

Der interzelluläre Transport Lipid-geladener Lysosomen aus
Makrophagen in glatte Gefäßmuskelzellen
führt zur phänotypischen Veränderung der Gefäßmuskelzellen in einen
schaumzellartigen Phänotyp

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Biochemiker Sönke Weinert
geboren am 03. Juni 1978 in Hamburg

Eingereicht am: 27.11.2013

Die Dissertation wurde in der Zeit von April 2004 bis Mai 2013 im Labor für experimentelle und molekulare Kardiologie an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden sowie dem Labor der Experimentelle Kardiologie an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg angefertigt.

Eingereicht am: 27.11.2013

Tag der Verteidigung: 27.06.2014

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz van Pée
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ruth H. Strasser

Mitglieder der Promotionskommission:

Prof. Dr. T. Straßner (Vorsitzender),
Prof. Dr. K.-H. van Pée,
Prof. Dr. H. Morawietz,
Prof. Dr. R. H. Strasser,
Prof. Dr. T Simat

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	3
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	9
4	EINLEITUNG	10
4.1	DIE ATHEROSKLEROSE	10
4.2	DIE ATHEROSKLEROTISCHE PLAQUE	10
4.3	DIE ROLLE VON PROGENITORZELLEN IN DER ATHEROSKLEROSE	16
4.4	DIE ROLLE VON GEFÄßMUSKELZELLEN BEI DER SCHAUMZELLENTSTEHUNG	19
4.5	ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	21
5	MATERIAL UND METHODEN	22
5.1	GERÄTE	22
5.2	CHEMIKALIEN	23
5.3	VERWENDETE KULTURMEDIEN	24
5.4	VERWENDETE <i>KIT</i> -SYSTEME	25
5.5	VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE	26
5.6	VERWENDETE UND HERGESTELLTE PLASMIDE	27
5.6.1	PMKATE2-LYSO	27
5.6.2	PSHUTTLE	27
5.6.3	PADENO-X	28
5.6.4	PSHUTTLE/ NHEI-KPNI LYSOKATE2	28
5.6.5	PADENOX/LAMP-1-MKATE2	29
5.7	VERWENDETE ZELLINIEN UND <i>ESCHERICHIA COLI</i> STÄMME	29
5.7.1	EUKARYONTISCHE ZELLINIEN	29
5.7.2	PROKARYONTISCHE ZELLINIEN	29
5.8	ZELLKULTUR	30
5.8.1	KULTUR VON HEK293 ZELLEN	30
5.8.2	ISOLATION HUMANER MONOZYTEN DURCH DOPPELTE DICTEGRADIENTENZENTRIFUGATION	30
5.8.3	ISOLATION HOCHREINER MONOZYTEN AUS NABELSCHNURBLUT	33
5.8.4	ISOLATION GLATTER GEFÄßMUSKELZELLEN AUS NAGER AORTEN	33
5.8.5	PARALLELE ISOLATION GLATTER GEFÄßMUSKELZELLEN UND ENDOTHELZELLEN AUS HUMANEN EXPLANTATEN	34

5.8.6	KULTUR DER ENDOTHELZELLEN	36
5.8.7	KULTUR GLATTER GEFÄßMUSKELZELLEN	36
5.8.8	EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN FÜR DIE ZELLKULTUR	37
5.9	CHARAKTERISIERUNG PRIMÄRER ISOLIERTER ZELLEN	38
5.9.1	IMMUNOZYTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN ZUR CHARAKTERISIERUNG GLATTER GEFÄßMUSKELZELLEN	38
5.9.2	CHARAKTERISIERUNG PRIMÄRER ENDOTHELZELLEN	39
5.9.3	CHARAKTERISIERUNG DER PRIMÄREN MONOZYTEN	39
5.10	TEST AUF MYCOPLASMEN	40
5.11	EXPERIMENTE ZUR TRANSDIFFERENZIERUNG VON MONOZYTEN/MAKROPHAGEN IN GLATTE GEFÄßMUSKELZELLEN	40
5.11.1	TRANSDIFFERENZIERUNG VON MONOZYTEN/MAKROPHAGEN IN GLATTE GEFÄßMUSKELZELLEN DURCH LÖSLICHE FAKTOREN	40
5.12	KOKULTUREN ZWISCHEN GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN UND MONOZYTEN/MAKROPHAGEN	42
5.12.1	KOKULTUR AUS MONOZYTEN/MAKROPHAGEN UND GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN IN 12-LOCH ZELLKULTURPLATTEN	42
5.12.2	RÄUMLICH GETRENNTE KOKULTUREN AUS MONOZYTEN/MAKROPHAGEN UND GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN	43
5.12.3	KOKULTUREN IN 6-LOCH ZELLKULTURPLATTEN ZUR RNA-ANALYTIK	44
5.12.4	KOKULTUREN IN GLASBODENSCHÄLCHEN	44
5.12.5	RE-ISOLATION KOKULTIVierter GLATTER GEFÄßMUSKELZELLEN	44
5.13	FLUORESZENZMARKIERUNG LEBENDER ZELLEN	45
5.13.1	MARKIERUNGEN DER MONOZYTEN/MAKROPHAGEN	46
5.13.2	FÄRBUNGEN VON GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN	49
5.14	FÄRBUNGEN AN KOKULTUREN	53
5.14.1	DARSTELLUNG DER LIPIDTRÖPFCHEN MITTELS OIL-RED-O-FÄRBUNG	53
5.14.2	FLUORESZENZBASIERTER NACHWEIS DER LIPIDTRÖPFCHENBILDUNG	53
5.15	MESSUNG DER PHAGOZYTOSEAKTIVITÄT GLATTER GEFÄßMUSKELZELLEN	54
5.16	MIKROSKOPIE, BILDVERARBEITUNG UND DARSTELLUNG	54
5.16.1	MIKROSKOPIE	54
5.16.2	BILDVERARBEITUNG UND DARSTELLUNG	60
5.17	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	62
5.17.1	RNA-ISOLATION	62
5.17.2	CDNA-SYNTHESE	62
5.17.3	REAL-TIME PCR	63
5.18	GENTECHNISCHE METHODEN	66
5.18.1	EXTRAKTION UND FÄLLUNG VON DNA	66
5.18.2	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	66
5.18.3	AUFREINIGUNG VON DNA-FRAGMENTEN UND PLASMIDEN AUS AGAROSE-GELEN	66

5.18.4	RESTRIKTIONSENDONUKLEASE-REAKTIONEN	67
5.18.5	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN MITTELS T4-DNA-LIGASE	67
5.18.6	KULTIVIERUNG VON <i>ESCHERICHIA COLI</i>	67
5.18.7	HERSTELLUNG KOMPETENTER <i>ESCHERICHIA COLI</i> ZELLEN	67
5.18.8	TRANSFORMATION VON <i>ESCHERICHIA COLI</i>	68
5.18.9	ISOLATION DER PLASMID-DNA AUS <i>ESCHERICHIA COLI</i> ZELLEN	68
5.18.10	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	69
5.18.11	ADENOVIRALE VEKTORKONSTRUKTION	69
5.19	STATISTISCHE AUSWERTUNG UND DARSTELLUNG DER DATEN	71
6	ERGEBNISSE	73
6.1	AUSSCHLUSS DER TRANSDIFFERENZIERUNG VON MONOZYTEN/MAKROPHAGEN IN GLATTE GEFÄßMUSKELZELLEN DURCH LÖSLICHE FAKTOREN	73
6.2	ERGEBNISSE DER KOKULTIVIERUNG VON GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN MIT MONOZYTEN/MAKROPHAGEN	73
6.2.1	ZELL-ZELL-KONTAKT ABHÄNGIGKEIT DES FL-ACLDL TRANSPORTS	75
6.2.2	NACHWEIS DER EXPRESSION HUMANER GLATTMUSKULÄRER MARKER MITTELS <i>REAL-TIME</i> PCR	75
6.2.3	ERSTE MIKROSKOPISCHE HINWEISE AUF DEN TRANSPORT DES FL-ACLDL VON MAKROPHAGEN IN DIE GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN	76
6.2.4	<i>TIME-LAPSE</i> MIKROSKOPIE DES TRANSPORTS VON FLUORESCENZMARKIERTEM ACLDL	78
6.3	INTRAZELLULÄRE LOKALISATION DES ACLDL INNERHALB DER GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLE	79
6.4	NACHWEIS DES TRANSPORTS VON CHOLESTEROL/ACLDL-KOMPLEXEN IN GLATTE GEFÄßMUSKELZELLEN	81
6.5	PHÄNOTYPISCHE VERÄNDERUNGEN DER GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN NACH DEM INTERZELLULÄREN TRANSPORT DES FL-ACLDL	83
6.5.1	AKTIVIERUNG DER PHAGOZYTOSE IN GLATTEN GMZ ALS FOLGE DES INTERZELLULÄREN FL-ACLDL TRANSPORTS	84
6.5.2	LIPIDAKKUMULATION INNERHALB FL-ACLDL POSITIVER GLATTER GEFÄßMUSKELZELLEN	85
6.5.3	TRANSKRIPTIONELLE VERÄNDERUNGEN DER GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN DURCH DEN TRANSPORT VON FL-ACLDL IN DIE GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN	86
6.6	TRANSPORT VON MEMBRANBESTANDTEILEN DER MAKROPHAGEN IN GLATTE GEFÄßMUSKELZELLEN	88
6.7	SUBZELLULÄRE LOKALISATION DES FL-ACLDL INNERHALB DER GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN	90
6.8	TRANSPORT INTAKTER LYSOSOMEN VON DEN MAKROPHAGEN IN DIE GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN	92

7 DISKUSSION	95
7.1 TRANSDIFFERENZIERUNG VON MONOZYTEN/MAKROPHAGEN IN GLATTE GEFÄßMUSKELZELLEN	95
7.2 AUSSCHLUSS EINER TRANSDIFFERENZIERUNG <i>IN-VITRO</i>	98
7.3 SCHAUMZELLBILDUNG AUS GEFÄßMUSKELZELLEN	98
7.4 DER INTERZELLULÄRE ORGANELL-AUSTAUSCH	103
7.5 LIMITATIONEN DER STUDIE	107
7.6 DIE KLINISCHE PERSPEKTIVE	108
8 ZUSAMMENFASSUNG	111
9 LITERATURVERZEICHNIS	114
10 PUBLIKATIONEN	128
11 DANKSAGUNGEN	129
12 VERSICHERUNG	130

2 Abkürzungsverzeichnis

acLDL	acetyliertes LDL
ApoE	Apolipoprotein E
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
cDNA	<i>copy deoxyribonucleic acid</i>
CFSE	<i>5-(and-6)-Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester</i>
CMAC	7-Amino-4-Chloromethylcoumarin
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein Diacetate
D+10F+	Zellkulturmedium für HEK293
D10F+	Zellkulturmedium für glatte GMZ
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	differentieller Interferenzkontrast engl. <i>differential interference contrast</i>
DiD	1,1'-Diocadecyl-3,3',3'-Tetramethylindodicarbocyanine Perchlorate
Dil	1,1'-Diocadecyl-3,3',3'-Tetramethylindodicarbocyanine Perchlorate
DiO	3,3'-Diocadecyloxacarbocyanine Perchlorate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGM	<i>endothelial cell growth medium MV</i> , Zellkulturmedium für Endothelzellen
eLDL	enzymatisch modifiziertes LDL
EPC	endotheliale Progenitorzellen
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
FISH	<i>fluorescence in-situ hybridization</i>
FL-acLDL	fluoreszenzmarkiertes acetyliertes LDL
FL-Cholesterol	fluoreszenzmarkiertes Cholesterol
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GMZ	Gefäßmuskelzellen
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie
HMG-CoA	HMG-CoA-Reduktase
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor-1</i>
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-6	Interleukin-6
LASER	<i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LB-Medium	Lysogeny broth-Medium für die Bakterienkultur
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
M.O.I.	Multiplizität der Infektion, engl. <i>multiplicity of infection</i>
mAB	monoklonaler Antikörper
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MeOH	Methanol
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MP	Makrophagen

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure, engl. <i>messenger RNA</i>
oxLDL	oxidiertes <i>low density lipoprotein</i>
pAB	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF-BB	<i>platelet-derived growth factor B</i>
psCLSM	<i>point scanning confocal LASER scanning microscope</i>
PSF	<i>point spread function</i>
RFP	rot fluoreszierendes Protein
ROI	Bereich des Interesses, engl. <i>region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
SD	<i>standard deviation</i>
sdCLSM	<i>spinning disc confocal LASER scanning microscope</i>
SEM	standard error of the mean
SM22- α	smooth muscle 22- α
SOB-Medium	Super Optimal Broth-Medium
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF- β	<i>transforming growth factor-1</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
TNT	<i>tunneling nanotubes</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das frühe Stadium der Atherosklerose. ⁵	11
Abbildung 2: Die Ausbildung von <i>fatty streaks</i> . ⁵	13
Abbildung 3: Fortgeschrittene atherosklerotische Plaque. ⁵	15
Abbildung 4: Das mechanische Versagen der fibrösen Kappe kann bei instabilen Läsionen zur Plaqueruptur führen. ⁵	16
Abbildung 5: Schematisierte Verteilung und Maxima verschiedener Blutzellen in einem kontinuierlichen Dichtegradienten nach einer Dichtegradientenzentrifugation aus Munoz & Leff. ⁹⁵	31
Abbildung 6: Modifizierte Karte der Lokalisation verschiedener Rab GTPasen nach Seachrist et al. ¹¹⁰	51
Abbildung 7: Funktionsprinzip der Organelle Lights™ (Quelle: www.invitrogen.com).	51
Abbildung 8: Quantifizierung der FL-acLDL positiven glatten Gefäßmuskelzellen.	74
Abbildung 9: Relative Expression humaner glatter Gefäßmuskelzell-Marker innerhalb der Kokultur.	76
Abbildung 10: Hinweise auf einen Transport des FL-acLDL von den Makrophagen in die glatten Gefäßmuskelzellen.	77
Abbildung 11: Ausgewählte Einzelbilder aus einer <i>time-lapse</i> Serie.	79
Abbildung 12: Nachweis der Lokalisation des FL-acLDL in glatten Gefäßmuskelzellen in der Weitfeld-Fluoreszenz mit anschließender Dekonvolution.	80
Abbildung 13: Bestätigung der intrazellulären Lokalisation im konfokalen <i>LASER-scanning</i> Mikroskop.	81
Abbildung 14: Nachweis des Transports von Cholesterol aus Makrophagen in die glatten Gefäßmuskelzellen.	82
Abbildung 15: Nachweis des Transports von Cholesterol aus Makrophagen in die glatten Gefäßmuskelzellen zu späteren Zeitpunkten.	83
Abbildung 16: Quantifizierung der Phagozytoseaktivität re-isolierter glatter Gefäßmuskelzellen.	84
Abbildung 17: Oil-Red-O-Färbungen der Kokulturen zeigten, dass es zur Anreicherung von Lipiden in den FL-acLDL positiven glatten Gefäßmuskelzellen kommt.	85
Abbildung 18: Quantifizierung der Akkumulation neutraler Lipide in glatten Gefäßmuskelzellen.	86
Abbildung 19: Transkriptionelle Aktivierung Makrophagen-typischer Gene in den glatten Gefäßmuskelzellen nach erfolgtem FL-acLDL Transport.	87
Abbildung 20: Transport von Membranbestandteilen und FL-acLDL negativen Makrophagenbestandteilen in glatte Gefäßmuskelzellen.	89
Abbildung 21: Subzelluläre Lokalisation des fluoreszenzmarkierten acLDL innerhalb der glatten Gefäßmuskelzellen.	91
Abbildung 22: Darstellung von Lysosomen in Makrophagen mittels Expression einer LAMP-1-mKate2 Fusion.	92
Abbildung 23: Transport intakter FL-acLDL gefüllter Lysosomen aus Makrophagen in die glatten Gefäßmuskelzellen.	93
Abbildung 24: Mechanismus eines Vesikelaustausches zwischen zwei benachbarten Zellen ohne vorherige Freisetzung als Exosomen ins Kulturmedium. Zusammenfassende Grafik aus Piehl et al. ¹⁶⁶	104

4 Einleitung

4.1 Die Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine chronische Erkrankung der Blutgefäßwand, die auch heute noch für fast 50% aller Todesfälle in der westlichen Welt verantwortlich ist,^{1, 2} auch wenn durch die Weiterentwicklung medikamentöser Therapien für Risikopatienten wie auch die verbesserte Akutversorgung bei akutem Myokardinfarkt die Sterblichkeit deutlich gesenkt werden konnte.

