konzentrationsabhängigen Induktion der $\text{TNF}\alpha$ -Produktion führen. Dabei ist bekannt, dass $\text{TNF}\alpha$ nicht nur proinflammatorisch wirkt, sondern auch mit einer Protektion der Monozyten vor Apoptose einhergeht [2,100]. Über eine Bindung des CD40-Liganden von T-Lymphozyten an den CD40-Rezeptor von Makrophagen wird ebenfalls ein Schutzmechanismus vor dem programmierten Zelltod ausgelöst [2,142]. Nebenbei kann die Bindung des Liganden an CD40 zu einer vermehrten Freisetzung Matrix-degradierender Proteinase und damit zu einem erhöhtem Verdau von extrazellulären Matrix-Komponenten, wie Kollagen und Elastin, sowie zu einer Verstärkung der Aktivität des Gewebefaktors führen und infolgedessen pathophysiologisch akute, atherosklerotische Komplikationen bedingen [103]. In besonderer Weise erbrachten die Studien der Arbeitsgruppe von Henn den Beweis, dass der CD40-Ligand auch auf aktivierten Thrombozyten exprimiert wird und auch eine Interaktion zwischen thrombozytärem CD40-Liganden und monozytärem CD40-Rezeptor besteht [71]. Hypothetisch kann gemutmaßt werden, dass folglich diese Interaktion zu einer Protektion der Monozyten vor Apoptose beitragen könnte. Hingegen könnte ebenfalls eine Generierung von inflammatorischen Signalen induziert werden sowie ein Antrieb der prokoagulierenden Aktivität [144] zu einer Förderung der Pathogenese der Arteriosklerose leiten. In den Versuchserien wurde die Ligation zwischen Thrombozyten und Monozyten mit einem CD40 besetzenden Antikörper Klon BL-C4 unterbunden. Dieser Antikörper konnte aber an sich schon die IL-1 Synthese [71,172] und Gewebefaktor-Expression [144] bewirken. Die alleinige Inkubation der Monozyten mit dem blockierenden, CD40-spezifischem Antikörper übte aber kaum

Veränderungen der Apoptoseraten der serumdeprivierten Monozyten aus. Überdies waren aber auch keine Auswirkungen der Inhibition der Interaktion zwischen monozytärem CD40-Rezeptor und thrombozytärem CD40-Liganden auf die Apoptose-suppression der Monozyten durch die Thrombozyten ersichtlich.

Insgesamt konnte durch die eingesetzten inhibierenden Reagenzien und blockierenden Antikörper gegen die analysierten thrombozytären und monozytären Rezeptoren und Adhäsionswege keine Unterbindung der gegenseitigen Interaktion von Thrombozyten und Monozyten in dem Maße ermittelt werden, dass der Apoptoseschutz der serumentzogenen Monozyten durch die Thrombozyten gemindert wurde. Eine möglicherweise durch die Rezeptorblockaden erfolgte Reduzierung der Adhäsion von Thrombozyten an Monozyten wurde indes methodisch nicht erfasst. Der Einsatz von Kombinationen aus verschiedenen Adhäsionsinhibitoren zeigte ebenfalls keine Effekte in Hinblick auf die Protektion der serumdeprivierten Monozyten vor Apoptose durch Thrombozyten. Dies indizierte eine sehr komplexe Regulationsmöglichkeit der monozytären Phagozytose von Thrombozyten und stützte das Faktum, dass eine große Anzahl von Oberflächenmolekülen an der Interaktion von Thrombozyten und Monozyten involviert ist. Insofern ist die nicht ausgelöste Hemmung der Phagozytose durch einen der eingesetzten Antikörper nicht verwunderlich, da möglicherweise die unblockierten Rezeptoren und Membranantigene die fehlende Funktion der inhibierten Oberflächenmoleküle ausgleichen konnten. So ergründen Veröffentlichungen die wichtige Rolle des Integrin-Mac-1-Komplexes (CD11b/CD18) im Rahmen der monozytären Adhäsion und bei verschiedenartiger Ligandenbindung [134,139]. Außerdem werden in einem sehr detaillierten Bericht von Schmitz die Funktionen von Scavenger-Rezeptoren, Glykosolphosphatidylinositol-assoziierten Rezeptoren, Fc-Rezeptoren, Integrin-Rezeptoren und weiteren Membranproteinen bei der Adhäsion und Signalweiterleitung von Makrophagen und bei der Verwicklung in die Atherogenese aufgeführt [164]. Insbesondere Brown und Savill konkretisieren, dass Scavenger-Rezeptoren der Klasse A die Erkennung und Aufnahme von gealterten Thrombozyten übernehmen [22]. Im Laufe der Versuchsreihen hätten also gegebenenfalls noch Adhäsionsmechanismen weiterer thrombozytärer und monozytärer Oberflächenantigene erforscht werden können, wenngleich die Problematik der gleichzeitigen Blockierung

unterschiedlicher Rezeptoren mit möglichen Eigeneffekten der verschiedenen, inhibierenden Antikörper und Reagenzien bestehen bleibt und letztendlich die Auswirkungen auf die Apoptosebewahrung der Monozyten durch Thrombozyten, herbeigeführt durch Phagozytose, spekulativ bleiben.

4.5 Suppression der Apoptose von Monozyten durch aktivierte Thrombozyten

Um den Zusammenhang zwischen der Protektion von serumdeprivierten Monozyten vor Apoptose durch Thrombozyten und dem thrombozytären Aktivierungsgrad zu analysieren, wurden zunächst Thrombozyten in isotonen und hypotonen Puffer aufbereitet. Aus Publikationen ging hervor, dass Thrombozyten zum einen klassisch mit Thrombin oder ADP [98,171,172] stimuliert werden und dabei eine bessere Bindung an Monozyten als unstimulierte Thrombozyten eingehen können [81,148]. Dabei kam es infolge der Aktivierung zu einer verstärkten Expression von CD62P aus intrazellulären α -Granula an der Plättchenmembran [98,111,148,172]. Im Methodenteil der Veröffentlichungen stand allerdings meistens zu lesen, dass nach einer kurzen Inkubationszeit von Thrombin oder ADP mit Thrombozyten eine Fixierung der Thrombozyten stattfand [98,172]. In Bezug hierzu wurde aber bei denen in dieser Arbeit durchgeführten Ansätzen mit der Kokultivierung von Monozyten mit Thrombozyten befürchtet, dass eine Fixierung der Thrombozyten zu stark die Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten beeinflussen könnte. Hingegen war auch nicht auszuschließen, dass ohne eine Fixierung der Thrombozyten eine eigene monozytäre Antwort auf das mit den Thrombozyten inkubierte Thrombin erfolgen könnte. In der Literatur wird anderweitig berichtet, dass hypotone Lösungen zu einem Anschwellen der Thrombozyten mit einer Beeinflussung der Zytoskelettintegrität [8,22,118] und zu einer thrombozytären Selbstaggregation [37,183] sowie zu einem Anstieg des Aktivitätsmarkers CD62P [31,77] leiten können. So wurde die Natriumchlorid-Konzentration des isotonen Hepes/Tyrode-Puffers deutlich gesenkt und ein hypoosmotischer Gradient an den Thrombozyten erreicht. Zusätzlich wurde die aggregationhemmende Substanz Apyrase [71,132,188] weggelassen, um eine maximale Aktivierung der Thrombozyten zu erlangen. Bei der durchflußzytometrischen Prüfung der reinen Thrombozytenpopulation fiel danach zum einen ein Formenwandel der Zellwolke auf, der auf eine Aktivierung und Aggregatbildung nach Recherche der Darstellungen von Koksich und Woinke [91] hindeutete. Zum anderen wurde eine sehr hohe CD62P-Expression der in hypotonen Puffer gewaschenen Thrombozyten gemessen, die die Aktivierung der Thrombozyten bestätigte.

Vor dem Hintergrund dieser Resultate wurden dann aufsteigende Anzahlen von nun durch den hypotonen Waschpuffer stimulierten und damit aktivierten Thrombozyten mit Monozyten kokultiviert. Dabei zeigte sich im Vergleich zu den Auswirkungen von isoton aufgereinigten und somit kaum voraktivierten Thrombozyten, dass eine signifikante Suppression der monozytären Apoptoserate schon bei wesentlich kleinerer Thrombozytenanzahl auszulösen war. Dies konnte daran liegen, dass durch die vermehrte Aggregatbildung der aktivierten Thrombozyten einige Thrombozyten bei der aufwendigen, lichtmikroskopischen Auszählung nicht erfasst wurden und so von einer geringeren Anzahl an Thrombozyten zur Kokultivierung mit Monozyten ausgegangen wurde. Vor allem aber binden stimulierte Thrombozyten im erheblich stärkerem Maße an Monozyten, wie z.B. Untersuchungen der Arbeitsgruppen von Jungi oder von Rinder bezeugten [81,148].

Die Korrelationsdarstellung zwischen dem Grad des Apoptoseschutzeffektes von serumdeprivierten Monozyten bei der Anzahl von 10×10^6 entweder unstimulierten oder stimulierten Thrombozyten und der jeweiligen thrombozytären Expression von CD62P veranschaulichte zusammenfassend die eindeutige Abhängigkeit der Protektion der monozytären Apoptose vom Aktivitätszustand der Thrombozyten. Indem eine hohe CD62P-Expression eine erhebliche Aktivierung der Thrombozyten anzeigte, konnte durch die Gabe dieser Thrombozyten die Apoptoserate der Monozyten stärker vermindert werden als durch die Gabe der unstimulierten Thrombozyten. Diese Ergebnisse divergieren zu einigen Literaturaussagen, in denen P-Selektin eine untergeordnete Rolle bei der Phagozytose von gealterten Thrombozyten bescheinigt wird [22] und Andonegui keine Beziehung zwischen der thrombozytären Aktivierung und der Bewahrung der Apoptose von Neutrophilen durch Thrombozyten herstellen konnte [7]. Dennoch scheint die positive Korrelation zwischen der Suppression der monozytären Apoptose durch Thrombozyten und dem Aktivitätsgrad von Thrombozyten plausibel zu sein, da durch eine hochgradige Oberflächenexpression von CD62P von aktivierten Thrombozyten eine verstärkte Ligation an Monozyten resultieren konnte und so eine gesteigerte Interaktion zwischen Thrombozyten und apoptierenden Monozyten möglich wurde.

5 Zusammenfassung

Monozyten interagieren mit Thrombozyten in mannigfachen Situationen wie bei Entzündungsreaktionen, Hämostasevorgängen oder Gefäßwandveränderungen. Bei entzündlichen und thrombotischen Erkrankungen kommt es zu einer Anhäufung von Monozyten und Thrombozyten an entzündlichen Stellen und endothelialen Verletzungen.

In dieser Studie wurden die unterschiedlichen Interaktionen zwischen Monozyten und Thrombozyten untersucht und dabei der Einfluss von Thrombozyten auf die Apoptose von Monozyten analysiert. Humane Monozyten wurden frisch isoliert und die monozytäre Apoptose wurde dann mit Serum-Deprivation oder Stimulation über eine CD95/FAS-Ligation oder mit Interleukin 4 induziert. Anschließend erfolgte die gemeinsame Kokultivierung mit Thrombozyten. Der Apoptosenachweis der Monozyten wurde mittels Durchflußzytometrie über eine Propidiumjodid-Färbung und einem TUNEL-Assay, mittels einer DNA-Elektrophorese und mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie geführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Apoptose von Monozyten durch die Kokultivierung mit Thrombozyten supprimiert wurde. Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigten die Aufnahme von Thrombozyten in den Monozyten über Phagozytose. Die Blockierung der monozytären Phagozytose durch Cytochalasin D verhinderte die Ingestion der Thrombozyten durch die Monozyten und führte zu hohen monozytären Apoptoseraten. Das Überleben der Monozyten ging mit einer Herunterregulation des intrazellulären Schlüsselenzyms Caspase-3 in Zusammenhang mit der Aufnahme von Thrombozyten einher. Lösliche, thrombozytäre Faktoren hatten ebenso keinen Einfluss auf die monozytäre Apoptose wie die Gabe von Latex-Partikeln oder Zymosan A. Auch die Blockierung der verschiedenartigsten monozytären und thrombozytären Rezeptoren, die bei der Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten von Bedeutung sind, wie zum Beispiel CD41a, CD62P, CD14, CD36 und CD40 konnte den zytoprotektiven Effekt der Thrombozyten auf die Monozyten nicht verhindern.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchungen eine Unterdrückung der Apoptose der Monozyten durch Thrombozyten über spezifische, von der Phagozytose abhängige Mechanismen mit weitreichenden Konsequenzen für artherosklerotische oder entzündliche Prozesse.

6 Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen und Ergebnisse zur Interaktion von Thrombozyten und Monozyten, insbesondere die Apoptosehemmung von Monozyten durch die Phagozytose von Thrombozyten, eröffnen weitere Aufgaben und neue Fragestellungen.

Der Apoptoseschutz der Monozyten durch Thrombozyten zeigte sich unter anderem in einer Herunterregulation des Apoptose-initiiierenden Signalkaskadenenzym Caspase-3 bei serumdeprivierten Monozyten. Bezüglich der konstitutiven oder durch Stimulation mit α CD95/FAS mAb induzierten Apoptose der Monozyten und der Unterdrückung der Apoptose durch phagozytierte Thrombozyten bleibt zu klären, welche weiteren intrazellulären Enzyme, Botenstoffe und Regulationswege, die bei der Komplexität des programmierten Zelltodes eine Rolle spielen, involviert sind und Veränderungen zeigen. Zu diesen Aspekten stehen Untersuchungen an, die die Regulation der Caspase-8 und Caspase-9 oder die Expression des Hitze-Schock-Proteins HSP-70 bei apoptierenden Monozyten mit und ohne Kokultivierung von Thrombozyten betrachten.

Es wurde durch die Versuchsreihen mit opsonisierten Latex-Partikeln und mit Zymosan A gezeigt, dass der Prozeß der Phagozytose allein, die Monozyten nicht vor Apoptose schützt. Hierzu wäre weiter zu untersuchen, welche intrazellulären Signalkaskaden der Mechanismen der Phagozytose und der Apoptose sich gegenseitig und auf welche Art und Weise beeinflussen.

Da die Phagozytose von Thrombozyten zu einer Suppression der Apoptose der Monozyten führte, aber die Kultivierung von apoptoseinduzierten Monozyten mit löslichen, thrombozytären Substanzen aus fragmentierten Thrombozyten keinen Apoptoseschutz bewirkte, wären entsprechende Experimente in der Folgezeit interessant, die Effekte von spezifischen, thrombozytären Inhaltsstoffen auf die monozytäre Apoptose analysieren.

Die Blockierung von unterschiedlichen monozytären und thrombozytären Rezeptoren, wie CD41a, CD62P, CD14, CD36 und CD40, und damit von gemeinsamen Adhäsionswegen, konnte auch bei Einsatz von Kombinationen aus verschiedenen Inhibitoren die

Ingestion der Thrombozyten und die Suppression der Apoptose von Monozyten durch die phagozytierten Thrombozyten nicht verhindern. Hinsichtlich dieser Abklärung müssten weitere Rezeptoren und Membranantigene, die an der Adhärenz von Thrombozyten und Monozyten involviert sind, wie zum Beispiel der Integrin-Mac-1-Komplex (CD11b/CD18) oder Scavenger-Rezeptoren, erforscht werden. Hierbei liegt auch in der Zukunft vor allem bei der simultanen Blockierung möglichst vieler Rezeptoren eine komplizierte, wissenschaftliche Herausforderung.