Schon 1856 stellte Rudolf Virchow in seinen „Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin.; Phlogose und Thrombose im Gefäßsystem“, Meidinger Sohn & Co, Frankfurt-am-Main 1856:458-463 (zusammengefasst in ³) die Hypothese auf, dass es sich bei der Atherosklerose um eine Reaktion der Gefäßwand auf eine Verletzung handeln könnte.

Aufgrund der hohen Blutplasmakonzentration von Lipiden, im Speziellen des *low density lipoprotein* (LDL) Cholesterols, als dem wichtigsten Risikofaktor⁴, wurde die Atherosklerose in der Vergangenheit zunächst häufig als krankhafte Einlagerung von Lipiden in die Gefäßwand gesehen. Heute wissen wir, dass die Vorgänge innerhalb der Gefäßwand weitaus differenzierter sind. Aufgrund zahlloser Studien kann die atherosklerotische Läsion heute als eine Serie von hochspezifischen zellulären und molekularen Reaktionen beschrieben werden, die sich am besten als chronische Entzündung zusammenfassen lassen.⁵ Es herrscht weitgehende Einigkeit, dass es initial durch sogenannte Risikofaktoren zu einer Schädigung der das gesamte Gefäßlumen auskleidenden Endothelzellschicht kommt. Als Risikofaktoren werden sowohl erhöhte LDL-Konzentrationen, einschließlich LDL Modifikationen, freie Radikale, wie sie durch Zigarettenrauch entstehen können, Bluthochdruck, *Diabetes mellitus*, genetische Faktoren, aber auch Krankheitserreger wie Herpesviren und *Chlamydophila pneumoniae* genannt.⁵ Trotz jahrzehntelanger Forschung gibt es immer noch bedeutende Verständnislücken bei den der Atherosklerose zugrunde liegenden Mechanismen. Auch konnte eine Monokausalität zu keinem der Risikofaktoren bestätigt werden.⁵

4.2 Die atherosklerotische Plaque

An spezifischen Stellen des Gefäßsystems, wie Bögen, Abzweigungen und Verästelungen, wird das laminare Strömungsverhalten des Blutes verändert, was

sich in der Ausbildung von Turbulenzen und einer Veränderung der Scherbeanspruchung des Endothels äußert. Diese Stellen sind aus dem klinischen Alltag von interventionellen Kardiologen, experimentellen Studien sowie Modellierungen als Orte besonderer Anfälligkeit für die Ausbildung atherosklerotischer Plaques bekannt.^{6, 7}

An diesen Stellen ist durch den veränderten Blutfluss und den Einfluss der Risikofaktoren die Aktivierung der Endothelzellen besonders hoch. Dadurch kann die sog. Endothelfunktion, das Abschirmen des umliegenden Gewebes gegen den Blutfluss und seine Bestandteile, beeinträchtigt werden.⁸ Es kommt zum Eindringen von Lipiden, insbesondere dem LDL-Cholesterol, aus dem Blut in den subendothelialen Raum. Dort kommt es durch das vorliegende Milieu hauptsächlich zur oxidativen Veränderung des LDL und dadurch zur Bildung von oxidiertem LDL (oxLDL), aber auch Glykosylierung und enzymatische Modifikationen der LDL-Bestandteile sind bekannt.^{9, 10}

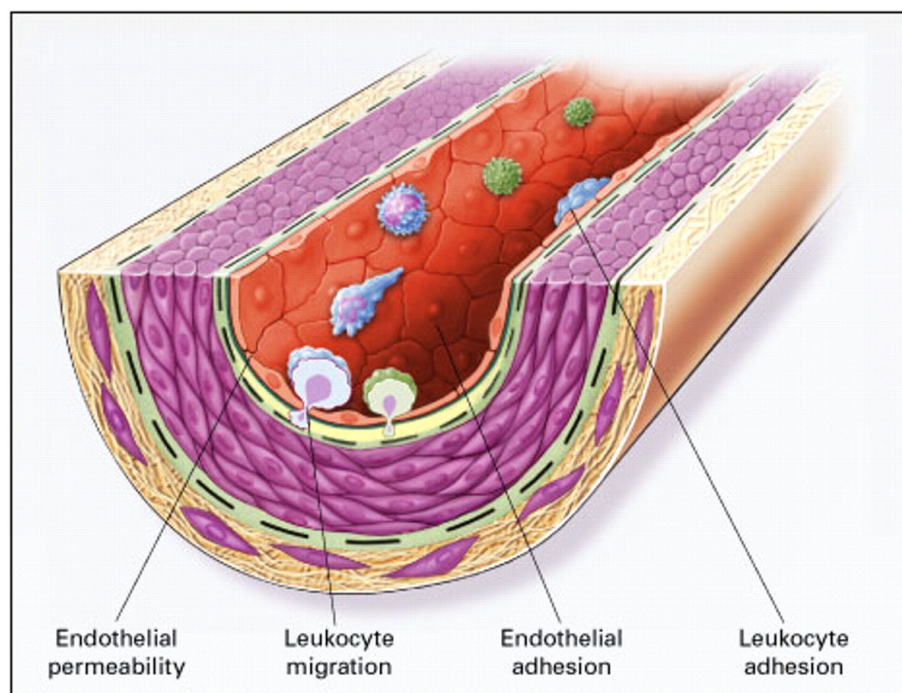


Abbildung 1: Das frühe Stadium der Atherosklerose.⁵

Nach dem Verlust der Endothelfunktion kommt es zur Aktivierung des Endothels und zur Adhäsion und Transmigration von Leukozyten.

Als Antwort auf die erhöhte Konzentration des oxLDL kommt es in den Endothelzellen zu einer erhöhten Aktivierung und vermehrten Expression der Gene, die für Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren, wie z.B. des *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1),¹¹ *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1),^{12, 13} des Thromboplastins (engl. *tissue factor*)¹⁴ und dem *platelet-derived growth factor B* (PDGF-BB)¹⁵, kodieren. Diese Genexpression und deren Folgen auf Endothelseite

sind heute als Faktoren für die Lokalisation erster atherosklerotischer Läsionen weitgehend akzeptiert.^{6, 16, 17} Die Expression der Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der Endothelzellen führt zu einem Abbremsen von Leukozyten, wie z.B. T-Zellen und Monozyten, aus dem Blutstrom. Dieser Prozess wird auf Grund mikroskopischer Befunde aus *in-vitro* und *in-vivo* Studien „Rollen“ oder engl. *rolling* genannt. Das Rollen der Leukozyten auf der Gefäßwand resultiert wiederum in der Expression weiterer Adhäsionsmoleküle, wie *P-* und *L-Selectin*, aber auch verschiedener *Integrine* auf der Endothel- als auch auf der Leukozytenseite.⁵ (siehe Abbildung 1)

Die verlangsamten T-Zellen und Monozyten, aber auch Blutbestandteile wie das LDL, können nun durch die erhöhte Permeabilität des Endothels in den subendothelialen Raum transmigrieren bzw. eindringen.⁸ Das eindringende LDL wird wiederum im subendothelialen Raum durch das vorliegende oxidative Milieu modifiziert und führt zu einer anhaltenden Aktivierung des Endothels und der Leukozyten. Die proinflammatorische Aktivierung des Endothels und erster in den subendothelialen Raum eingedrungener Leukozyten führt zu einer weiteren Expression bzw. Freisetzung diverser mitogener und proinflammatorischer Wachstumsfaktoren und Zytokine wie *basic fibroblast growth factor* (bFGF), PDGF-BB, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *interleukin-1 α* (IL-1 α), *interleukin-6* (IL-6), *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1), *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) und *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) durch Leukozyten, Thrombozyten, Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen (GMZ).^{1, 18} Durch den Einfluss der Wachstumsfaktoren, vor allem durch das M-CSF, und Zytokine kommt es zur terminalen Differenzierung der Monozyten in Makrophagen (MP).¹⁹ Die aktivierten MP beginnen das oxLDL durch *scavenger*-Rezeptor abhängige Phagozytose aus dem subendothelialen Raum zu entfernen.

Es kommt lokal zum Überschießen der angeborenen und spezifischen Immunreaktion und in dessen Folge zur weiteren Akkumulation von LDL und Leukozyten im subendothelialen Raum. Diese ersten Läsionen der Gefäßwand werden *fatty streaks* genannt und können schon bei Autopsieproben 10-14 jähriger Kindern gefunden werden.^{20, 21} Untersuchungen an Tiermodellen konnten zeigen, dass diese *fatty streaks* sich zu echten Plaque-Läsionen weiterentwickeln können.²²⁻
²⁷ Die initial hauptsächlich aus T-Lymphozyten und Lipid-geladenen Monozyten und MP, sog. Schaumzellen, bestehenden *fatty streaks* ändern bei weiterer Progression der Plaque zudem ihre zelluläre Zusammensetzung. Denn die aktivierten

Lymphozyten sezernieren proinflammatorische Wachstumsfaktoren, Zyto- und Chemokine und lösen hierüber eine Migration medialer GMZ in die intimale Läsion aus. (siehe Abbildung 2)

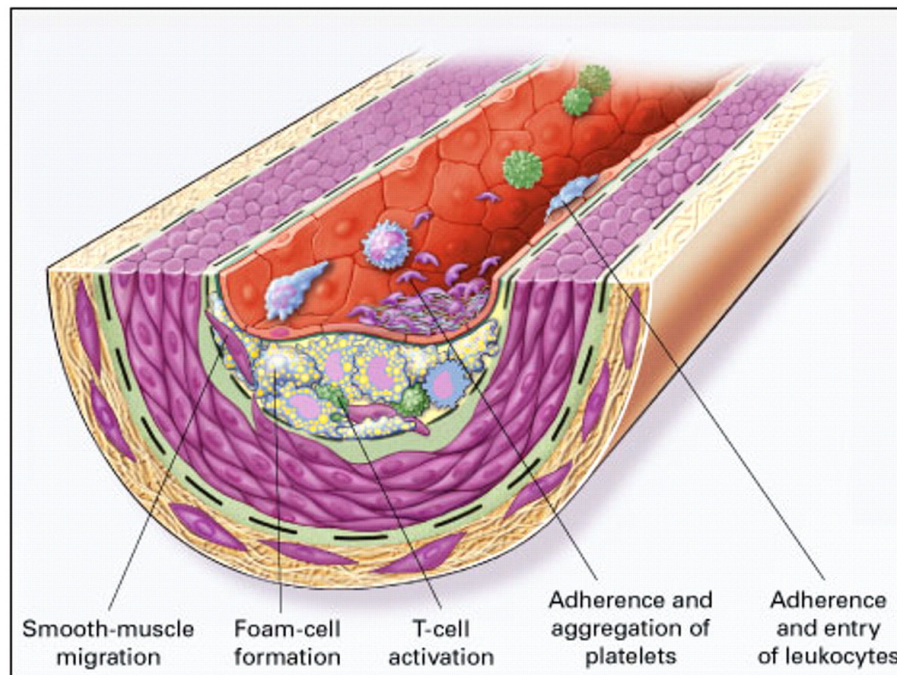


Abbildung 2: Die Ausbildung von *fatty streaks*.⁵

Im Verlauf der Plaqueprogression kommt es durch die Aufnahme von Lipiden in Makrophagen zur Bildung der Schaumzellen und weiteren Inflammation. Durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren kommt es zur Aktivierung lokaler glatter Gefäßmuskelzellen, deren Migration in den subendothelialen Raum und Proliferation. Die anhaltende Invasion von Leukozyten hält die Entzündung aufrecht und sorgt für das Wachstum der Plaque und zur Verringerung des Blutgefäßlumens.