Obwohl die Aggregation zwischen Monozyten und Thrombozyten im Blut gut analysiert wurde, ist unter physiologischen Bedingungen im Blutstrom eine Hauptrolle dieses Mechanismus nicht anzunehmen. Wenn jedoch Thrombozyten bei vaskulären Störungen oder bei entzündlichen Veränderungen aktiviert werden, könnten die dann vermehrt gebildeten Aggregate einen relevanten Effekt darstellen. So kommt es bei atherosklerotischen Läsionen zu einer Anhäufung, Adhäsion und Interaktion von Monozyten und Thrombozyten. Dabei ist das Überleben von Monozyten von Bedeutung für die Progression der Atherosklerose und die Apoptosehemmung der Monozyten durch Thrombozyten ist eventuell im unterschiedlichen Maße für die Komplikationen im Rahmen der atherosklerotischen Prozesse verantwortlich. Hinsichtlich dieser Aspekte könnten zukünftige *in vitro* und tierexperimentelle Studien, unter anderem mit dem thrombozytenaggregationshemmenden Wirkstoff Abciximab, ein Immunglobulin G1 gegen das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ von humanen Thrombozyten, folgen.

Die Entwicklung und das Fortschreiten rheumatologischer Systemerkrankungen ist wesentlich von den beteiligten Zellen abhängig, ob sie destruierend oder schützend in das Entzündungsgeschehen eingreifen und wie lang sie vor Ort überleben. So kommt es bei der rheumatoiden Arthritis zu einer Gelenkinfiltration durch proinflammatorische Zellen wie Monozyten. Aber auch Thrombozyten werden vermehrt in der Synovialflüssigkeit gefunden. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten das Verständnis pathophysiologischer Regulationen bei der rheumatoiden Arthritis erhöhen. Hierzu könnten Untersuchungen an Zellisolaten aus Gelenkpunktaten von Patienten mit rheumatoider Arthritis weitere Erkenntnisse liefern und mögliche therapeutische Konsequenzen erschließen.

Zusammenfassend könnten die Studienergebnisse wichtige Folgerungen für das Verstehen der Entwicklung und Progression von thrombotischen und entzündlichen Erkrankungen, rheumatologischen Systemerkrankungen und der Atherosklerose nach sich ziehen und in Zukunft eventuell therapeutische Optionen eröffnen. Zusätzlich bieten weitere Einblicke in intrazelluläre Regulationswege bei der monozytären Apoptose potentielle Ansätze, die Vitalität und Abwehrfunktionen von Monozyten bei Erkrankungen wie Infektionen und Tumorleiden zu stärken.

7 Abkürzungsverzeichnis

Ab	engl. Antibody (Antikörper)
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata (Doppelt destilliertes Wasser)
BSA	engl. bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
°C	Grad Celsius
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	engl. cluster of differentiation (Nomenklatur für Oberflächenmarker)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat
engl.	Englische Übersetzung
F	Faktor
Fc	Konstanter Teil eines Immunglobulins
FACS	engl. fluorescent activated cell sorter (Durchflußzytometrie)
FCS	engl. fetal calf serum (Fötäles Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	engl. forward angle light scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm

GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor
GP	Glykoprotein
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IFN- α	Interferon alpha
IFN- γ	Interferon gamma
i.v.	Intravenös
k	Kilo
kD	Kilodalton
kV	Kilovolt
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
log	Logarithmisch
M	Molarität (g/mol) oder Marker
m	Milli oder monoklonal
mA	Milliampere
mAb	engl. monoclonal antibody (Monoklonaler Antikörper)
MCP	Monozyten-chemotaktisches-Protein
MG	Molekulargewicht
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex

min	Minute
n	Nano oder Versuchsanzahl
NK	Natürliche Killerzellen
p	Signifikanzmaß oder polyklonal
PAF	Plättchenaktivierungsfaktor
PBS	engl. Phosphat buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
PDGF	engl. platelet-derived-growth-factor (Plättchen-Wachstumsfaktor)
PI	Propidiumjodid
PSGL	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand
RGDS	Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Serin
RT	Raumtemperatur
rel.	Relativ
rpm	engl. revolution per minute (Umdrehung pro Minute)
s	Sekunde
SSC	engl. side scatter (Seitwärtsstreulicht)
t	engl. time (Zeit)
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF- β	Tumor-Wachstum-Faktor beta
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TNF- β	Tumor-Nekrose-Faktor beta
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	Octylphenolpoly(ethylenglycolether) _n
TZ	Thrombozyten

U	engl. Units (Einheiten)
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volumen
vWF	von Willebrand Faktor
x g	Vielfache der Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$)

8 Literaturverzeichnis

1. Adams JM, Cory S (1998)
The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.
Science 281: 1322-1326
2. Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK (1993)
CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40.
J Exp Med 178: 669-674
3. Algeciras-Schimmich A, Griffith TS, Lynch DH, Paya CV (1999)
Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis.
J Immunol 162: 5205-5211
4. Aliprantis AO, Yang R-B, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf J, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A (1999)
Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2.
Science 285: 736-739
5. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996)
Human ICE/CED-3 protease nomenclature.
Cell 87: 171
6. Ameisen JC (1995)
From cell activation to cell depletion. The programmed cell death hypothesis of AIDS pathogenesis.
Adv Exp Med Biol 374: 139-163

7. Andonegui G, Trevani AS, Lopez DH, Raiden S, Giordano M, Geffner JR (1997)
Inhibition of human neutrophil apoptosis by platelets.
J Immunol 158: 3372-3377
8. Arnaud F (1999)
Frozen/Thawed platelets: Importance of osmotic tolerance and platelet subpopulations.
Cryobiology 38: 192-199
9. Ashkenazi A, Dixit VM (1998)
Death receptors: signaling and modulation.
Science 281: 1305-1308
10. Aviram M, Hussein O, Rosenblat M, Schlezinger S, Hayek T, Keidar S (1993)
Interactions of platelets, macrophages, and lipoproteins in hypercholesterolemia: antiatherogenic effects of HMG-CoA reductase inhibitor therapy.
J Cardiovasc Pharmacol 31: 39
11. Baran J, Guzik K, Hryniewicz W, Ernst M, Flad H-D, Pryjma J (1996)
Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria.
Infect Immun 64: 4242-4248
12. Baran J, Weglarczyk K, Mysiak M, Guzik K, Ernst M, Flad H-D, Pryjma J (2001)
Fas (CD95)-Fas ligand interactions are responsible for monocyte apoptosis occurring as a result of phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*.
Infect Immun 69: 1287-1297
13. Barinaga M (1998)
Is apoptosis key in Alzheimer's disease?
Science 281: 1303-1304

-
14. Baumann S, Krueger A, Kirchhoff S, Krammer PH (2002)
Regulation of T cell apoptosis during the immune response.
Curr Mol Med 2: 257-272
 15. Becker BF, heindl B, Kupatt C, Zahler S (2000)
Endothelial function and hemostasis.
Z Kardio 89: 160-167
 16. Bennet MR (1999)
Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and
atherosclerotic plaque rupture.
Cardiovasc Res 41: 361-368
 17. Biancone L, Martino AD, Orlandi V, Conaldi PG, Toniolo A, Camussi G (1997)
Development of inflammatory angiogenesis by local stimulation of Fas in vivo
J Exp Med 186: 147-152
 18. Boecker W, Denk H., Heitz PhU (1997)
Pathologie.
Urban & Schwarzenberg Verlag
 19. Bouchard BA, Tracy PB (2001)
Platelets, leukocytes, and coagulation.
Curr Opin Haematol 8: 263-269
 20. Bradbury AW, Murie JA, Ruckley CV (1993)
Role of the leucocyte in the pathogenesis of vascular disease.
Br J Surg 80: 1503-1512
 21. Braun J, Renz-Polster H (2001)
Basislehrbuch Innere Medizin: 336-340.
Urban & Schwarzenberg Verlag

-
22. Brown SB, Clarke MCH, Magowan L, Sanderson H, Savill J (2000)
Constitutive death of platelets leading to scavenger receptor-mediated phagocytosis.
J Biol Chem 275: 5987-5996
 23. Brown SB, Savill J (1999)
Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes.
J Immunol 162: 480-485
 24. Chen H, Yip YK, George I, Tyorkin M, Salik E, Sperber K (1998)
Chronically HIV-1-infected monocytic cells induce apoptosis in cocultured T cells.
J Immunol 161: 4257-4267
 25. Chinetti G, Griglios S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart J-C, Chapman J, Najib J, Staels B (1998)
Activation of proliferator-activated receptors α and γ induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages.
J Bio Chem 273: 25573-25580
 26. Clerget M, Pradier O (1990)
Erythrophagocytosis induces heat shock protein synthesis by human monocytes-macrophages.
Proc Natl Acad Sci USA 87: 1081-1085
 27. Cohen JJ (1993)
Apoptosis.
Immunol Today 14: 126-130
 28. Cohen JJ (1995)
Exponential growth in apoptosis.
Immunol Today 16: 346-348

-
29. Cory S (1994)
Fascinating death factor.
Nature 367: 317-318
 30. Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F (1997)
Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis).
Cytometry 27: 1-20
 31. Devine DV, Bradley AJ, Maurer E, Levin E, Chahal S, Serrano K, Gyongyossy-Issa MIC (1999)
Effects of prestorage with cell reduction on platelet aggregate formation and the activation state of platelets and plasma enzyme systems.
Transfusion 39: 742-734
 32. Dimmeler S, Zeiher AM (2000)
Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors.
Regulatory Peptides 90: 19-25
 33. Ding F, Fu GQ, Xing FQ, Chen SL, Liu YX (2002)
Effect of abnormal apoptosis in human decidual tissue during early gestation on pregnancy.
Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao 22: 145-147
 34. Dong HD, Kimoto Y, Takai S, Taguchi T (1996)
Apoptosis as a mechanism of lectin-dependent monocyte-mediated cytotoxicity.
Immunol Inv 25: 65-78
 35. Dong ZM, Brown AA, Wagner DD (2000)
Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice.
Circulation 101: 2290-2295

-
36. Egger G, Aglas R, Rainer F (1995)
Blood polymorphonuclear leukocyte migratory activities during rheumatoid arthritis.
Inflammation 19: 651-667
 37. Egger M, Donath E, Ziemer S, Glaser R (1986)
Electrorotation - a new method for investigating membrane events during thrombocyte activation. Influence of drug and osmotic pressure.
Biochem Biophys Acta 861: 122-130
 38. Elstad MR, La Pine TR, Cowley FS, McEver RP, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA (1995)
P-Selectin regulates platelet-activating factor synthesis and phagocytosis by monocytes.
J Immunol 155: 2109-2122
 39. Elstad MR, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA (1995)
The interaction of leukocytes with platelets in blood coagulation.
Curr Opin Haematol 2: 47-54
 40. Embleton MJ, Charleston A, Affleck K (1991)
Efficacy and Selectivity of Monoclonal-Antibody-Targeted Drugs and Free Methotrexate in Fluorescence-Labelled Mixed Tumor-Cell Monolayer Cultures and Multicellular Spheroids.
Int J Cancer 49: 566-572
 41. Endresen GKM, Förre Ö (1992)
Human platelets in synovial fluid. A focus on the effects of growth factors on the inflammatory responses in rheumatoid arthritis.
Clin Exp Rheumatol 10: 181-187
 42. Erwing L-P, Gordon S, Walsh GM, Rees AJ (1999)
Previous uptake of apoptotic neutrophils or ligation of integrin receptors downmodulates the ability of macrophages to ingest apoptotic neutrophils.
Blood 93: 1406-1412

-
43. Evan G, Littlewood T (1998)
A matter of life and cell death.
Science 281: 1317-1322
 44. Fadok V, Savill J, Haslett C, Bratton D, Doherty DE, Campbell PA, Henson P (1992)
Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells.
J Immunol 149: 4029-4035
 45. Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM (1998)
The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes.
Cell Death and Differentiation 5: 551-562
 46. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM (1998)
Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF
J Clin Inv 101: 890
 47. Fahy RJ, Doseff AI, Wewers MD (1999)
Spontaneous human monocyte apoptosis utilizes a caspase-3-dependent pathway that is blocked by endotoxin and is independent of caspase-1.
J Immunol 163: 1762
 48. Famularo G, De Simone C, Marcellini S (1997)
Apoptosis: mechanisms and relation to AIDS.
Med Hypotheses 48: 423-429
 49. Feige JJ, Keramidas M, Chambaz EM (1998)
Hormonally regulated components of the adrenocortical cell environment and the control of adrenal cortex homeostasis.
Horm Metab Res 30: 421-425

-
50. Flad H-D, Grage-Griebenow E, Peterson F, Scheuerer B, Brandt E, Baran J, Pryjma J, Ernst M (1999)
The role of cytokines in monocyte apoptosis.
Pathobiology 67: 291-293
 51. Flanagan MD, Lin S (1980)
Cytochalasin block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin.
J Biol Chem 255: 835
 52. Fujita N, Tsuruo T (1998)
Involvement of Bcl-2 cleavage in the acceleration of VP-16-induced U937 cell apoptosis.
Biochem Biophys Res 246: 484-488
 53. Gawaz M (1999)
Das Blutplättchen.
Georg Thieme Verlag
 54. Gemsa D, Kalden JR, Resch K (1997)
Immunologie.
Georg Thieme Verlag
 55. Geng Y, Shane RB, Berencsi K, Gonczol E, Zaki MH, Margolis DJ, Trincheri G, Rook AH (2000)
Chlamydia pneumoniae inhibits apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells through induction of IL-10.
J Immunol 164: 5522-5529
 56. Gohda E (2002)
Function and regulation of production of hepatocyte growth factor (HGF).
Nippon Yakurigaku Zasshi 119: 287-94, 309

-
57. Goppelt-Strubbe M, Wiedemann T, Heusinger-Ribeiro J, Vucadinovic M, Rehm M, Pröls F (2000)
Cox-2 and osteopontin in cocultured platelets and mesangial cells: Role of glucocorticoids.
Kidney Int 57: 2229-2238
58. Grage-Griebenow E, Dürrbaum-Landmann I, Pryjma J, Loppnow H, Flad H-D, Ernst M (1998)
Spontaneous occurring apoptosis in monocytes involves Fas/FasL interaction and is influenced by cytokines and microbial infections.
Eur Cytokines Network 9: 699-700
59. Green DR, Reed JC (1998)
Mitochondria and Apoptosis.
Science 281: 1309-1312
60. Green DR, Scott DW (1994)
Activation-induced apoptosis in lymphocytes.
Curr Opin Immunol 6: 476-487
61. Guzik K, Bzowska M, Dobrucki J, Pryjma J (1999)
Heat-shocked monocytes are resistant to *Staphylococcus aureus*-induced apoptotic DNA fragmentation due to expression of HSP72.
Inf Immun 67: 4216-4222
62. Haeffner A, Deas O, Mollereau J, Mignon A, Haeffner-Cavaillon N, Charpentier B, senik A, Hirsch F (1999)
Growth hormone prevents human monocytic cells from Fas-mediated apoptosis by up-regulating Bcl-2 expression.
Eur J Immunol 29: 334-344
63. Hammer A, Hartmann M, Sedlmayr P, Walcher W, Kohnen G, Dohr G (2002)
Expression of functional Fas ligand in choriocarcinoma.
Am J Reprod Immunol 48: 226-234

-
64. Hart PH, Vitti GF, Burgess DR, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA (1989)
Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: Suppression of human monocyte tumor necrosis factor α , interleukin 1, and prostaglandin E₂.
Proc Natl Acad Sci USA 86: 3803-3807

 65. Heidenreich S (1999)
Monocyte CD14: a multifunctional receptor engaged in apoptosis from both sides.
J Leukoc Biol 65: 737-743

 66. Heidenreich S, Lang D, Tepel M, Rahn KH (1994)
Monocyte activation for enhanced tumor necrosis factor- α and interleukin 6 production during chronic renal allograft rejection.
Transplantation and Immunology 2: 35-40