Glatte GMZ wandern auf Grund des vorliegenden Zytokin- und Wachstumsfaktor-Gradienten aus der Intima in die beginnende Läsion ein.^{28, 29} Die Anwesenheit von PDGF-BB und VEGF stimuliert dabei hauptsächlich die Migration der GMZ in den subendothelialen Raum. Andere durch das Entzündungsgeschehen vorhandene Wachstumsfaktoren, wie *transforming growth factor-beta* (TGF- β), Angiotensin II, *epidermal growth factor* (EGF) und *Insulin-like growth factor-1* (IGF-1), triggern zusätzlich deren Proliferation.¹ Die eingewanderten glatten GMZ beginnen, aktiviert durch das proinflammatorische Milieu, zusätzliches PDFB-BB zu sezernieren und unterhalten die Entzündung selbst.¹ Durch die fortgesetzte Migration und Proliferation glatter GMZ nimmt die Dicke der Plaque zu und verringert so das innere Lumen des Gefäßes, was sich in ersten klinischen Symptomen äußern kann. Es kommt zur Ausbildung der sog. fibrösen Kappe, welche, bestehend aus einer mehrzelligen Schicht aus glatten GMZ, das Entzündungsgeschehen gegen das Endothel und damit den Blutfluss stabilisiert.³⁰ Während der Ausbildung der fibrösen

Kappe kommt es hierbei zu einer Veränderung des GMZ Phänotyps, welcher sich sowohl durch die Reorganisation der kontraktilen und zytoskelettalen Proteine³¹ als auch durch die veränderte Produktion von Matrixproteinen auszeichnet.³² Es gilt jedoch heute als Konsens, dass ein hoher Anteil an GMZ innerhalb der atherosklerotischen Läsion mit einer erhöhten Stabilität der Läsion korreliert und damit das Risiko einer Plaqueruptur bei hohem Gefäßmuskelzellanteil verringert ist.^{2, 5, 33, 34}

Trotz der Ausbildung der fibrösen Kappe kommt es weiterhin zur Transmigration entzündlicher Zellen in die Plaque. In diesem Stadium kann man eine deutliche Zunahme an sog. Schaumzellen feststellen.²³ (siehe Abbildung 3) Der größte Teil der Schaumzellen entsteht dabei durch die Phagozytose modifizierter LDL-Spezies durch MP, allerdings können auch Schaumzellen nachgewiesen werden, welche aus glatten GMZ entstanden sein müssen.^{23, 25, 35} Die Aufnahme und Überladung der modifizierten LDL Spezies in Zellen erfolgt hierbei über spezifische Rezeptoren oder die Phagozytose apoptotischer Zelltrümmer und kann nicht über den LDL-Rezeptor stattfinden.³⁶ Die Phagozytose der modifizierten LDL-Spezies in die Schaumzellen führt dabei zwar zur Reduzierung der lokalen Konzentration der aktivierenden LDL-Spezies, erfolgt jedoch auf zellulärer Ebene unreguliert, so dass es zur Nekrose der Schaumzellen kommt. Dies führt zur Ausbildung des sog. nekrotischen Kerns im Zentrum der Plaque.³⁶ Der nekrotische Kern weist dabei kaum vitale Zellen auf. Der Rand des nekrotischen Kerns ist durch MP und Schaumzellen gekennzeichnet. Diese phagozytieren die Zelltrümmer und Lipide, was wiederum zu deren Nekrose und somit zu einer Progression des nekrotischen Kerns führt. Außerdem kann man häufig in diesen Regionen freies kristallines Cholesterin beobachten.^{30, 37, 38}

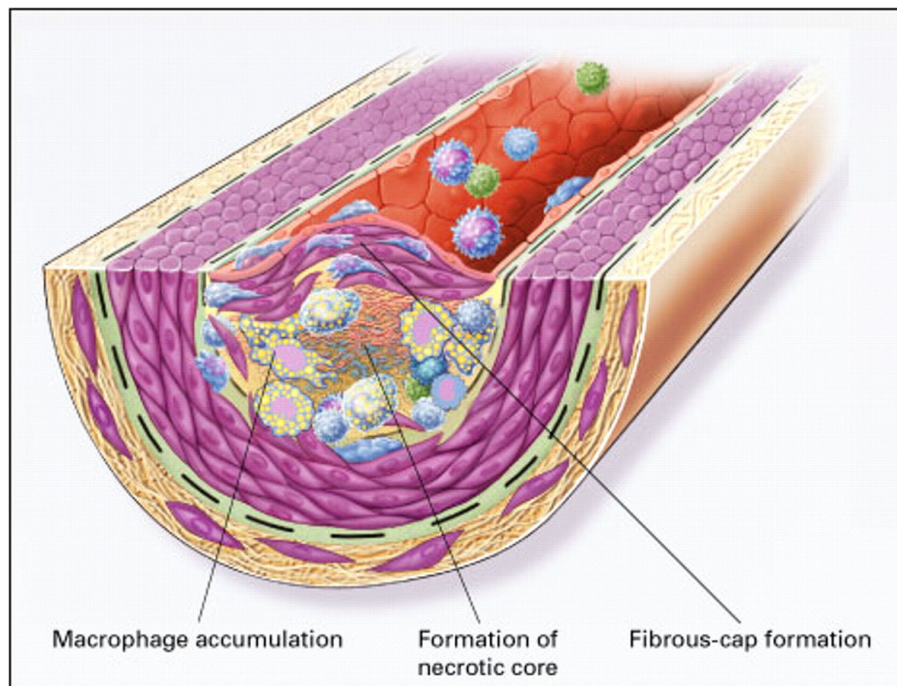


Abbildung 3: Fortgeschrittene atherosklerotische Plaque.⁵

Durch die unregulierte Aufnahme von Lipiden in Schaumzellen und als Folge deren Untergehens kommt es zur Ausbildung eines nekrotischen Kerns innerhalb der Läsion. Die in den subendothelialen Raum eingewanderten GMZ bilden die die Läsion stabilisierende fibröse Kappe. Aufgrund des fehlenden Vermögens die Entzündung aufzulösen, kann es zum weiteren Fortschreiten der Plaqueentwicklung kommen. In der Folge wird das Lumen des Gefäßes weiter verringert.

Durch das weitere Wachsen der Plaque kommt es zu Oxygenierungsproblemen und zur Ausbildung einer lokalen Hypoxie. Die Gewebshypoxie führt in der Folge zur vermehrten Sekretion von VEGF, dem potentesten angiogenen Faktor, welcher eine Vaskularisierung der Plaque von der äußeren medialen Seite auslöst. Diese Mikrogefäße wirken zwar der Hypoxie entgegen, sind aber auch eine mögliche Quelle für das Einwandern weiterer entzündlicher Zellen und destabilisieren zusätzlich.

Diese relativ einfache Betrachtung der Plaque als unidirektionale Verkettung inflammatorischer Prozesse muss jedoch nach heutigen Erkenntnissen in Frage gestellt werden. Mittels neuer bildgebender Verfahren, wie optischer Kohärenztomographie, hochauflösenden und schnellen Computertomographien und intraarteriellen Ultraschallkathetern, ist das Verständnis der Plaque als ein dynamischer und teilweise reversibler Prozess gewachsen.^{39, 40} Kommt es im Verlauf der Plaqueprogression zu einer fortlaufenden Schwächung und Verschmälerung der fibrösen Kappe, durch z.B. eine Reduktion der Expression von Matrixproteinen bzw. durch eine Verschiebung zwischen der Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren den *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) und zur Nekrose oder Apoptose glatter GMZ, so besteht die Möglichkeit, dass es zur Ruptur

der Plaque kommt.^{2, 41} Die Plaqueruptur tritt dann z.B. bei einer plötzlichen Änderung der hämodynamischen Beanspruchung durch Stress oder sportliche Aktivität auf. Es kommt zum Freisetzen hoch thrombogenen Materials in das Gefäßlumen. Dies führt zur lokalen Thrombozytenaggregation und in dessen Folge zum Gefäßverschluss. (siehe Abbildung 4) Die klinischen Folgen sind akuter Schlaganfall und Myokardinfarkt. Als kritisch wird das Unterschreiten einer Dicke der fibrösen Kappe von 65 μm angesehen.³⁰

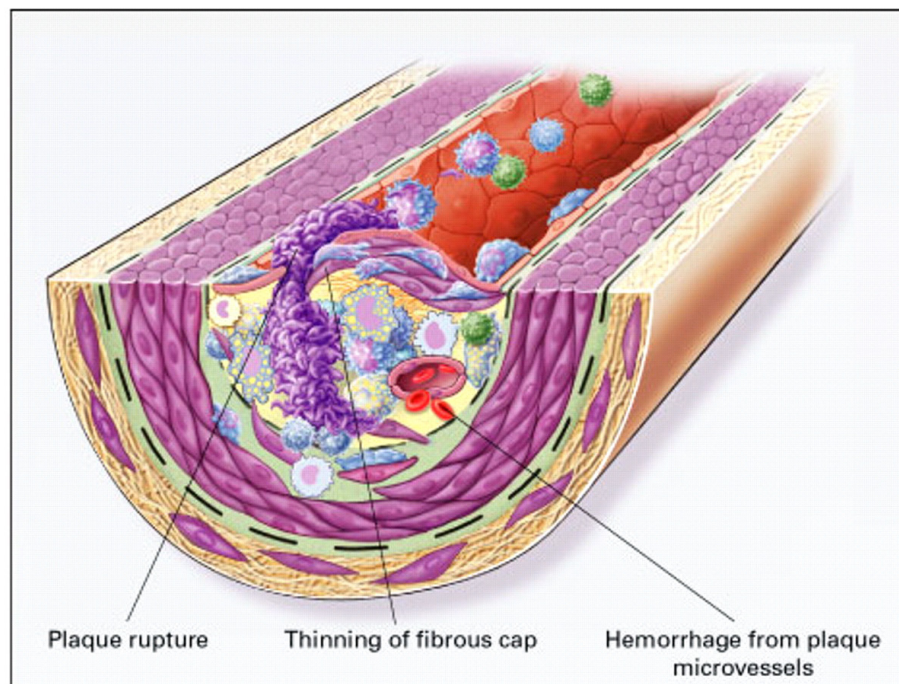


Abbildung 4: Das mechanische Versagen der fibrösen Kappe kann bei instabilen Läsionen zur Plaqueruptur führen.⁵

Die anhaltende Hypoxie hat zum Einsprossen von Kapillaren durch Media und Intima in die Läsion geführt. Die Verdünnung der fibrösen Kappe und die proteolytische Aktivität innerhalb der Läsion haben diese mechanisch destabilisiert. Dies kann zur Ruptur der Läsion und zum Freisetzen thrombogenen Materials führen. Die Folge ist der Gefäßverschluss und damit der Myokardinfarkt.

4.3 Die Rolle von Progenitorzellen in der Atherosklerose

Seit der Entdeckung im Blut zirkulierender Vorläuferzellen, sog. Progenitorzellen, für Endothelzellen durch Asahara et al. 1997,⁴² wurde der Beitrag von Vorläuferzellen zur Entstehung, Progression, Restenose, aber auch zur Reendothelialisierung von Läsionen kontrovers diskutiert.⁴³⁻⁴⁸ Die Diskussion um endotheliale Progenitoren und ihren Beitrag *in-vivo* hat bis heute zu über 10 000 Publikationen geführt. Auch wenn sich in den letzten Jahren die Euphorie gelegt hat, und ihr Beitrag von immer mehr Autoren auf Grund experimenteller Daten bezweifelt wird,^{47, 49, 50} so hat die Entdeckung zirkulierender endothelialer Progenitorzellen (EPC) auch zur Entdeckung von GMZ hämatopoetischen Ursprungs in der atherosklerotischen Plaque geführt.

Simper et al. konnten 2002 im Blut von Menschen nach der Isolation von mononukleären Zellen zeigen, dass daraus sowohl Endothelzellen als auch GMZ auswachsen können.⁵¹ Dies werteten sie als Beweis, dass es im Blut zirkulierende Progenitorzellen nicht nur für Endothelzellen, sondern auch für GMZ gibt. Ob diese jedoch auch *in-vivo* einen Beitrag für die atherosklerotische Plaqueentwicklung spielen, blieb zunächst unklar. 2003 konnten die Kollegen um Caplice dann in Autopsieproben von Patienten, die auf Grund vorhergehender hämatologischer Erkrankungen eine Knochenmarktransplantation erhalten hatten, im Verlauf jedoch verstorben waren, in der atherosklerotischen Plaque Zellen des Knochenmarkspenders identifizieren, welche Gefäßmuskelzellmarker exprimierten.⁵² Das Nachweisprinzip hinter dieser Entdeckung war, dass die Spender und die Empfänger jeweils anderen Geschlechts waren und daher die Zellen des Spenders mittels *fluorescence in-situ hybridization* (FISH) identifiziert werden konnten. Caplice et al. gaben an, dass ca. 10% aller GMZ in der Plaque aus dem Knochenmark des Knochenmarkspenders entstanden seien.⁵² Allerdings sind die damals geführten Nachweise aus heutiger Sicht eher zu bezweifeln. In der Arbeit von Simper et al. kann nicht ausgeschlossen werden, dass es bei der Blutentnahme nicht auch zum Ausstanzen eines Teiles des punktierten Blutgefäßes gekommen ist. Auch ist die in der Arbeit von Caplice et al. scheinbare Kolokalisation der FISH-Sonde und Gefäßmuskelzellmarker anzuzweifeln. Der mikroskopische Nachweis erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mit Epi-Fluoreszenz unter Verwendung eines triple Bandpass Filters. Bei der gewählten Schnittdicke von 4 µm in Kombination mit der schlechten Auflösung in Fokusrichtung (Z-Dimension) einfacher Epi-Fluoreszenztechnik kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass die detektierte FISH-Sonde nicht zu einem Kern über einer GMZ gehört. Außerdem muss in Betracht gezogen werden, dass die Hybridisierung eine gewisse Unsicherheit in die Analyse einbringt und nicht in allen Fällen quantitativ abläuft oder falsch positive Ergebnisse liefern kann.^{53, 54}

Zudem muss die Gefäßmuskelzell-Identität der von Simper et al. und Caplice et al. beschriebenen Zellen angezweifelt werden. Bei GMZ handelt es sich um hoch spezialisierte Zellen, deren Funktion die Kontraktion ist und damit die Steuerung des Blutflusses und -druckes erlaubt. Sie zeichnen sich durch die Expression eines hoch spezifischen Sets kontraktiler Proteine, Ionenkanäle und Rezeptoren aus. Diese unterscheiden Gefäßmuskelzellen klar von anderen Muskelzellen wie sie z.B. im Herzen oder Skelettmuskel vorkommen.^{55, 56} Es wurde eine große Zahl von gefäßmuskelspezifischen Genprodukten identifiziert, die als Marker zur

Identifizierung von GMZ herangezogen werden können. Darunter sind die Proteine bzw. spezifischen Isoformen des kontraktiven Apparats der GMZ, wie smooth muscle α -actin,⁵⁷⁻⁵⁹ smooth muscle myosin heavy chain,⁶⁰⁻⁶³ h1-calponin,^{64, 65} h-caldesmon,⁶⁶ und smooth muscle 22- α (SM22- α).^{63, 67, 68} Trotz dieses Repertoires verschiedener GMZ-Marker sind diese selbst in GMZ nicht permanent exprimiert und zudem in verschiedenen anderen Zelltypen während der Entwicklung oder verschiedenen pathologischen Geschehen, u.a. in hämatopoetischen Zellen, exprimiert.⁶⁹ Daher kann die Expression einzelner weniger GMZ-Marker, wie in den Studien von Caplice et al. und Simper et al., nur bedingt als ausreichender Nachweis für die Identität einer Zelle als GMZ angesehen werden.

Trotz der späteren Bestätigungen der Arbeiten um Caplice durch Sata et al.,⁷⁰ die ebenfalls zeigten, dass eine Vielzahl der GMZ in der atherosklerotischen Läsion hämatopoetischen Ursprungs seien, kann die Kontroverse über den Beitrag hämatopoetischer Zellen zur Population der GMZ in der atherosklerotischen Plaque heute fast als beendet gewertet werden.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Bentzon, einiger Kollegen aus dem Labor von Nagai, aber auch einer Kooperation von mir mit dem Labor von Professor Sedding in Giessen, konnten zeigen, dass es sich bei den Arbeiten von Caplice et al. und Sata et al. wahrscheinlich eher um ein Artefakt, hervorgerufen durch die komplexe Probenpräparation und aus heutiger Sicht relativ einfache mikroskopische Technik, handeln könnte.⁷¹⁻⁷⁴

Ein großes Problem der vaskulären Biologie besteht aber darin, in Proben aus Patientenmaterial und atherosklerotischen Tiermodellen, Zellen auf Grund der Expression von Markern einer bestimmten Zellpopulation sicher zuzuordnen. Neben der schon erwähnten Expression verschiedener Gefäßmuskelzellmarker in hämatopoetischen Zellen während verschiedener physiologischer und pathologischer Geschehen^{69, 75, 76} kann es auch zur Herabregulation von Gefäßmuskelzellmarkern in glatten GMZ kommen.⁷⁷⁻⁷⁹ Auch Studien der Ultrastruktur der Plaque bieten keine Lösung für die klare Zuordnung der beteiligten Zellen, da auch in der Ultrastruktur die Gefäßmuskelzell-typischen Merkmale, die sich wieder hauptsächlich auf das ausgeprägte Zytoskelett stützen, verloren gehen können.^{80, 81}

Es konnte zudem gezeigt werden, dass Cholesterin-beladene glatte GMZ nicht nur Gefäßmuskelzellmarker herunter regulieren, sondern zusätzlich Makrophagen-typische Gene induziert werden.⁸² Außerdem kommt es in diesen Zellen zu einer Induktion der Phagozytoseaktivität und zu einer schaumzellähnlichen Ablagerung von Lipiden, den sog. *lipid-droplets*.⁸²

4.4 Die Rolle von Gefäßmuskelzellen bei der Schaumzellentstehung

In histologischen Präparaten können aus GMZ entstandene Schaumzellen bzw. Schaumzellen ähnliche GMZ gefunden werden.⁸³⁻⁸⁵ Wie es *in-vivo* zur Genese dieser aus glatten GMZ entstandenen Schaumzellen kommt, ist eine bis heute noch nicht abgeschlossene Diskussion. Auf Grund dessen, dass man glatten GMZ eher eine stabilisierende Wirkung der atherosklerotischen Plaque nachsagt, und MP und Schaumzellen eher eine Plaque destabilisierende Wirkung zuschreibt,⁸⁶ ist diese Frage von sehr hoher klinischer Relevanz. Das Verständnis des Mechanismus, welcher glatte GMZ in Schaumzellen transformiert, könnte dabei zu neuen therapeutischen Zielen führen. Die dadurch ermöglichte Modulation der Transformation von glatten GMZ in Schaumzellen könnte zur Stabilisierung der atherosklerotischen Plaque und damit zur Reduktion des Herzinfarkttrisikos genutzt werden.

Es konnte zwar früh *in-vitro* gezeigt werden, dass unter bestimmten Umständen verschiedene LDL-Spezies in glatte GMZ aufgenommen werden können, jedoch ergibt sich aus der Literatur kein eindeutiger Mechanismus der zu einem schaumzellähnlichen Phänotyp von glatten GMZ *in-vivo* führt. So wurde beschrieben, dass es nach der Bindung von LDL an Proteoglykane der Gefäßwand oder die Ausschüttungen von Mastzellen zur direkten Aufnahme von LDL in glatte GMZ kommen kann.^{87, 88} Ebenso kann die enzymatische Modifikation von LDL durch Trypsin, Cholesterolesterase und Neuraminidase zu sog. enzymatisch modifiziertem LDL (eLDL) zu dessen Aufnahme durch glatte GMZ führen und damit die Schaumzellbildung induzieren.⁸⁹

Auch die *in-vitro* Infektion von GMZ mit dem Zytomegalievirus wurde für die erhöhte direkte Aufnahme verschiedener LDL Spezies, durch die Hochregulation verschiedener *scavenger* Rezeptoren, in glatte GMZ verantwortlich gemacht und führte in einem Ratten-Modell zu einer ausgeprägteren Atherosklerose.^{90, 91} Ein anderer Rezeptor, CD36, der typischerweise auf Makrophagen vorkommt und auf diesen ebenfalls für die Aufnahme verschiedener LDL-Spezies zuständig ist, konnte in glatten GMZ durch Aktivierung des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor Gamma hochreguliert werden und führte ebenfalls zur phänotypischen Veränderung der GMZ in Schaumzellen.⁹²

Auch das gewählte Tiermodell kann bei *in-vivo* Studien einen großen Einfluss auf die zelluläre Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaque haben.⁹³ Es ist z.B. bekannt, dass sich die zelluläre Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaque zwischen den beiden Makakenarten *Macaca fascicularis* und *Macaca mulatta* stark unterscheidet.⁹⁴

Zusammenfassend kann man sagen, dass diverse Mechanismen vorgeschlagen wurden, die *in-vitro* oder *in-vivo* zur Schaumzellbildung aus glatten GMZ führen können, allerdings konnte sich keiner dieser Mechanismen als ursächlich für das Auftreten von aus GMZ entstandenen Schaumzellen durchsetzen.^{83, 85}

4.5 Zielstellung der Arbeit

Während es zu Beginn dieser Arbeit starke Hinweise in der Literatur für eine Transdifferenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen in glatte GMZ gab, gilt die Transdifferenzierung heute als nicht klinisch relevant. Es gab jedoch erste Hinweise, dass es sich – wenn überhaupt - bei den transdifferenzierenden Zellen um Monozyten/Makrophagen handeln könnte.

Die Klärung der Mechanismen, die zur Genese von Schaumzellen aus glatten GMZ führt, ist hingegen bis heute zentrales Forschungsthema der vaskulären Biologie.

Ziel der vorliegenden Studie war daher zu klären ob

- (1) Monozyten/Makrophagen in der Tat die Fähigkeit besitzen zu Gefäßmuskelzellen zu transdifferenzieren und, im negativen Falle,
- (2) die Hypothese zu testen, ob Monozyten/Makrophagen phagozytierte Lipide an Gefäßmuskelzellen in direktem Kontakt übertragen können, und diese dabei in Schaumzellen transformiert werden.

Da in der atherosklerotischen Plaque lokale Makrophagen in direkten Kontakt zu glatten GMZ treten, wurde ein Kokultur-Modell etabliert, um o.g. Fragestellungen zur (1) Transdifferenzierung und zum (2) Transfer von Lipiden *in-vitro* zu untersuchen.

5 Material und Methoden

5.1 Geräte

Tabelle 5.1: Verwendete Geräte und ihre Hersteller

Gerät Typ, Ort (teilweise Spezifikationen)	Hersteller
Autoklav Laboklav 80-V	SHP-Steriltechnik
Chemikalienfeinwaage Ab104-S/Ph	Mettler Waagen
Chemikalienwaage KERN 440-33	KERN
Fluoreszenzmikroskop (Dresden) Stativ Axiovert S100 mit PIFOC Piezogetriebenen Fokuselement, Spot RT™ KE slider, Zeiss Fluoreszenzfilter: No. 00 (Anregung Filter [EX] 557.5/55, Farbteiler [BS] 600, Emission Filter [EM] long pass [LP] 615), No. 09 (EX 470/40, BS 510, EM LP 515), No. 10 (EX 470/40, BS 510, EM 540/50) and No. 49 (EX G 365, BS 395, EM 445/100) Aufnahme und Fokuskontrolle durch MetaVue 7 Für Z-Stapel wurde ein EC Plan-Neofluar 63x/1.25 Oil verwendet	Carl Zeiss (Stativ und Filter) Physik Instrumente GmbH & Co. KG (PIFOC) Diagnostic Instruments, Inc. (Spot Kamera) Molecular Devices, Inc. (Software)
Fluoreszenzmikroskop (Magdeburg) Stativ voll motorisiertes Axiovert 200m mit AxioCam MRm und MRc, life-cell-imaging box H201, Fluoreszenzfilter: Zeiss No. 49 (EX G 365, BS 395, EM 445/100), HQ-FITC (EX BP 480/40, BS 505, EM 535/50), HQ-Cy3.5 (EX 565/30, BS 585, EM 620/60), HQ-Texas Red (EX 560/55, BS 595, EM 645/75), motorisierter XY-Objektisch, Aufnahme und Stativkontrolle durch AxioVision 4.8 Für Z-Stapel wurde ein EC Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil verwendet für die time-lapse Aufnahmen ein Plan-Neofluar 10x/0.30 Ph1	Carl Zeiss (Stativ, Kameras, Filter und Software) Okolab S.r.l. (Lebenzellbeobachtungs- Ausrüstung) Chroma Technology Corp. (HQ- Fluoreszenzfilter) Maerzhaeuser Wetzlar GmbH & Co. KG (Objektisch)
Geldokumentationssystem E-Box-1000-26M, mit Steuergerät IP- CF01-SD	PEQLAB Biotechnologie GMBH
Inkubationshaube Th 15 Kompaktschüttler Ks 15Bcontroll	Edmund Bühler
Inkubator (Dresden) BB6220	Heraeus
Inkubator (Magdeburg) MCO-18AJC	Sanyo
Konfokales LASER Scanning Mikroskop Leica TCS SP5 es wurden ein 40x/1.3 oil oder 63x/1.40 Oil Apo Objektiv verwendet mit <i>scan</i> Feldgrößen von	Leica Microsystems GmbH

512x512 pxl bzw. 1024x1024 pxl bei einer <i>pinhole</i> -Grösse von einer <i>airy unit</i> der Zoom wurde bis zum Erreichen einer Nyquist sampling Rate benutzt.	
Labor-Mikrowelle Micromat	AEG
Mikroskop Axiovert 40 C	Carl Zeiss
Multimode-Plattenlesegerät (Magdeburg) Synergy HT	BIO-TEK Instruments GmbH
pH-Meter, Messkette pH-Meter 766 Calimatic	Knick Meßelektronik
Plattenlesegerät (Dresden) µQuant	BIO-TEK Instruments GmbH
Power Supply Power Pac Basic	Bio-Rad
<i>Real-Time</i> PCR Gerät (Dresden) iCycler Thermal cycler	Bio-Rad
<i>Real-Time</i> PCR Gerät (Magdeburg) CFX 96 Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad
Reinstwassersystem Gen Pure UV/UF	TKA-LAB
Thermomixer compact 5350 & comfort 5355	Eppendorf
Trockenschrank Kelvitron®t	Heraeus
UV- Transilluminator Genoview Smart 11	VWR International
Vacusaft comfort	Integra Biosciences
Wasserbad SW 22	Julabo Labort.Seelbach
Sicherheitswerkbank (Dresden) CleanAir	Woerden
Sicherheitswerkbank (Magdeburg) Hera Safe KS 18	Thermo Fisher
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf
Zentrifuge Allegra X-15R Benchtop	Beckman Coulter GmbH

5.2 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Applichem bzw. Sigma-Aldrich mindestens in der Qualität p.A. verwendet.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, *beads* und Reagenzien wurden von Invitrogen bzw. Life Technologies Corp. bezogen.

5.3 Verwendete Kulturmedien

Tabelle 5.2: Verwendete Kulturmedien, Puffer und Zellkultur-Lösungen

Kulturmedien und Zusätze für die Kultur eukaryotischer Zellen	
Antibiotika/Antimykotika-Mix (PAA Laboratories GmbH)	10 000 IU/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycinsulfat 25 µg/ml Amphotericin B
Zellkulturmedium für glatte GMZ und MP (D10F+)	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium low Glucose (1 g/l)</i> (PAA Laboratories GmbH) 10% (v/v) FCS 1% (v/v) Antibiotika/Antimykotika-Mix
Zellkulturmedium für HEK293 (D+10F+)	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium high Glucose (4,5 g/l)</i> (PAA Laboratories GmbH) 10% (v/v) FCS 1% (v/v) Antibiotika/Antimykotika-Mix
Zellkulturmedium für Endothelzellen (EGM)	Endothelial cell Growth Medium MV (PromoCell GmbH) 1% Antibiotika/Antimykotika-Mix
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	10 mM Dinatriumhydrogenphosphat 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat 140 mM Natriumchlorid 3 mM Kaliumchlorid pH 7,4
Monozyten-Waschpuffer	0,5% (w/v) Bovines Serumalbumin 2 mM EDTA in PBS
Trypsin EDTA Lösung (PAA Laboratories GmbH)	0,5 mg/ml Trypsin 0,22 mg/ml EDTA in PBS
Kulturmedien für die Kultivierung von E.coli	
SOB-Medium (Carl Roth GmbH & Co. KG)	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l Magnesiumsulfat 0,5 g/l Natriumchlorid 0,186 g/l Kaliumchlorid pH 7,0
SOC-Medium	SOB-Medium 20 mM Glukose
LB-Medium (Carl Roth GmbH & Co. KG)	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Natriumchlorid pH 7,0
LB-Agar (nach Luria & Miller; Carl Roth GmbH & Co. KG)	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Natriumchlorid pH 7,0

5.4 Verwendete Kit-Systeme

Tabelle 5.3: Verwendete *kit*-Systeme und ihr Hersteller

<i>Kit-Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Adenovirus Purification Kit Adeno-X™ Maxi</i>	Clontech Laboratories, Inc
<i>Adeno-X™ Expression System 1</i>	Clontech Laboratories, Inc
<i>Adeno-X™ Rapid Titer Kit</i>	Clontech Laboratories, Inc
<i>Endo-free Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen GmbH
<i>Invisorb Plasmid Mini Kit</i>	Invitek / STRATEC Molecular GmbH
<i>Invisorb® Spin Cell RNA Mini Kit</i>	Invitek / STRATEC Molecular GmbH
<i>NucleoSpin® Plasmid</i>	Macherey-Nagel
<i>PCR Mycoplasma Test Kit I/C</i>	PromoCell GmbH
<i>PS-Speck Microscope Point Source Kit</i>	Invitrogen bzw. lifetechnologies Corp.
<i>QIAEX® II Gel Extraction Kit</i>	Qiagen GmbH
<i>RevertAid™ H Minus First Strand Synthesis Kit</i>	Fermentas GmbH
<i>SYBR® Premix ExTaq™</i>	Lonza Group Ltd.