 67. Heidenreich S, Sato T, Schmidt M, August C, Timmermann JJ, van Es LA, Daha MR (1997)
Induction of mesangial interleukin-6 synthesis by apoptotic U937 cells and monocytes.
Kidney Int 52: 318-328

 68. Heidenreich S, Schmidt M, August C, Cullen P, Rademaekers A, Pauels H-G (1997)
Regulation of human monocyte apoptosis by the CD14 molecule.
J Immunol 159: 3178-3188

 69. Heidenreich S, Schmidt M, Bachmann J, Harrach B (1996)
Apoptosis of monocytes cultured from long-term hemodialysis patients.
Kidney Int 49: 792-799

 70. Heinzelmann M, Platz A, Flodgaard H, Polk HC, Miller F (1999)
Endocytosis of Heparin-binding protein (CAP37) is essential for the enhancement of Lipopolysaccharide-induced TNF α production in human monocytes.
J Immunol 162: 4240-4245

-
71. Henn V, Slupsky JR, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA (1998)
CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells.
Nature 391: 591-594
 72. Hensler T, Heidecke CD, Hecker H, Heeg K, Bartels H, Zantl N, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B (1998)
Increased susceptibility to postoperative sepsis in patients with impaired monocyte IL-12 production.
J Immunol 161: 2655
 73. Herold und Mitarbeiter (2000)
Innere Medizin.
Herold Verlag
 74. Heusch G, Erbel R (2002)
Koronare Mikroembolisation.
Dtsch Arzteblatt 99: 2200-2202
 75. Hirokawa M, Kawabata Y, Miura AB (2002)
Dysregulation of apoptosis and a novel mechanism of defective apoptotic signal transduction in human B-cell neoplasms.
Leuk Lymphoma 43: 243-249
 76. Holvoet P, Collen D (1997)
Thrombosis and atherosclerosis.
Atherosclerosis: Cell Biology and Lipoproteins 8: 320-328
 77. Home S, Sweeney JD, Sawyer S, Elfath MD (2000)
The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates: relationship to loss of in vivo viability.
Transfusion 37: 12-17

-
78. Horan PK, Slezak SE (1989)
Stable cell membrane labelling.
Nature 340: 167-168
79. Iwai K, Miyawaki T, Takizawa T, Konno A, Ohta K, Yachie A, Seki H, Taniguchi N (1994)
Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils.
Blood 84: 1201-1208
80. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK (1986)
Regional accumulation of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque.
Arteriosclerosis 6: 131
81. Jungi TW, Spycher MO, Nydegger UE, Barandun S (1986)
Platelet-Leukocyte interaction: Selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes, and related cell lines.
Blood 67: 629-636
82. Kaiser HE, Bodey B (2000)
The role of apoptosis in normal ontogenesis and solid human neoplasms.
In Vivo 14: 789-803
83. Kawane K, Fukuyama H, Yoshida H, Nagase H, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Okada K, Iida T, Nagata S (2003)
Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation.
Nat Immunol 4: 138-144

-
84. Kehrel B, Wierwille S, Clemetson KJ, Anders O, Steiner M, Knight CG, Farndale RW, Okuma M, Barnes MJ (1998)
Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation : It recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, Glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand Factor do not.
Blood 91: 491-499
85. Khanna C, Jaboin JJ, Drakos E, Tsokos M, Thiele CJ (2002)
Biologically relevant orthotopic neuroblastoma xenograft models: primary adrenal tumor growth and spontaneous distant metastasis.
In Vivo 16: 77-85
86. Kiener PA, Davis PM, Sarling GC, mehlin C, Klebanoff SJ, Ledbetter JA, Liles WC (1997)
Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interaction in human monocytes and macrophages.
J Exp Med 185: 1511-1516
87. Kiertcher SM, Roth MD (1996)
Human CD14+ leukocytes acquire the phenotyp and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4.
J Leukoc Biol 59: 208-218
88. Kirveskari J, He Q, Holmström T, Leirisalo-Repo M, Wuorela M, Mertsola J, Granfors K (1999)
Modulation of peripheral blood mononuclear cell activation status during *Salmonella*-triggered reactive arthritis.
Arthritis and Rheumatism 42: 2045-2054
89. Kitchens RL, Wang P-Y, Munford RS (1998)
Bacterial Lipopolysaccharide can enter monocytes via two CD14-dependent pathways.
J Immunol 161: 5534-5545

-
90. Koike J, Nagata K, Kudo S, Tsuji T, Irimura T (2000)
Density-dependent induction of TNF- α release from human monocytes by immobilized P-selectin.
FEBS Letters 477: 84-88

 91. Koksich M, Woinke M (1998)
Durchflußzytometrische Thrombozytendiagnostik
Vom Labor zur klinischen Fragestellung.
Handbuch 1: 1-46
Universität Leipzig, Zentrum für Innere Medizin

 92. Kronenberg A, Grahl H, Kehrel B (1998)
Human platelet CD36 (GPIIb, GP IV) binds to Cholesteryl-Hemisuccinate and can be purified by a simple two-step method making use of this property.
Throm and Haemost 79: 1021-1024

 93. Kucharzik T, Lügering A, Weigelt H, Adolf M, Domschke W, Stoll R (1996)
Immunoregulatory properties of IL-13 in patients with inflammatory bowel disease: comparison with IL-4 and IL-10.
Clin Exp Immunol 104: 483

 94. Kwiatkowska, K., Sobota A (1999)
Signaling pathways in phagocytosis.
Bio Essays 21: 431

 95. Lang D, Hubrich A, Dohle F, Terstesse M, Heidenreich S (2000)
Differential expression of heat shock protein 70 (hsp70) in human monocytes rendered apoptotic by IL-4 or serum deprivation.
J Leukoc Biol

 96. Lauener RP, Goyert SM, Geha RS, Vercelli D (1990)
Interleukin 4 down-regulates the expression of CD14 in normal human monocytes.
Eur J Immunol 20: 2375-2381

-
97. Libby P (2000)
Changing concepts of atherogenesis.
J Intern Med 247: 349
 98. Liu L, Freedman J, Hornstein A, Fenton JW, Ofosu FA (1994)
Thrombin binding to platelets and their activation in plasma.
Br J Haematol 88: 592-600
 99. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997)
DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis.
Cell 89: 175-184
 100. Lügering A, Schmidt M, Lügering N, Pauels H-G, Domschke W, Kucharzik T (2001)
Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway.
Gastroenterology 121: 1145-1157
 101. Lügering N, Kucharzik T, Lügering A, Winde G, Sorg C, Domschke W, Stoll R (1997)
Importance of combined treatment with IL-10 and IL-4, but not IL-13, for inhibition of monocyte release of the Ca²⁺-binding protein MRP8/14.
Immunology 91: 130-134
 102. Lund PK, Westvik A-B, Joo GB, Ovstebo R, Haug KBF, Kierulf P (2001)
Flow cytometric evaluation of apoptosis, necrosis and recovery when culturing monocytes.
J Immunol Methods 252: 45-55
 103. Mach F, Schönbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P (1997)
Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40.
Circulation 96: 396-399

-
104. Maher S, Toomey D, Condrón C, Bouchier-Hayes D (2002)
Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack.
Immunol Cell Biol 80: 131-137
 105. Mangan DF, Mergenhagen SE, Wahl SM (1993)
Apoptosis in human monocytes : Possible role in chronic inflammatory diseases.
J Periodontol 64: 461-466
 106. Mangan DF, Robertson B, Wahl SM (1992)
IL-4 enhances programmed cell death (apoptosis) in stimulated human monocytes.
J Immunol 148: 1812-1816
 107. Mangan DF, Wahl SM (1991)
Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines.
J Immunol 147: 3408-3412
 108. Mangan DF, Welch GR, Wahl SM (1991)
Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α , and IL-1 β prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes.
J Immunol 146: 1446
 109. Marcus AJ (1990)
Stratton lecture 1989. Thrombosis and inflammation as multicellular processes: pathophysiologic significance of transcellular metabolism.
Blood 76: 1903-1907
 110. Marsden VS, Strasser A (2002)
Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-Only Proteins and More.
Annu Rev Immunol 21: 71-105