5.5 Verwendete Oligonukleotide

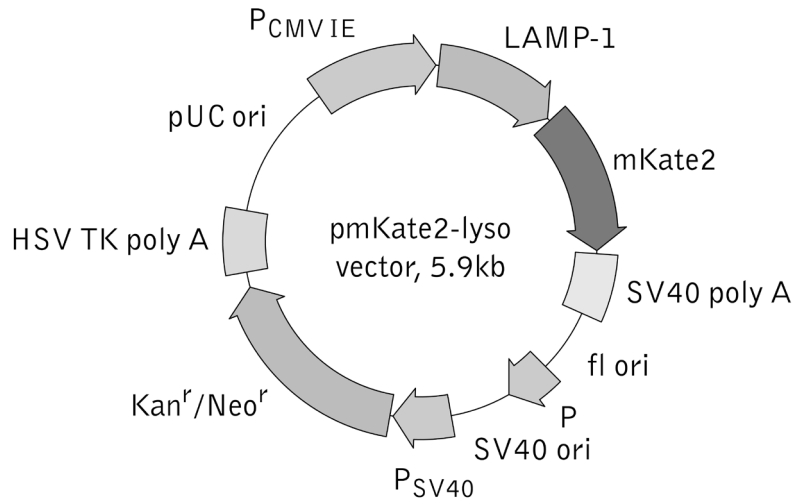
Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon bezogen. Alle Oligonukleotide wurden in der Reinheitsstufe HPSF (*high purity salt free*) verwendet. Der zur Klonierung des Lamp-1-mKate2 in pShuttle verwendete *reverse* Primer enthält einen 5'-Überhang mit einer KpnI Schnittstelle, welche in der folgenden Liste durch Unterstreichen kenntlich gemacht ist.

Tabelle 5.4: Verwendete Oligonukleotide

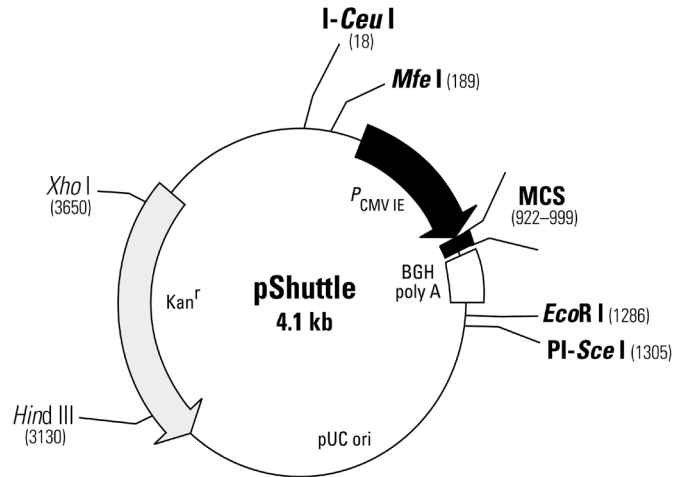
Gen	Primernamen	NCBI Nr.	Sequenz (5'-3')	Fragmentlänge
<i>real-time</i> PCR Primer				
TAGLN	HS-sm22 s HS-sm22 as	NM_001001522 NM_003186	GTG GCT CAG TTC CTG AAG GCG TTT CCC TCC TGC AGC TGG CTC	236
ACTA2	HS-sm-actin s HS-sm-actin as	NM_001141945 NM_001613	TAC CCT GGC ATT GCC GAC C CCA GAC AGA GTA TTT GCG CTC C	105
EEF2	HS-EF2 s HS-EF2 as	NM_001961	GGT GGT CGG TGG CAT CTA C GTT GGA CCT CAG GTC AGC G	148
CNN1	HS-Calpon s HS-Calpon as	NM_001299.4	CGG CAA CTT CAT CAA GGC CAT C GTA CTT CAC TCC CAC GTT CAC C	169
CALD1	HS-Caldes s HS-Caldes as	NM_033138	TGA AAG CCA GGA GGA AAC AGT G TCC AAC CTT GCC CTC TCT GC	168
HPRT1	HS-HPRT1 s HS-HPRT1 as	NM_000194.2	TTG CGA CCT TGA CCA TCT TTG CTT TGC TGA CCT GCT GGA TTA C	263
HPRT1	RN-HPRT1 s RN-HPRT1 as	NM_012583	CTT TGC TGA CCT GCT GGA TTA C ATC CAA CAC TTC GAG AGG TCC	299
ICAM1	RN-ICAM1 s RN-Icam1 as	NM_012967	CCA CCT CAC AGA TCC AAT TC TCT TGC CAG GTC CAG TTC	184
CD68	RN-CD68 s RN-CD68 as	NM_001031638	CAC CAG TCA TGG GAA TGC GGA ATG AGA GAG CCA AGT G	308
HMGCR	RN-HMGCoA s RN-HMGCoA as	NM_013134	AGT CGC TGT GTT CAT CTC CCT GCT TGT ACT CTG CTC	104
LGALS3	RN-MAC2 s RN-MAC2 as	NM_031832	AGC CTG TCC AGG ATA ACC AAT GGC AGA CGG CTT CTC AC	172
Klonierungs Primer				
	cLysoKate for cLysoKate rev		GAG GTC TAT ATA AGC AGA GC GCG <u>GTA CCT</u> ATG GCT GAT TAT G	2096
Sequenzierungs Primer				
	pShuttle seq for		ACT ATA GGG AGA CCC AAG CTG	
	pShuttle seq rev		CAA ACA ACA GAT GGC TGG	

5.6 Verwendete und hergestellte Plasmide

5.6.1 pmKate2-lyso



5.6.2 pShuttle



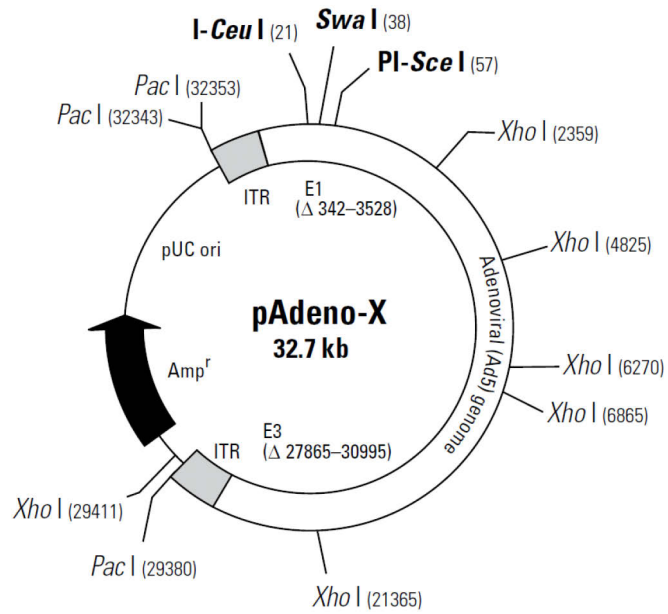
pShuttle MCS

920
 •
 TGGCTAGCGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCCACTGTGCTGG
 Nhe I Apa I Xba I Xho I Not I BstX I

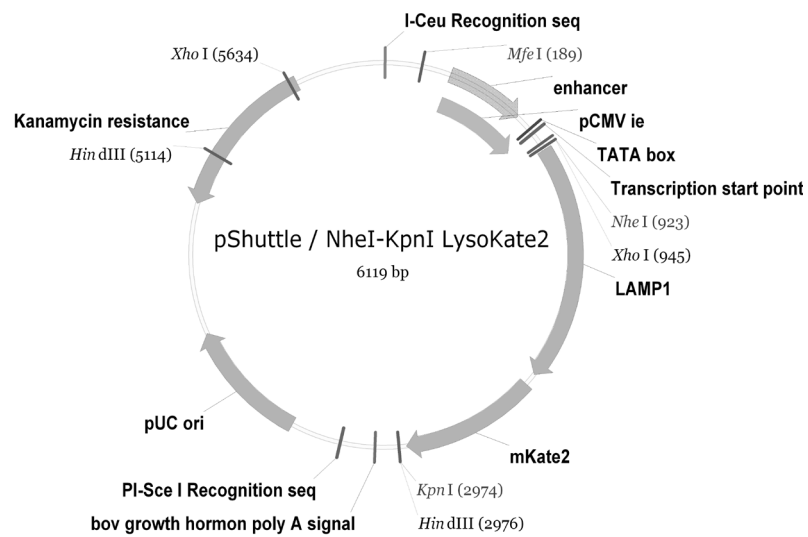
972
 •
 ATGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGC
 Kpn I Hind III Afl II

STOP (ORF 1) STOP (ORF 2) STOP (ORF 3)

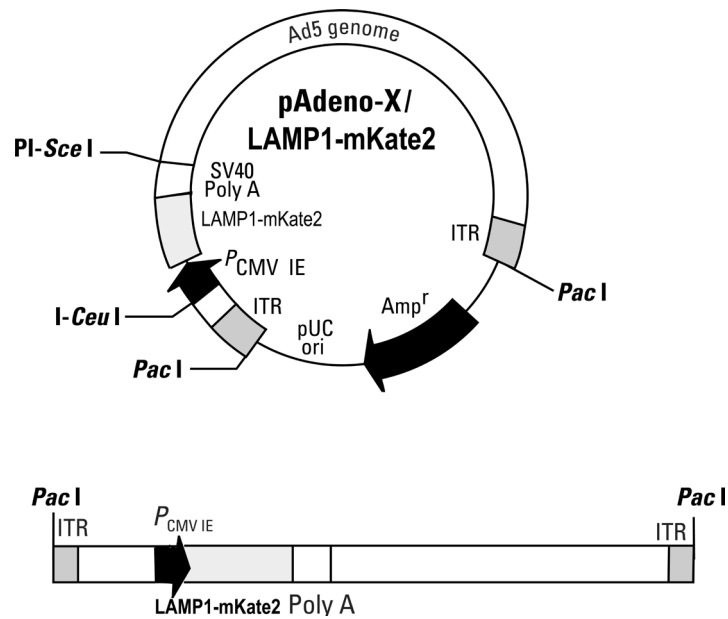
5.6.3 pAdeno-X



5.6.4 pShuttle/ NheI-KpnI LysoKate2



5.6.5 pAdenoX/LAMP-1-mKate2



5.7 Verwendete Zelllinien und *Escherichia coli* Stämme

5.7.1 Eukaryontische Zelllinien

HEK293 - humane embryonale Nierenzellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

5.7.2 Prokaryontische Zelllinien

Name	Genotyp
<i>E. coli</i> Stbl2	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ(lac-proAB) mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) λ-
<i>E. coli</i> One Shot [®] TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str ^r) endA1 nupG λ-

5.8 Zellkultur

5.8.1 Kultur von HEK293 Zellen

Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 wurde zur Generierung von Adenoviren genutzt. Die HEK-Zellen wurden, soweit nicht anders beschrieben, in D+10F+ kultiviert. Nach Erreichen einer ca. 90% optischen Konfluenz wurden die Zellen mittels Waschen mit PBS und der Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung von dem Zellkulturplastik gelöst. Durch die Zugabe frischen Zellkulturmediums wurde die Trypsinreaktion gestoppt und die Zellen mittels Zentrifugation pelletiert. Zum Erhalt der Zellkulturen wurden die Zellen anschließend im Verhältnis 1:4, bezogen auf die verwendete Kulturfläche, in frischem Zellkulturmedium ausgesät.

5.8.2 Isolation humaner Monozyten durch doppelte Dichtegradientenzentrifugation

Die Isolation humaner Monozyten erfolgte in Dresden aus sog. *buffy coats*, einem Nebenprodukt der Weiterverarbeitung von Vollblutspenden zu Plasma- oder Erythrozytenpräparaten für die medizinische Anwendung am Menschen. Die *buffy coats* wurden vom DRK Blutspendedienst Dresden bezogen.

In Magdeburg wurden für die Aufarbeitung von Blutspenden benutzte Leukozytenfilter zur Isolation verwendet. Die Leukozytenfilter wurden vom Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie mit Blutbank des Universitätsklinikums Magdeburg bezogen. Die Leukozytenfilter wurden hierzu nach der Aufarbeitung durch die Mitarbeiter steril an beiden Schlauchsystemseiten verschlossen. Das retrograde Ausspülen mittels PBS/EDTA (5 mM EDTA) ermöglichte es, die aus dem Blut zurückgehaltenen Leukozyten aus dem Filter zu lösen. Die Verarbeitung dieser erfolgte analog zu der in Dresden etablierten Methode.

Zur Isolierung der mononukleären Zellen wurden spezielle 50 ml Reaktionsgefäße (LeucoSep™) verwendet, die sich durch eine poröse Membran auszeichnen. Die eigentliche Separation erfolgte durch eine Dichtegradientenzentrifugation, die auf der unterschiedlichen Dichte der Leukozyten des in dem *buffy coat* vorliegenden Zellgemisches beruht (siehe Abbildung 5).

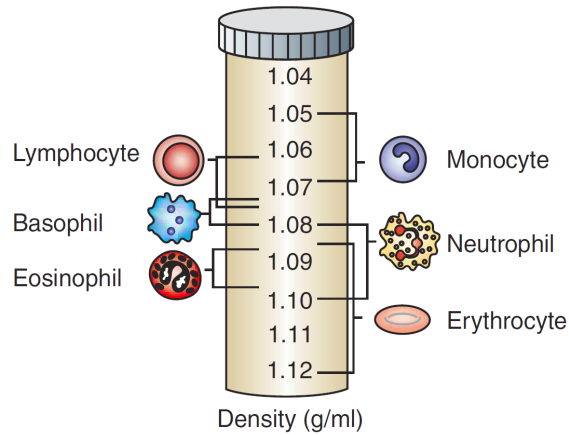


Abbildung 5: Schematisierte Verteilung und Maxima verschiedener Blutzellen in einem kontinuierlichen Dichtegradienten nach einer Dichtegradientenzentrifugation aus Munoz & Leff.⁹⁵

Aufgrund ihrer geringeren Dichte lassen sich Leukozyten durch ein Trennmedium mit einer Dichte von $\rho=1,077 \text{ g cm}^{-3}$ anreichern. Eine weitere Auftrennung zwischen den Leukozyten und Anreicherung der Monozytenfraktion kann durch die Verwendung eines Trennmediums mit geringerer Dichte erreicht werden.

Es wurden je 15 ml LSM 1077 Trennmedium ($\rho= 1,077 \text{ g cm}^{-3}$) in je drei LeucoSep™ Röhrchen je Probe vorgelegt und bei 1100xg für 1 min unter die poröse Membran zentrifugiert. Die Blutzellsuspension wurde mit warmem PBS auf ca. 105 ml aufgefüllt und gleichmäßig auf die drei LeucoSep™ Röhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden dann bei Raumtemperatur (RT) für 15 min bei 1000xg mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Dabei entstand über der Interphase ein weißer Ring aus peripheren mononukleären Zellen. Die mononukleären Zellen wurden in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Es war dabei darauf zu achten, dass kein Trennmedium mit überführt wurde, da dieses zytotoxisch ist. Die Zellsuspension wurde durch Auffüllen mit Monozytenwaschpuffer auf 50 ml und anschließendes Zentrifugieren für 10 min bei 250xg dreimalig gewaschen. Die noch in der Zellsuspension vorhandenen Thrombozyten wurden durch eine weitere Zentrifugation von 10 min bei 100xg entfernt, da diese Beschleunigung nicht ausreicht, um die Thrombozyten zu dem Zellpellet am Boden des Röhrchens hinunter zu zentrifugieren. Das Zellpellet wurde erneut nach dem Abnehmen des Waschpuffers in 7 ml Monozytenwaschpuffer aufgenommen.