-
111. Matsubayashi H, Weidner J, Miraglia CC, McIntyre JA (1999)
Platelet membrane early activation markers during prolonged storage.
Thromb Res 93: 151-160

 112. May A, Neumann F-J, Gawaz M, Ott I, Walter H, Schömig A (1997)
Reduction of monocyte-platelet interaction and monocyte activation in patients
receiving antiplatelet therapy after coronary stent implantation.
Eur Heart Journal 18: 1913-1920

 113. McGregor JL, Brochier J, Wild F, Follea G, Trezeciak M-C, James E,
Dechavanne M, McGregor L, Clemetson KJ (1983)
Monoclonal antibodies against platelet membrane glycoproteins.
Eur J Biochem 131: 427-436

 114. Meniconi A, Noll G, Luscher TF (1998)
Is arteriosclerosis an infectious disease ?
Schweiz Rundsch Med Prax 87: 64-74

 115. Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ,
Loscalzo J, Valeri CR (1996)
In vivo tracking of platelets : Circulating degranulated platelets rapidly lose
surface P-selectin but continue to circulate and function .
Proc Natl Acad Sci USA 93: 11877-11882

 116. Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, Hughes BJ, Smith CW (1996)
Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: A
mechanism for recurrent disease ?
J Am Coll Cardiol 28: 345-353

 117. Miller LJ, Marx J (1998)
Apoptosis.
Science 281: 1301

-
118. Mondoro TH, Shafer BC, Vostal JG (1999)
Restoration of in vitro responses in platelets stored in plasma.
Am J Clin Pathol 111: 693-699
 119. Mor G, Straszewski S, Kamsteeg M (2002)
Role of the Fas/Fas ligand system in female reproductive organs: survival and apoptosis.
Biochem Pharmacol 64: 1305-1315
 120. Müller-Berghaus G, Pötzsch B (1999)
Hämostaseologie.
Springer Verlag
 121. Nagata K, Tsuji T, Todoroki N, Katagiri Y, Tanoue K, Yamazaki H, Hanai N, Irimura T (1993)
Activated platelets induce superoxid anion release by monocytes and neutrophils through p-selectin (CD62).
J Immunol 151: 3267-3273
 122. Nakazawa F, Matsuno H, Yudoh K, Katayama R, Sawai T, Uzuki M, Kimura T (2001)
Methotrexate inhibits rheumatoid synovitis by inducing apoptosis.
J Rheumatol 28: 1800-1808
 123. Naruse I, Keino H (1995)
Apoptosis in the developing CNS.
Prog Neurobiol 47: 135-155
 124. Nathan C (2002)
Points of control in inflammation.
Nature 420: 846-852

-
125. Neumann F-J, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meinel C, May A, Schömig A (1997)
Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets.
Circulation 95: 2387-2394
126. Neumann F-J, Zohlnhofer D, Fakhoury L, Ott I, Gawaz M, Schomig A (1999)
Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet-leukocyte interaction and surface expression of the leukocyte integrin Mac-1 in acute myocardial infarction.
J Am Coll Cardiol 34: 1420-1426
127. Nickoloff BJ, Qin JZ, Chaturvedi V, Bacon P, Panella J, Denning MF (2002)
Life and death signaling pathways contributing to skin cancer.
J Investig Dermatol Symp Proc 7: 27-35
128. Nicola N.A., Metcalf D. (1986)
Specificity of action of colony-stimulating factors in the differentiation of granulocytes and macrophages.
Ciba Found Symp 118: 7-28
129. Nicola N.A., Petersen L (1986)
Identification of distinct receptors for two hemopoietic growth factors (granulocyte colony-stimulating factor and multipotential colony-stimulating factor) by chemical cross-linking.
J Biol Chem 261: 12384-12389
130. Ohsako S, Elkon KB (1999)
Apoptosis in the effector phase of autoimmune diabetes, multiple sclerosis and thyroiditis.
Cell Death Differ 6: 13-21

-
131. Osés-Prieto JA, LÓpez-Mortalla N, Santiago E, Jaffr  zou JP, López-Zabalza MJ (2000)
Molecular mechanisms of apoptosis induced by an immunomodulating peptide on human monocytes.
Archiv Biochem Biophys 379: 353-362
132. Packham MA (1999)
Most apyrase preparations are impure and contain inhibitors of cathepsin G: suggestions for use of apyrase in preparation and stabilization of platelet suspensions.
Thromb and Haemost 81: 849-850
133. Parish CR (1999)
Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies.
Immunol Cell Biol 77: 499-508
134. Patarroyo M (1994)
Adhesion Molecules Mediating Recruitment of Monocytes to Inflamed Tissue.
Immunobiology 191: 474-477
135. Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH (1996)
The role of proteases during apoptosis.
FASEB J 10: 587-597
136. Perlman H, Pagliari LJ, Georganas C, Mano T, walsh K, Pope RM (1999)
FLICE-inhibitory protein expression during macrophage differentiation confers resistance to Fas-mediated apoptosis.
J Exp Med 190: 1679-1688
137. Perlman H, Pagliari LJ, Liu H, Koch AE, Haines GK, Pope RM (2001)
Rheumatoid arthritis synovial macrophages express the Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-inhibitory protein and are refractory to Fas-mediated apoptosis.
Arthritis Rheum 44: 21-30

-
138. Perlman H, Pagliari LJ, Nguyen N, Bradley K, Liu H, Pope RM (2001)
The Fas-FasL death receptor and PI3K pathways independently regulate monocytes homeostasis.
Eur J Immunol 31: 2421-2430
139. Peter K, Schwarz M, Conradt C, Nordt T, Moser M, Kübler W, Bode C (1999)
Heparin inhibits ligand binding to the leuckocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18).
Circulation 100: 1533-1539
140. Placido R, Mancino G, Amendola A, Mariani F, Vendetti S, Piacentini M, Sanduzzi A, Bocchino ML, Zembala M, Colozzi V (1997)
Apoptosis of human monocytes/macrophages in Mycobacterium tuberculosis infection.
J Pathol 181: 31-38
141. Platz EA (2002)
Energy imbalance and prostate cancer.
J Nutr 132: 3471S-3481S
142. Poe JC, Wagner DH, Miller RW, Stout RD, Suttles J (1997)
IL-4 and IL-10 modulation of CD40-mediated signaling of monocyte IL-1 β synthesis and rescue from apoptosis.
J Immunol 159: 846-852
143. Poussin C, Foti M, Carpentier J-L, Pugin J (1998)
CD14-dependent endotoxin internalization via a macropinocytic pathway.
J Biol Chem 273: 20285-20291
144. Pradier O, Willems F, Abramowicz D, Schandene L, de Boer M, Thielemans K, Capel P, Goldman M (1996)
CD40 engagement induces monocyte procoagulant activity through an interleukin-10 resistant pathway.
Eur J Immunol 26: 3048-3054

-
145. Raffael A (1988)
Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie.
Labor-Medizin 11: 89-97
 146. Raffael A, Nebe C Th, Valet G (1994)
Grundlagen der Durchflußzytometrie.
Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik: 3-49
Schattauer Verlag
 147. Rathmell JC, Thompson CB (2002)
Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease.
Cell 109 Suppl: S97-107
 148. Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR (1991)
Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils.
Blood 78: 1760-1769
 149. Rinder HM, Tracey JL, Rinder CS, Leitenberg D, Smith BR (1994)
Neutrophil but not monocyte activation inhibits P-Selectin-mediated
platelet adhesion.
Thromb Haemost 71: 750-756
 150. Roitt IM (1993)
Leitfaden der Immunologie.
Blackwell-Wissenschaft-Verlag
 151. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kämpgen E, Eibl B, Niederwieser D,
Schuler G (1996)
Generation of mature dendritic cells from human blood
An improved method with special regard to clinical applicability.
J Immunol Methods 196: 137-151
 152. Ross R (1999)
Atherosclerosis - an inflammatory disease.
N Engl J Med 340: 115

-
153. Ruggiero V, Tavernier J, Fiers W, Baglioni C (1986)
Induction of the synthesis of tumor necrosis factor receptors by interferon-gamma.
J Immunol 136: 2445-2450

 154. Salvayre R, Auge N, Benoist H, Negre-Salvayre A (2002)
Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis.
Biochim Biophys Acta 1585: 213-221

 155. Savill J (1997)
Apoptosis in resolution of inflammation.
J Leukoc Biol 61: 375-380

 156. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C (2002)
A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses.
Nat Rev Immunol 2: 965-975

 157. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C (1993)
Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis.
Immunol Today 14: 131-136

 158. Schattner EJ (1903)
Apoptosis in lymphocytic leukemias and lymphomas.
Cancer Invest 20: 737-748

 159. Scherberich JE, Nockher WA (2000)
Blood monocyte phenotypes and soluble endotoxin receptor CD14 in systemic inflammatory diseases and patients with chronic renal failure.
Nephrol Dial Transplant 15: 574-578

 160. Scheuerer B, Ernst M, Dürrbaum-Landmann I, Fleischer J, Grage-Griebenow E, Brandt E, Flad H-D, Petersen F (2000)
The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocytes survival and induces monocytic differentiation into macrophages.
Blood 95: 1158-1166

-
161. Schlegel RA, Callahan MK, Williamson P (2000)
The central role of phosphatidylserine in the phagocytosis of apoptotic thymocytes.
Ann N Y Acad Sci 926: 217-225
 162. Schmidt M, Pauels H-G, Lügering N, Lügering A, Domschke W, Kucharzik T (1999)
Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: Potential role of IL-1 β .
J Immunol 163: 3484-3490
 163. Schmitz G, Herr AS, Rothe G (1998)
T-Lymphozyten und Monozyten in der Pathogenese der Arteriosklerose.
Herz 23: 168-177
 164. Schmitz G, Orsó E, Rothe G, Klucken J (1997)
Scavenging, signaling and adhesion coupling in macrophages : implication for atherogenesis.
Atherosclerosis: Cell Biology and Lipoproteins 8: 287-300
 165. Scott B, Kaye J, Lo D (1994)
T cells and suppression in vitro.
Science 266: 464-465
 166. Shcherbina A, Remold-O'Donnell (1999)
Role of caspase in a subset of human platelet activation responses.
Blood 93: 4222-4231
 167. Shoshan Y, Shapira I, Toubi E, Frolkis I, Yaron M, Mevorach D (2002)
Accelerated Fas-mediated apoptosis of monocytes and maturing macrophages from patients with systemic lupus erythematosus: relevance impairment of interaction with iC3b-opsonized apoptotic cells.
J Immunol 167: 5963-5969

-
168. Silverstein RL, Asch AS, Nachman RL (1989)
Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion.
J Clin Inv 84: 546-552
169. Slezak SE, Horan PK (1989)
Cell-mediated cytotoxicity (A highly sensitive and informative flow cytometric assay).
J Immunol Methods 117: 205-214
170. Sower LE, Froelich CJ, Allegretto N, Rose PM, Hanna WD, Klimpel GR (1996)
Extracellular activities of human granzyme A.
J Immunol 156: 2585-2590
171. Spangenberg P (1994)
Adhesion of activated platelets to polymorphonuclear leucocytes.
Thromb Res 74: S35-S44
172. Spangenberg P, Redlich H, Bergmann I, Lösche W, Götzrath M, Kehrel B (1993)
The platelet glycoprotein II b/ III a complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes.
Thromb Haemost 70(3): 514-521
173. Spangenberg P, Schymik Ch, Hofmann B, Ostermann G, Rühling K, Till U (1989)
Blood platelet behaviour in patients with a type 1 Diabetes Mellitus.
Exp Clin Endocrinol 94: 329-337
174. Stern M, Savill J, Haslett C (1996)
Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis. Mediation by alpha v beta3/CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response.
Am J Pathol 149: 911-921

-
175. Stites DP, Terr AI, Parslow TG (1994)
Basic & Clinical Immunology.
Appleton & Lange International Edition: 17-19
176. Sumimoto S, Ishigami T, Horiguchi Y, Yonehara S, Kanazashi S, Heike T, Katamura K, Mayumi M (1994)
Anti-Fas antibody induces different types of cell death in the hostiocyctic cell line , U937, and thr human b cell line, B104: that single-stran DNA breaks and poly (ADP-ribosyl)action in cell.
Cell Immunol 153: 184-193
177. Tait JF, Smith C (1999)
Phosphatidylserine receptors : Role of CD36 in binding of anionic phospholipid vesicles to monocytic cells.
J Biol Chem 274: 3048-3054
178. Te Velde AA, Huijbens RJF, Heije K, de Vries JE, Figdor CG (1990)
Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 β , tumor necrosis factor α , and IL-6 by human monocytes.
Blood 76: 1392-1397
179. Teare GF, Horan PK, Slezak SE, Smith C, Hay JB (1991)
Long-term tracking of lymphocytes *in vivo* : The migration of PKH-labeled lymphocytes.
Cellular Immunol 134: 157-170
180. Thome M, Tschopp J (2001)
Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP.
Nat Rev Immunol 1: 50-58
181. Thornberry NA, Lazebnik Y (1998)
Caspases: enemies within.
Science 281: 1312-1316

-
182. Tschoepe D, Schwippert B (1997)
Platelet flow cytometry - adhesive proteins.
Platelets and their factors - handbook of experimental pharmacology: 619-643
Springer Verlag
183. Ulutin NO (1976)
The platelets, fundamentals and clinical applications.
Kagit Ve Basim Isleri A S Istanbul:
184. Um HD, Orenstein JM, Wahl SM (1996)
Fas mediates apoptosis in human monocytes by a reactive oxygen intermediate
dependent pathway.
J Immunol 156: 3469-3477
185. Vaishnaw AK, Toubi E, Ohsako S, Drappa J, Buys S, Estrada J, Sitarz A,
Zemel L, Chu JL, Elkon KB (1999)
The spectrum of apoptotic defects and clinical manifestations, including
systemic lupus erythematosus, in humans with CD95 (Fas/APO-1) mutations.
Arthritis Rheum 42: 1833-1842
186. van der Vliet HJJ, Wever PC, van Diepen FNJ, Yong SL, Ten Berge IJM (1997)
Quantification of Bax/Bcl-2 ratios in peripheral blood lymphocytes, monocytes
and granulocytes and their relation to susceptibility to anti-Fas (anti-CD95)-
induced apoptosis.
Clin Exp Immunol 110: 324-328
187. Van Furth R (1998)
Human monocytes and cytokines.
Res Immunol 149: 719-720
188. Vangas DM, Orrenius S, Aguilar-Santelises M (1997)
Alteration in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-
induced process that resembles apoptosi.
Br J Haematol 99: 824-831

-
189. Varela N, Munoz-Pinedo C, Ruiz-Ruiz C, Robledo G, Pedroso M, Rivas A (2001)
Interferon-gamma sensitizes human myeloid leukemia cells to receptor-mediated apoptosis by a pleiotropic mechanism.
J Biol Chem 276: 17779-17787
190. Wagner DH, Stout RD, Suttles J (1994)
Role of the CD40-CD40 ligand interaction in CD4+ T cell contact-dependent activation of monocyte interleukin-1 synthesis.
Eur J Immunol 24: 3148-3154
191. Wallace PK, Palmer LD, Perry-Lalley D, Bolton ES, Alexander RB, Horan PK, Yang JC, Muirhead KA (1993)
Mechanisms of adoptive immunotherapy : Improved methods for *in vivo* tracking of tumor-infiltrating lymphocytes and lymphokine-activated killer cells.
Cancer Res 55: 2358-2367
192. Wan CPPCS, Lau BHS (1993)
A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay.
J Immunol Methods 162: 1-7
193. Wolf BB, Goldstein JC, Stennicke HR, Beere H, Amarante-Mendes GP, Salvesen GS, Green DR (1999)
Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation.
Blood 94: 1683-1692
194. Wolf BB, Green DR (1999)
Suicidal tendencies: Apoptotic cell death by caspase family proteinases.
J Biol Chem 274: 20049-20052
195. Wyllie AH (1987)
Apoptosis: cell death in tissue regulation.
J Pathol 153: 313-316