Zu diesem Zeitpunkt bestanden die Zellsuspensionen in der Regel aus ca. 30% CD14-positiver Zellen. CD14 ist der LPS-Rezeptor auf Monozyten und kann als ein Maß für die Reinheit der Monozytenpräparation benutzt werden. Die Reinheit wurde stichprobenartig durchflusszytometrisch bestimmt.

Der Anteil CD14-positiver Zellen wurde daraufhin durch eine weitere Dichtegradientenzentrifugation auf ca. 70-75% erhöht. Dazu wurde eine Percoll-Stammlösung mit einer spez. Dichte von ($\rho= 1,123 \text{ g cm}^{-3}$) mit

physiologischer Kochsalzlösung ($\rho = 1,0046 \text{ g cm}^{-3}$) gemäß der unten genannten Formel so verdünnt, dass eine Dichte von $\rho = 1,064 \text{ g cm}^{-3}$ eingestellt wurde. Das Erreichen der einzustellenden Dichte wurde durch Messung mittels eines Aräometers nochmals überprüft.

$$V_{0,9\%NaCl} = V_{\text{Percoll}} \times \frac{1,123 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3} - \rho_{\text{gewünscht}}}{\rho_{\text{gewünscht}} - 1,0046 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}}$$

Formel zur Berechnung des Mischungsverhältnisses von Percoll-Stammlösung und physiologischer Kochsalzlösung zum Einstellen der gewünschten Dichte.

7 ml der Percoll-Arbeitslösung wurden in 15 ml Röhrchen aus Polystyrol gegeben und vorsichtig mit den 7 ml der Zellsuspension aus der ersten Dichtegradientenzentrifugation überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation von 20 min bei 800xg bei ausgeschalteter Bremse. Die Interphase mit der gewünschten Monozytenfraktion wurde abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und die Zellzahl, nach nochmaligem Waschen mit Monozytenwaschpuffer, mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden erneut durch Zentrifugation für 10 min bei 200xg pelletiert.

Das Pellet wurde für eine spätere Verwendung der Zellen als differenzierte Makrophagen in einer Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml D10F+ resuspendiert und mit je 2 ml/Loch in einer *ultra low attachment* 6-Loch Zellkulturplatte in Kultur genommen.

Bei der Verwendung von primären Monozyten wurden diese direkt in das entsprechende Zellkulturplastik eingesät.

In den ersten Tagen wurde stets nur Medium zugegeben, da Monozyten sich innerhalb der ersten 1-2 Tage nochmals von der Kulturfläche lösen, um dann langfristig und sehr fest zu adhären. Durch das Wechseln des Mediums ab dem fünften Tag konnte die Reinheit weiter erhöht werden, da die kontaminierenden nicht permanent adhären T-Lymphozyten hierbei sukzessive entfernt wurden.

Falls die Monozyten zu Makrophagen terminal differenziert werden sollten - dies war vor allem für die späteren Versuche wichtig - wurden die Zellen für zwei Wochen bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 95% rel. Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 (v/v) weiter kultiviert. Bis zur Weiterverwendung wurde das Medium dreimal wöchentlich entfernt und durch frisches und vorgewärmtes D10F+ ersetzt.

Monozytenwaschpuffer:

2 mM EDTA

0,5% (w/v) bovines Serum Albumin

in PBS

5.8.3 Isolation hochreiner Monozyten aus Nabelschnurblut

Eine weitere Quelle für hochreine CD14-positive Zellen war die Kooperation mit einer hämatologischen Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik und Poliklinik I am Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der TU-Dresden. Frau Dr. med. Susanne Auffermann-Gretzinger stellte uns, nachdem unsere ersten Ergebnisse zunächst eine Transdifferenzierung von Monozyten/Makrophagen in glatte GMZ implizierten, hochreine CD14-positive Monozyten aus nicht für die Konservierung in der Nabelschnurblutbank geeignetem Nabelschnurblut zur Verfügung. Den Stammzellen des Nabelschnurblutes wird eine besonderes leichte Zugänglichkeit bei gleichzeitig hoher Plastizität zugeschrieben.^{96, 97}

In den Versuchen mit nun hochrein aufgereinigten Monozyten aus Nabelschnurblut sollte untersucht werden, ob das Transdifferenzierungsverhalten für die CD14-positiven Monozyten aus dem Nabelschnurblut erhöht ist. Die Monozyten wurden, wie oben beschrieben, durch einen Dichtegradienten mit einer Dichte von ($\rho = 1,077 \text{ g cm}^{-3}$) zur mononukleären Zellfraktion aufgereinigt. Diese wurden dann durch Inkubation mit magnetischen Anti-CD14 Antikörpern über das MACS-System (Magnetic-Activated Cell Sorting der Firma Miltenyi Biotec GmbH) unter Verwendung von Säulen in magnetischen Feldern hoch aufgereinigt. Die Präparationen fanden nach dem Standardprotokoll der Firma statt. Um eine höhere Reinheit zu erreichen, wurde nach der ersten Säule eine weitere Säule mit den entsprechenden Waschschritten nachgeschaltet. Aliquots der Zellpräparation wurden zur Kontrolle der Reinheit mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Es wurden Reinheiten von über 95% CD14-positiver Zellen erreicht. Die sog. Negativfraktion, also die CD14+ depletierte Zellfraktion, wurde als Kontrolle für die Kokultorexperimente mitgeführt.

5.8.4 Isolation glatter Gefäßmuskelzellen aus Nager Aorten

Da sich die Isolation glatter GMZ aus Nagern, ob Ratte oder Maus, nicht unterscheidet, werden sie im Folgenden zusammen beschrieben.

Tabelle 5.5: Für die Organentnahme genutzte Tierarten, Stämme und ggf. ihr Genotyp

Tierart	Stamm (Lieferant)	Alter und Geschlecht
Rattus norvegicus	Wistar (Charles River)	8-10 Wochen, männlich
Mus musculus	C57BL/6 (Charles River)	6-8 Wochen, männlich
Mus musculus	C57BL/6 ^{Tg(ACTB-EFP)10sb/J} (The Jackson Laboratory)	6-8 Wochen, männlich

Die Isolation beruht auf einer der ersten Beschreibungen von Russel Ross.⁹⁸ Die Baucharten von toten Nagern, Mäusen oder Ratten, die für tierexperimentelle Projekte im Labor von Frau Professor Strasser verbraucht wurden, wurden entnommen und in ein steriles 15 ml Röhrchen mit ca. 5 ml PBS überführt. Alle tierexperimentellen Arbeiten, bzw. Organentnahmen, wurden unter Beachtung des *guide for care and usage of laboratory animals* des *National Institutes of Health* (NIH publication 8th Edition, in seiner aktuellen Form von 2011) sowie der Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes in seiner aktuellen Form durchgeführt.

Die Aorten wurden dann unter der Sicherheitswerkbank wieder entnommen und in eine 57 cm² Zellkulturschale überführt. Mittels eines sterilen Präparationsbestecks wurden die Aorten grob mechanisch gereinigt, längs aufgeschnitten und mit der Innenseite nach oben auf den Deckel der Zellkulturschale überführt. Die Endothelzellen und verbliebene Blutreste auf dieser Seite wurden durch mehrfaches Kratzen mit einem Skalpell im stumpfen Winkel entfernt. Die daraus entstehenden etwa 1 cm² großen Aortengewebestücke wurden dann mit der Innenseite nach unten in je eine weitere 57 cm² Zellkulturschale überführt und vorsichtig mit wenig D10F+, ca. 8 ml, überschichtet. Es wurde darauf geachtet, dass die Gewebestücke hierbei weiterhin in Kontakt mit der Kulturfläche blieben, da es sonst nicht zum spontanen Auswachsen von GMZ gekommen wäre. Die Zellkulturschale wurde dann möglichst erschütterungsarm für zwei Tage im Inkubator kultiviert.

Nach zwei Tagen konnte man ein in der Literatur häufig als fischzugartig bezeichnetes Auswachsen spindelförmiger GMZ beobachten.^{98, 99} Das Gewebestück wurde mit einer Pipette ein Stück verrückt um ein weiteres Auswachsen an anderer Stelle zu ermöglichen und somit möglichst viele primäre Zellen in der Passage Null zu erhalten. Nach ca. einer Woche wurden die Gewebestücke entfernt und die Zellen passagiert und, wie unter 5.8.7 Kultur glatter Gefäßmuskelzellen beschrieben, weiter kultiviert.

5.8.5 Parallele Isolation glatter Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen aus humanen Explantaten

Zur Isolation vaskulärer Zellen konnten anonymisierte Explantate aus der Klinik für Kardiochirurgie am Herzzentrum Dresden bezogen werden. Die Explantate wurden im Operationssaal vom Operateur in vorbereitete sterile Gefäße mit 200 ml PBS überführt, um wenige Stunden nach der Explantation weiterverarbeitet zu werden. Es

handelte sich um arterielle Ringe mit einem Durchmesser von ca. 4 cm, einer Stärke von ca. 3-4 mm und einer Länge von bis zu 3 cm.

Alle weiteren Arbeiten wurden innerhalb einer Sicherheitswerkbank im Labor von Frau Professor Strasser durchgeführt. Die Explantate wurden aus dem PBS entnommen und auf eine 57 cm² Zellkulturschale überführt. Die Ringe wurden dann mit einer Schere halbiert und bis zur Weiterverarbeitung in frischem PBS gelagert. Die Isolation erfolgte angelehnt an die Beschreibung von Grenier et al.¹⁰⁰

Zur Isolation arterieller Endothelzellen wurde das Aortengewebe mit der Lumenseite nach oben in den Deckel einer 57 cm² Zellkulturschale gelegt. Es wurde dann im stumpfen Winkel mit einem Skalpell (Figur 11) unter leichtem Druck über die Innenseite gestrichen. Das an der Klinge abgekratzte Gewebe, welches die einlagige Endothelzellschicht enthielt, wurde dann durch Spülen des Skalpells in 10 ml EGM in ein 50 ml Röhrchen überführt. Dieses Vorgehen wurde mit dem zweiten Stück des Explantats wiederholt. Die 10 ml EGM wurden dann in eine frische 57 cm² Zellkulturschale überführt und die isolierten Endothelzellen bei 95% rel. Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂ und 37 °C kultiviert.

Das verbliebene Aortengewebe wurde von der intimalen und medialen Seite mechanisch gereinigt. Dabei wurde durch Spalten die äußerste bzw. innerste Schicht von dem weiterzuverarbeitenden Aortengewebe getrennt, um eine eventuelle Kontamination mit Endothelzellen von der intimalen Seite, und Fibroblasten von der medialen Seite zu vermeiden. Das Aortengewebe wurde nun mit einer Schere in ca. 1 cm² große Stücke zerteilt. Die Stücke wurden in einem vorbereiteten 50 ml Röhrchen in D10F+ gesammelt. Nachdem das gesamte Aortengewebe so verarbeitet war, wurde es in 1-2 57 cm² Zellkulturschalen überführt und bei 95% rel. Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂ und 37 °C kultiviert. Analog zur Isolation aus Nagergewebe wurde darauf geachtet, dass die Gewebestücke hierbei in Kontakt mit der Kulturfläche blieben, um ein spontanes Auswachsen von GMZ zu gewährleisten. Die Zellkulturschale wurde dann möglichst erschütterungsarm für sieben Tage im Inkubator bei 95% rel. Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂ und 37 °C kultiviert.

Nach sieben Tagen konnte man ein erstes Auswachsen spindelförmiger GMZ beobachten. Das Gewebestück wurde mit einer Pipette während des ersten Mediumwechsels ein Stück verrückt, um ein weiteres Auswachsen an anderer Stelle zu ermöglichen und somit möglichst viele primäre Zellen in der Passage Null zu erhalten. Nach ca. einer weiteren Woche wurden die Gewebestücke entfernt und die Zellen passagiert und, wie unter 5.8.7 Kultur glatter Gefäßmuskelzellen beschrieben, weiter kultiviert.

5.8.6 Kultur der Endothelzellen

Die Endothelzellen dienten hauptsächlich als Positivkontrolle in einzelnen Experimenten. Es wurde dreimal wöchentlich das Medium abgesaugt und durch frisches vorgewärmtes EGM ersetzt. Die Endothelzellen wurden bei Erreichen einer 100% optischen Konfluenz passagiert. Dazu wurde das EGM abgesaugt und verbleibende Reste durch einmaliges Spülen mit vorgewärmtem PBS entfernt. Dann wurden die Zellen mittels Inkubation mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei 37 °C von der Kulturfläche abgelöst und in 8 ml EGM aufgenommen. Die Zellen wurden bei 250xg für 5 min zentrifugiert und der Überstand aus EGM und Trypsin/EDTA-Lösung abgenommen. Die Zellen wurden dann wieder in EGM aufgenommen und auf drei 57 cm² Zellkulturschalen verteilt. Die Anzahl der Passagen wurde hierbei mitgezählt und korreliert mit der Anzahl an Teilungen. Es wurden keine Zellen über Passage zwei verwendet, da sich bei Endothelzellen bei längerer Kultur eine deutliche Veränderung der Morphologie, aber auch der Physiologie, sowie ein Überwachsen mit kontaminierenden Zellen wie Fibroblasten einstellen kann.¹⁰¹

5.8.7 Kultur glatter Gefäßmuskelzellen

Die aus Aortengewebe gewonnenen glatten GMZ wurden, soweit nicht anders beschrieben, routinemäßig in 57 cm² Zellkulturschalen mit ca. 12 ml D10F+ bei 37 °C, 95% rel. Luftfeuchte und 5% (v/v) CO₂ kultiviert. Das Medium wurde dreimal wöchentlich abgesaugt und durch frisches vorgewärmtes D10F+ ersetzt.

Die Zellen wurden bei Erreichen von ca. 85% - 95% optischer Konfluenz passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und durch Spülen mit PBS verbliebene Reste entfernt. Dann wurden die Zellen mittels Inkubation mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei 37 °C von der Kulturfläche abgelöst und in 8 ml D10F+ aufgenommen. Das enthaltene Serum stoppte durch enthaltene Trypsin-Inhibitoren aus dem Serum die Endopeptidaseaktivität des Trypsins.