-
196. Yamaguchi A, Yamamoto N, Akamatsu N, Saido TC, Kaneda M, Umeda M, Tanoue K (2000)
PS-Liposome and Ox-LDL bind to different sites of the immunodominant domain (#155-183)of CD36: A study with GS95, a new anti-CD36 monoclonal antibody.
Thromb Res 97: 317-326
197. Yoo EK, Rook AH, Elenitas R, Gasparro FP, Vowels BR (1996)
Apoptosis induction by ultraviolet light and photochemotherapy in cutaneous T-cell lymphoma: relevance to mechanism of therapeutic action.
J Inv Dermatol 107: 235-242
198. Zhang J, Bardos T, Mikecz K, Finnegan A, Glant TT (2001)
Impaired Fas signaling pathway is involved in defective T cell apoptosis in autoimmune murine arthritis.
J Immunol 166: 4981-4986

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Dohle
Vorname: Frank
Geburtsdatum: 25.12.1974
Geburtsort: Wickede (Ruhr)
Anschrift: Auf'm Hackenfeld 23
59457 Werl-Westönnen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: römisch-katholisch
Eltern: Mechtild Dohle, geb. Düsener * 16.08.1949
Ferdinand Dohle * 06.11.1946
Schwester: Tanja Dohle * 26.02.1977

Schulbildung:

08/1981 – 07/1985 St. Josef-Grundschule in Werl-Westönnen
08/1985 – 06/1994 Mariengymnasium in Werl
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

07/1994 – 09/1995 Mariannenhospital in Werl

Hochschulbildung:

10/1995 Beginn des Studiums der Humanmedizin
an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
09/1997 Ärztliche Vorprüfung
09/1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2002 Vorläufige Approbation als Arzt im Praktikum
03/2004 Approbation als Arzt

Beruf:

09/2002 – 02/2004 Arzt im Praktikum in der Kinderklinik
des St. Vincenz-Krankenhauses in Paderborn
seit 03/2004 Assistenzarzt in der Kinderklinik
des St. Vincenz-Krankenhauses in Paderborn

Werl-Westönnen, den 01.03.2004

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Stefan Heidenreich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe im Immunologischen Labor der Medizinischen Poliklinik der Medizinischen Fakultät der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster und für die Überlassung des Themas zu dieser Dissertation. Seine Ideen und fachlichen Anregungen, seine langjährige Erfahrung in der Forschung, seine freundliche Unterstützung bei der Planung, Organisation und Durchführung der einzelnen Versuche und seine menschlichen Ratschläge bilden die Basis dieser Arbeit.

Besonders danken möchte ich meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Detlef Lang, ohne dessen hervorragenden, persönlichen Einsatz diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre. Ich danke herzlichst für die methodischen Anleitungen, die Hilfe bei den vielen versuchstechnischen Fragen und die fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen und vor allem für die zahlreichen freundschaftlichen Gespräche und sein menschliches Engagement.

Ein Dank gebührt insbesondere Herrn PD Dr. rer. nat. Hans-Gerd Pauls, der mir jederzeit beratend zur Seite stand und zahlreiche Ratschläge und Ideen eingebracht hat und ohne dessen Unterstützung der Großteil der Versuchsauswertungen nicht durchführbar gewesen wäre. Für die Bereitstellung des Durchflußzytometers und des Immunfluoreszenzmikroskopes des Institutes der Immunologie der Medizinischen Fakultät der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster und besonders für seine Hilfe und Geduld bei der Durchführung der FACS-Analysen und der immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und der großen Hilfsbereitschaft bei der Lösung von praktischen Problemen sowie für die gemeinsame Entwicklung und Einbringung neuer Versuchsmethoden im Rahmen dieser Arbeit bin ich ihm zu außerordentlichem Dank verpflichtet.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts der Immunologie der Medizinischen Fakultät der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster für die vielen Anregungen und die konstruktive Zusammenarbeit.

Herrn PD Dr. med. Christian August und seinen Mitarbeiter aus dem Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster danke ich für die Durchführung der Transmissions-elektronenmikroskopie.

Für die bereitwillige Verfügungstellung von „Buffy-Coats“ danke ich dem Herrn Prof. Dr. Dr. W. Sibrowski aus dem Institut für Transfusionsmedizin der Medizinischen Fakultät der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster.

Ich bedanke mich herzlichst bei den freiwilligen Spendern für ihre Bereitschaft zur Blutspende für die Thrombozytenpräparation in Hinblick auf die Versuche.

Den Laborassistentinnen und Mitdoktoranden aus dem Immunologischen Labor der Medizinischen Poliklinik der Medizinischen Fakultät der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster sei ein gemeinsames Dankeschön für das außerordentlich freundliche und gesellige Arbeitsklima sowie für die stets bereitwillige Hilfe bei fachbezogenen Problemen und labororganisatorischen Fragen und für die tolle und beispielhafte Zusammenarbeit ausgesprochen.

Insbesondere möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Hilmi Saleh und Herrn Dr. med. Andreas Hubrich für die vielen labortechnischen Anleitungen und Methodeneinführungen zu Beginn des experimentellen Teils der Arbeit danken.

Ausdrücklich bin ich meinen Mitdoktoranden, Kommilitonen und Freunden Herrn Dr. med. Martin Terstesse und Herrn Dr. med. Philip Bangen zu großem Dank verpflichtet, da sie mich in einer mitfühlenden und kameradschaftlichen Art und Weise jederzeit unterstützt haben und damit wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei-

getragen haben. Ein recht herzlicher Dank gebührt vor allem Herrn Dr. med. Martin Terstesse für die zahlreichen Einführungen in die Versuchsmethoden, labororganisatorischen Abläufe und computertechnischen Auswertungen. Die gegenseitigen Hilfen, die Freude am gemeinsamen wissenschaftlichen Arbeiten und die einzigartige, freundschaftliche Atmosphäre bilden die Basis dieser Dissertation. Es wird eine unvergessene Zeit für mich bleiben.

Des weiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Christiane Specht und Herrn Dr. rer. nat. Christoph Specht, sowie bei Herrn Dr. med. Martin Terstesse für die Hilfestellungen bei Layoutfragen und die freundschaftliche und ausführliche Korrektur des Manuskriptes.

All meinen Freunden und Verwandten, insbesondere Andrea Durow und Guido Rocholl und der Familie Düsener, danke ich herzlichst für die Anteilnahme und Unterstützung entlang der gesamten Zeit.

Ein besonderer Dank gilt vor allem meinem Kommilitonen und Freund Daniel Bödeker für die vielen, mit großer Erduld ertragenen, sorgenvollen Gespräche bezüglich dieser Dissertation, für sein freundschaftliches Verständnis und die aufmunternden Ratschläge und Unternehmungen, für die theoretischen und praktischen Einführungen und Hinweise in Bezug auf Thrombozyten und nicht zuletzt für die Hilfestellungen und die Verfügungstellung von Schriftmaterial und Literatur zum Schreiben dieser Arbeit. Danke für die schöne Münsteraner Zeit.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich aus tiefstem Herzen für die vielen Sorgen, die aufmunternden Worte und die große familiäre Liebe, die sie mir während der gesamten Promotionszeit entgegengebracht haben. Ohne Eure allumfassende Unterstützung auf dem langen Weg wäre diese Arbeit nie zustande gekommen und beendet worden. Deshalb widme ich Euch diese Arbeit und werde Euch auf immer dankbar sein.