Die Zellen wurden bei 250xg für 5 min zentrifugiert und der Überstand aus D10F+ und Trypsin/EDTA-Lösung abgenommen. Die Zellen wurden dann wieder in D10F+ aufgenommen und auf drei 57 cm² Zellkulturschalen verteilt. Die Anzahl der Passagen wurde hierbei mitgezählt und korreliert mit der Anzahl an Teilungen. Auch hier kann eine zunehmende Dedifferenzierung und Selektion schnell wachsender Zellen durch die Kulturbedingungen nicht ausgeschlossen werden. In den

Experimenten wurden daher hauptsächlich Zellen der Passage 4-8 verwendet, um diese Effekte zu minimieren. Alle Zellen der Passage 9 wurden entsorgt.

5.8.8 Einfrieren und Auftauen von Zellen für die Zellkultur

Im Folgenden ist das Einfrieren und Auftauen vaskulärer Zellen und der HEK-Zellen beschrieben. Das Vorgehen ist für glatte GMZ, Endothelzellen und die ebenfalls verwendeten HEK293 Zellen gleich und unterscheidet sich nur durch die Verwendung des zellspezifischen Zellkulturmediums.

Zum Einfrieren wurden die Zellen durch Waschen mit PBS und Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturfläche gelöst und, aufgenommen in frischem Medium, an den Boden eines 15 ml Röhrchens zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in Einfriermedium, einem Gemisch bestehend aus 60% (v/v) des entsprechenden Zellkulturmediums (D10F+ für GMZ, EGM für arterielle Endothelzellen bzw. D+10F+ für HEK293), 30% (v/v) FCS und 10% (v/v) DMSO, aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Für jedes Kryoröhrchen wurde eine Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml Einfriermedium eingestellt.

Die Kryoröhrchen wurden dann über Nacht bei -20 °C gelagert und am nächsten Morgen in ein Tiefst Kühlgerät (-80 °C) überführt. Eine solche primäre Zellkultur kann so Monate bis Jahre gelagert werden. Eine noch längere Lagerung ist z.B. in der Gasphase über flüssigem Stickstoff in einem entsprechenden Kryotank bei -196 °C möglich und wurde für einzelne Aliquots angewendet.

Um die Zellen nach der Lagerung weiter zu kultivieren, wurden die Kryoröhrchen mit 1 ml Zellsuspension in dem oben genannten Einfriermedium langsam aufgetaut und in 9 ml zellspezifischem Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden zum Auswaschen des zytotoxischen DMSO abzentrifugiert (5 min bei 250xg) und der Überstand durch Absaugen entfernt. Das Zellpellet wurde dann in 12 ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen, resuspendiert und in eine 57 cm^2 Zellkulturschale überführt. Am folgenden Tag wurde verbliebenes DMSO und tote Zellen durch den Wechsel des Zellkulturmediums entfernt.

5.9 Charakterisierung primärer isolierter Zellen

5.9.1 Immunozytochemische Färbungen zur Charakterisierung glatter Gefäßmuskelzellen

Isolierte glatte GMZ wurden routinemäßig durch den immunozytochemischen Nachweis typischer glattmuskulärer Proteine des Zytoskeletts charakterisiert. Dieser Nachweis wurde auch eingesetzt, um die Transdifferenzierung hämatopoetischer Zellen zu untersuchen.

Die Zellkulturen wurden aus dem Inkubator entnommen und das Medium durch abkippen entfernt. Es folgte ein Waschschriff mit PBS. Zur Fixierung der Zellen wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet. Bei den Kokulturen mit FL-acLDL markierten Monozyten/Makrophagen wurden die Zellen für 20 min bei RT mit einer gepufferten 4% Formalinlösung fixiert. Zum Charakterisieren frisch isolierter GMZ wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol (MeOH) überschichtet und dann für 20 min bei -20 °C fixiert.

Die Zellkulturen wurden dann mit PBS gewaschen und für 30 min bei RT mit einer 10%-igen (v/v) FCS/PBS Blocklösung behandelt. Dies verhindert unspezifische Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen der Probe und den eingesetzten Antikörpern und minimiert daher den Hintergrund bei den Färbungen.

Tabelle 5.6: Verwendete Antikörper, Klone und eingesetzte Konzentrationen

Spezies, Antikörper, Typ, Klon	Konzentration
Maus IgG1 _κ MOPC-21; Isotypenkontrolle	10 µg/ml
Maus Anti-α-actin, smooth muscle FITC, mAb, 1A4	10 µg/ml
Maus Anti-α-actin smooth muscle Cy3, mAb, 1A4	10 µg/ml
Maus Anti-caldesmon (Smooth), mAb, hHCD	7,1 µg/ml
Maus Anti-calponin, mAb, hCP	8,3 µg/ml
Ziege Anti-SM22-α, pAb	1 µg/ml
Schaf Anti-Mouse IgG F(ab') ₂ fragment FITC, pAb	10 µg/ml
Schaf Anti-Mouse IgG F(ab') ₂ fragment Cy3, pAb	10 µg/ml
Hase Anti Zeige IgG (leichte und schwere Kette) FITC, pAb	10 µg/ml

Die Präparate wurden nach dem Blockieren für 1 h bei RT mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation wurde dreimal mit der Blocklösung

gewaschen. Daraufhin wurden die nicht direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper mit einem entsprechenden sekundären Antikörper in Blocklösung für 1 h bei RT inkubiert. Es wurde einmal mit Blocklösung gewaschen. Für eine DAPI-Färbung der DNA wurde das DAPI einem Aliquot der Blocklösung in einer Konzentration von 1 µg/ml aus einer 1000fachen Stammlösung (1 mg/ml in Aqua dest.) hinzugefügt und dieser zweite Waschschrift auf 5-10 min verlängert. Es wurde abermals, also insgesamt dreimal, gewaschen und das Präparat dann mittels MountFluor™ (quartett GmbH) und Deckgläschen für die Betrachtung am Fluoreszenzmikroskop konserviert.

5.9.2 Charakterisierung primärer Endothelzellen

Primäre Endothelzellen wurden durch die Zugabe von fluoreszenzmarkiertem acetyliertem LDL (FL-acLDL), Endkonzentration 5 µg/ml, in das Zellkulturmedium charakterisiert. Endothelzellen sind im Gegensatz zu den möglichen zellulären Kontaminationen, glatten GMZ und Fibroblasten, in der Lage acetyliertes LDL (acLDL) aus dem Zellkulturmedium aufzunehmen. Zusätzlich fand eine Kerngegenfärbung mit Hoechst 33342 mit einer Endkonzentration von 5 µg/ml statt. Zur Analyse wurde die Probe der fluoreszenzmikroskopischen Analyse unterworfen. Endothelzellen zeigten sich hierbei als positiv für aufgenommenes FL-acLDL und Hoechst 33342. Kontaminierende Zellen dagegen waren nur Hoechst 33342 positiv. Es wurden ausschließlich Endothelzellpräparationen weiterverwendet bei denen mehr als 95% aller kultivierten Zellen FL-acLDL positiv waren.

5.9.3 Charakterisierung der primären Monozyten

Zur Überprüfung der Reinheit und zur Qualitätssicherung der Zellpräparationen wurden regelmäßig Stichproben der Monozytenisolationen der Durchflußzytometrie zugeführt. Hierzu wurden 1×10^5 Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und mittels FITC-gekoppelten Anti-CD14 Antikörpern (Maus Anti-CD14 FITC, mAb, Klon: TUK4) 1:50 für eine Stunde gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit 500 µl PBS und anschließendem Zentrifugieren wurde der Anteil CD14-positiver Zellen in der gesamten Zellpopulation mittels Durchflußzytometrie in Dresden an einem FACS Calibur™ bzw. in Magdeburg an einem FACS Canto™ II (beide Becton, Dickinson and Company GmbH) bestimmt.

5.10 Test auf Mycoplasmen

Alle neu isolierten primären GMZ Kulturen wurden vor der weiteren Verwendung in Experimenten auf Mycoplasmenkontamination getestet. Ein Aliquot der zu testenden primären Zellkultur wurde über eine Woche in Antibiotika-freiem D10F kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und für 20 min mit eiskaltem MeOH bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert. Mittels DAPI Lösung in PBS (Endkonzentration $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ DAPI) wurde für 5 min bei RT die DNA gefärbt. Dann wurde dreimal mit PBS gespült und das Präparat final mit PBS überschichtet und mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop bei entsprechender Fluoreszenzfilterwahl betrachtet. Mycoplasmen wären nun durch den Nachweis ihrer DNA als kleine Punkte außerhalb des Zellkerns sichtbar geworden. Zusätzlich wurden unregelmäßig durch den kommerziell erhältlichen *PCR Mycoplasma Test Kit I/C* alle zu dem Zeitpunkt in Kultur befindlichen Zellen, bis auf die nicht teilungsfähigen und damit immer nur kurzfristig in Kultur befindlichen Monozyten/Makrophagen, auf eine mögliche Kontamination mit Mycoplasmen getestet. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben.

5.11 Experimente zur Transdifferenzierung von Monozyten/Makrophagen in glatte Gefäßmuskelzellen

5.11.1 Transdifferenzierung von Monozyten/Makrophagen in glatte Gefäßmuskelzellen durch lösliche Faktoren

Um die Stimulationsbedingungen für eine Transdifferenzierung von Monozyten/MP in GMZ zu finden, wurde ein Ansatz gewählt, mit dem möglichst viele Bedingungen zur gleichen Zeit getestet werden konnten.

Hierzu wurde die frisch isolierte Monozytenfraktion aus 5.8.2 Isolation humaner Monozyten durch doppelte Dichtegradientenzentrifugation mit einer Zellzahl von 15×10^3 Zellen pro Loch, das entspricht ca. 10×10^3 Monozyten, in 96-Loch Zellkulturplatten ausgesät. In dieser Versuchsserie sollte das Transdifferenzierungspotenzial von Monozyten unter einer angiogenen Komposition aus Wachstumsfaktoren getestet werden. Dabei wurde sich an den Bedingungen zur EPC Differenzierung orientiert und variierende Konzentrationen der Gefäßwand-typischen angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF, bFGF und IGF-1 verwendet. Es wurden alle 96 Kombinationsmöglichkeiten der unten angegebenen Wachstumsfaktor-Konzentrationen getestet.

Tabelle 5.7: Tabelle verschiedener in Kombination eingesetzter Wachstumsfaktoren zur Transdifferenzierung von MP in glatte GMZ

VEGF	bFGF	IGF-1
0 ng/ml	0 ng/ml	0 ng/ml
1 ng/ml	2,5 ng/ml	1,25 ng/ml
2 ng/ml	5 ng/ml	2,5 ng/ml
4 ng/ml	10 ng/ml	5 ng/ml
8 ng/ml		
16 ng/ml		

Zusätzlich zu den definierten Variationen der Wachstumsfaktoren wurde durch konfluente glatte GMZ Kulturen konditioniertes und steril filtriertes Medium verwendet.

Um die Zellkulturbedingungen zusätzlich zu variieren, wurden neben unbeschichteten 96-Loch Zellkulturplatten, diese auch mit verschiedenen Proteinen auf der Wachstumsfläche beschichtet. Dazu wurden die Zellkulturplatten vor Versuchsbeginn mit FCS, boviner Kollagen 1 Lösung ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und boviner Fibronectin Lösung ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Die Protein-Lösungen wurde abgesaugt und die Zellkulturplatten dreimal mit PBS gespült. Das PBS wurde durch Absaugen entfernt und die Zellkulturplatten bis zur Verwendung steril und lichtgeschützt bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Die verschiedenen Monozyten-Präparationen ($n=6$, $n=4$ pro Proteinbeschichtung, sowie $n=4$ für durch glatte GMZ Kulturen konditioniertes Medium) wurden so bis zu vier Wochen bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 95% rel. Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 (v/v) kultiviert. Während dieser Zeit wurde das verbrauchte Medium dreimal wöchentlich durch frisches mit entsprechender Wachstumsfaktorkonzentration ersetzt. Nach Beendigung der Kultur wurde das Medium entfernt und mit PBS dreimalig gewaschen. Es folgte eine Fixierung mittels eiskaltem MeOH und eine immunozytochemische Färbung auf GMZ-Marker und die Gegenfärbung der DNA mittels DAPI, wie unter 5.9.1 Immunozytochemische Färbungen zur Charakterisierung glatter Gefäßmuskelzellen beschrieben.

5.12 Kokulturen zwischen glatten Gefäßmuskelzellen und Monozyten/Makrophagen

Neben dem Versuch, Monozyten durch Stimulation mit löslichen Wachstumsfaktoren und konditioniertem Medium zu transdifferenzieren, wurden Zellkulturen zwischen GMZ und Monozyten bzw. MP eingesetzt.

5.12.1 Kokultur aus Monozyten/Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen in 12-Loch Zellkulturplatten

12-Loch Zellkulturplatten wurden initial für die Kokulturen eingesetzt, da diese im Gegensatz zu kleineren Zellkulturformaten eine relativ plane Zellkulturoberfläche bieten. So gut wie alle auf dem Markt erhältlichen Zellkulturplastikgefäße haben das Problem, dass sie baulich bedingt eine leicht konkave Zellkulturfläche bieten. Dies spielte für die anschließende mikroskopische Analyse eine wichtige Rolle, da sowohl die Kontrastierung mittels Phasenkontrastverfahren als auch die Korrektur des Arbeitsabstands z.B. mit dem verwendeten LD Achroplan 40x/0,60 Korr nur mit planen Flächen zu optimalen Ergebnissen führen kann. Die gewählten 12-Loch Zellkulturplatten erfüllten dieses Kriterium in Abwägung zur Menge des einzusetzenden Materials am besten.

Es wurden 13×10^3 glatte GMZ ausgesät und für 24 h kultiviert. Anfangs wurden relativ lange Zeiträume von bis zu vier Wochen für die Kokultur mit Monozyten/Makrophagen eingesetzt. Dabei würde das Problem auftreten, dass die glatten GMZ die MP relativ schnell überwachsen würden. Daher wurden die glatten GMZ durch die Behandlung mit einem DNA-*crosslinker* in ihrer Proliferation gehemmt. Hierfür wurden sie nach dem Absaugen des Zellkulturmediums mit einer Mitomycin C Lösung, 2 µg/ml in D10F+, für 1 h im Zellkulturinkubator inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Mitomycin C Lösung abgesaugt, die GMZ dreimal mit warmem PBS gewaschen und dann das Zellkulturmedium wieder durch D10F+ ersetzt.

Es wurden dann mit FL-acLDL markierte Monozyten/Makrophagen (siehe 5.13.1.1 Markierung der Monozyten/Makrophagen mit fluoreszenzmarkiertem acLDL) durch Trypsinbehandlung und Spülen mit Zellkulturmedium von der *ultra low attachment* 6-Loch Zellkulturplatte gelöst und durch Zentrifugieren pelletiert. Die Monozyten/Makrophagen wurden in frischem Medium aufgenommen und in einem Verhältnis von einer GMZ zu drei Monozyten/Makrophagen ausgesät. Dieses

Verhältnis hatte sich in Vorversuchen bewährt und orientiert sich an der Zusammensetzung nahe des nekrotischen Kerns einer entzündlichen atherosklerotischen Plaque. Dieses Verhältnis wurde bei allen folgenden Kokulturversuchen auch bei der Änderung der Zellkulturformate beibehalten. Es wurden einzelne Löcher mit Einzelkulturen aus glatten GMZ bzw. Monozyten/Makrophagen als Kontrollen mitgeführt. Der Zeitpunkt des Einsäens der Monozyten/Makrophagen wurde als Zeitpunkt null definiert.

Die Kulturen wurden dann bis zu vier Wochen im Inkubator bei 37 °C, 95% rel. Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ (v/v) kultiviert. Während dieser Zeit wurde das Zellkulturmedium dreimal wöchentlich durch frisches vorgewärmtes D10F+ ersetzt.

5.12.2 Räumlich getrennte Kokulturen aus Monozyten/Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen

Neben den direkten Kokulturen wurden räumlich getrennte Kokulturen als Kontrollen untersucht. Die räumliche Trennung wurde durch die Verwendung sog. *trans-well*-Einsätze erreicht. Diese Einsätze sind für viele Zellkulturformate erhältlich und werden in die *multiwell*-Platten eingehängt. Durch die *trans-well*-Einsätze können Zellen dann über der eigentlichen Zellkulturfläche kultiviert werden. Die Zellkulturfläche der *trans-well*-Einsätze zeichnet sich durch Poren definierter Größe aus, durch die dann, je nach gewählter Größe, das Medium und Zellen zwischen den beiden Kompartimenten ausgetauscht werden können. Für die Versuche wurden ausschließlich *trans-well*-Einsätze verwendet, die einen Porendurchmesser von 1 µm aufwiesen, da zwar ein Austausch löslicher Faktoren, Exosomen und Vesikel apoptotischer Zellen erwünscht war, nicht aber, dass die Zellen durch die Poren migrieren.

Im Anschluss an die Zellkultur wurden die Kokulturen mit PBS gewaschen und für 20 min bei RT mit 4%-iger gepufferter Formalinlösung fixiert. Es folgte eine immunozytochemische Färbung auf verschiedene glatte GMZ-Marker, wie unter 5.9.1 Immunozytochemische Färbungen zur Charakterisierung glatter Gefäßmuskelzellen beschrieben. Die Präparate wurden dann am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, um die Anzahl doppelpositiver, FL-acLDL und GMZ-Marker positiver, Zellen zu bestimmen.

5.12.3 Kokulturen in 6-Loch Zellkulturplatten zur RNA-Analytik

Die Kokulturen im 6-Lochplatten Zellkulturformat wurden später für RNA-Analysen und die regelmäßige mikroskopische Dokumentation auf das größere 6-Lochplattenformat adaptiert. Dazu wurden die Zellzahlen für die glatten GMZ auf 30×10^3 Zellen/Loch und die Zahl der Monozyten/Makrophagen auf 90×10^3 Zellen/Loch erhöht. Auch hier wurden zur Kontrolle Einzelkulturen glatter GMZ, Monozyten/Makrophagen sowie durch $1 \mu\text{m}$ *trans-well*-Einsätze getrennte Zellpopulationen mitgeführt.

5.12.4 Kokulturen in Glasbodenschälchen

Für die Verwendung zur dreidimensionalen und *time-lapse* Mikroskopie wurde es notwendig, Zellkulturgefäße zu verwenden, die eine Mikroskopie mit Öl-Immersion zuließen bzw. die besten optischen Eigenschaften boten. Daher wurde die Kokultur nochmals adaptiert. Die verwendeten Glasbodenschälchen, *fluorodishes* (World Precision Instruments, Inc.), zeichnen sich durch eine in den Boden des Zellkulturgefäßes eingelassenen Glasboden mit der einer für Deckgläschen üblichen Dicke von 0,17 mm aus. In ersten Vorversuchen zeigte sich, dass die GMZ nur schlecht auf dem unbehandelten Glas adhären. Daher wurden alle *fluorodishes* in den Folgeversuchen mit boviner Kollagen 1 Lösung ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichtet (siehe 5.11.1 Transdifferenzierung von Monozyten/Makrophagen in glatte Gefäßmuskelzellen durch lösliche Faktoren). Die Zellzahl wurde abermals auf die veränderte Kulturfläche adaptiert. Es wurden für die Kokulturen 15×10^3 GMZ und 45×10^3 Monozyten bzw. MP ausgesät. Bei der Kultur von humaner GMZ in diesem Kokultur-Modell wurde auf eine Behandlung mit Mitomycin C verzichtet, da die Kokulturzeit im Projektverlauf immer kürzer wurde und die humanen GMZ in Vergleich zu denen aus Nagern sich sehr langsam teilen, wenn man sie semi-konfluent aussät.

5.12.5 Re-Isolation kokultivierter glatter Gefäßmuskelzellen

Zur ausschließlichen Analyse der glatten GMZ nach der Kokultur wurde die unterschiedliche Adhärenz bzw. Sensibilität der beiden Zellpopulationen gegenüber der für die Zellkultur verwendeten Trypsin/EDTA-Lösung ausgenutzt.

MP lassen sich von normalem Zellkulturplastik so gut wie nicht wieder ablösen. Dies war auch der Grund für die Verwendung von *ultra low attachment* Zellkulturplastik während der Vorbereitung der MP, wohingegen sich glatte GMZ nach ca. 5 min Einwirkzeit bei 37 °C von dem Zellkulturplastik lösen lassen. Außerdem unterscheiden sich die beiden Zellpopulationen durch die Geschwindigkeit der erneuten Adhärenz an Zellkulturplastik. Während MP sehr schnell, innerhalb von Minuten, adhären, tun glatte GMZ dies wesentlich langsamer, innerhalb mehrerer Stunden. Diese Eigenschaft wurde zusätzlich genutzt, um die in dem abgelösten Zellgemisch vorhandene Makrophagen-Kontamination zu verringern. Die Makrophagen-Kontamination ist wahrscheinlich auf MP zurückzuführen, die sich während der Behandlung der Kokultur mit Trypsin/EDTA auf glatten GMZ befanden. Die Kokulturen wurden hierzu durch Spülen mit PBS und einer 5 min Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung von der Zellkulturplatte gelöst. Das gelöste Zellgemisch aus überwiegend glatten GMZ und einer geringen MP-Kontamination wurde dann in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml D10F+ resuspendiert und auf eine frische Zellkulturschale gegeben. Diese wurde nun für 30 min im Inkubator bei 37 °C, 95% rel. Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ (v/v) kultiviert. Im Phasenkontrastmikroskop konnte man nach dieser Zeit deutlich erkennen, wie die meisten MP im abgelösten Zellgemisch schon adhären waren, die glatten GMZ jedoch noch in Suspension vorlagen. Das Zellkulturmedium mit den glatten GMZ wurde dann auf eine weitere Zellkulturplatte überführt. Die so re-isolierten glatten GMZ wurden nun über Nacht im Inkubator bei 37 °C, 95% rel. Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ (v/v) kultiviert. Am folgenden Tag konnte aufgrund der unterschiedlichen Morphologie der glatten GMZ und der MP bei Phasenkontrastierung eine Anreicherung der glatten GMZ auf über 95% glatte GMZ dokumentiert werden. Die so re-isolierten GMZ wurden dann der Analyse der Phagozytoseaktivität zugeführt.

5.13 Fluoreszenzmarkierung lebender Zellen

Um die Zellen, bzw. ihre Organellen, während der Kokultur von MP und glatten GMZ mittels Fluoreszenzmikroskopie untersuchen zu können, wurden die Zellen in Einzelkultur vor Beginn der Kokultur durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe oder die Expression von fluoreszierenden Proteinen markiert.

5.13.1 Markierungen der Monozyten/Makrophagen

5.13.1.1 Markierung der Monozyten/Makrophagen mit fluoreszenzmarkiertem acLDL

Initial wurden die Monozyten bzw. Makrophagen in Einzelkulturen durch die Behandlung mit fluoreszenzmarkiertem acLDL markiert, um diese in der Kokultur verfolgen zu können. Außerdem sollten an Hand der Markierung der Zellen, diese bei einer späteren Färbung gegen glatte GMZ-Marker als ehemalige transdifferenzierte MP identifiziert werden. Die Markierung mit FL-acLDL hat dabei den Vorteil, dass es nur von wenigen humanen Zellen, hauptsächlich Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und EPC, aufgenommen werden kann. Eine direkte Aufnahme durch glatte GMZ unter normalen Kulturbedingungen wurde bisher nicht beschrieben und konnte durch Kontrollversuche ausgeschlossen werden.

Das u.a. verwendete Dil-acLDL besteht aus acLDL, welches durch Komplexierung mit Dil, einem Fluoreszenzfarbstoff, welcher über zwei Lipidanker verfügt, auf dem acLDL gebunden ist. Das Dil-acLDL wurde dem Zellkulturmedium der Einzelkultur in einer Konzentration von 15 µg/ml zugefügt.

Das Dil-acLDL wurde in späteren Versuchen durch AlexaFluor[®] markierte acLDL Varianten ersetzt, da das Dil nicht kovalent an das acLDL gebunden ist. Es gab Zweifel, ob die Fluoreszenzmarkierung im Laufe der Zeit nicht vom dem acLDL gelöst wurde. Das verwendete AlexaFluor[®] acLDL wurde ebenfalls in einer Konzentration von 15 µg/ml zur Markierung eingesetzt. Da sich die verschiedenen fluoreszenzmarkierten acLDL-Spezies außer in ihren Farben und Quanteneffizienz in den Versuchen nicht unterschieden, werden sie von mir im Folgenden unabhängig von der gewählten Markierung als FL-acLDL beschrieben.

5.13.1.2 Markierung der Makrophagen mit fluoreszierenden Kügelchen (*beads*)

Zur Kontrolle der Markierung mit Dil-acLDL wurden den Makrophagen in der vorbereitenden Einzelkultur auch zusätzlich oder ausschließlich fluoreszierende Latex *beads* verschiedener Größe und Farbe zur Phagozytose angeboten. Diese Versuche sollten ausschließen, dass nur der von acLDL gelöste Fluoreszenzfarbstoff Dil aus den Makrophagen in die glatten GMZ transportiert wurde.

Dazu wurden die initial verwendeten 1-10 µm großen *beads* in einer Konzentration von 20×10^3 *beads*/ml in D10F+ der Makrophagen-Einzelkultur zugefügt. Die Makrophagen wurden so über Nacht inkubiert, um den Zellen Gelegenheit zur Phagozytose zu geben. Diese *beads* hatten den Vorteil, dass sie auf Grund ihrer Größe auch bei Phasenkontrastierung im Mikroskop leicht zu erkennen waren. Am Folgetag wurden die Monozyten/Makrophagen dann, wie unter 5.12.1 Kokultur aus Monozyten/Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen in 12-Loch Zellkulturplatten beschrieben, von der *ultra low attachment* 6-Loch Zellkulturplatte gelöst und durch Zentrifugieren pelletiert. Es folgten noch 3 Waschschriffe mit D10F+ und Zentrifugation, um nicht phagozytierte *beads* aus der Kultur zu entfernen. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen für die Kokultur eingesetzt. In späteren Versuchen wurden dann auch kleinere *beads* mit einem Durchmesser von 1 µm eingesetzt. Die Konzentration der eingesetzten fluoreszierenden *beads* wurde auf Grund ihrer geringeren Größe auf 80×10^3 *beads*/ml erhöht.

5.13.1.3 Markierung der Monozyten/Makrophagen mit fluoreszenzmarkierten acLDL/Cholesterol Komplexen

Nach dem sich im Projektverlauf zeigte, dass das zur Markierung eingesetzte FL-acLDL von den MP an die glatten GMZ abgegeben wird, stellte sich die Frage, ob dabei auch Cholesterol in die glatten GMZ transferiert wird. Um diese Frage zu beantworten, wurden Komplexe aus fluoreszenzmarkiertem Cholesterol (FL-Cholesterol) und dem FL-acLDL hergestellt.

Dazu wurde das Cholesteryl BODIPY[®] FL C₁₂, ein mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff BODIPY[®] markiertes Cholesterol, in hoher Konzentration von 1 mg/ml in DMSO gelöst. 2 µl dieser Lösung wurden zu 48 µl rot markiertem FL-acLDL zugefügt und die Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das führte zur Bildung von Komplexen aus Cholesteryl BODIPY[®] FL C₁₂ und dem FL-acLDL. Diese Komplexe wurden erst in Kontrollversuchen mit MP auf ihre zu erwartenden Eigenschaften getestet. Nach den erfolgreichen Kontrollversuchen wurden die mit FL-Cholesterol/FL-acLDL Komplexen markierten MP in den Kokulturen eingesetzt.

5.13.1.4 Markierung der Zellmembran von Monozyten/Makrophagen

Diese Markierung wurde u.a. initial dazu genutzt, um die MP in der Fluoreszenzmikroskopie am Axiovert 100 als gesamte Zelle darstellen zu können, da dies auf Grund der fehlenden Kontrastierung mittels Phasenkontrast mit dem verwendeten EC Plan-Neofluar 63x/1,25 Oil $\infty/0,17$ nicht möglich war. Außerdem sollte später mit dieser Markierung untersucht werden, ob die MP auch Membranbestandteile mit den kokultivierten glatten GMZ austauschen. Zur Markierung der MP wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Dil und DiO eingesetzt, welche erstmals zur Markierung von Zellmembranen in Neuronen beschrieben wurden.¹⁰² Diese Farbstoffe zeichnen sich durch ihre lipophilen Seitenketten aus, die es ihnen ermöglichen, auf der Zellmembran zu schwimmen und sich lateral zu verteilen. Zudem können die Farbstoffe zum Detektieren von Zellfusionen genutzt werden.¹⁰³⁻¹⁰⁵

Die Zellen wurden hierzu, nachdem sie von den *ultra low attachment* 6-Loch Zellkulturplatten gelöst wurden, in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in DMEM aufgenommen und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann mit 5 μ l der methanolischen Vybrant[®] Markierungslösung versetzt und unter Schütteln für 5 min inkubiert, um eine gleichmäßige Markierung aller Zellen zu erreichen. Der Markierungsvorgang wurde danach durch die Zugabe von 9 ml serumhaltigen D10F+ gestoppt. Die Zellen wurden durch wiederholtes Zentrifugieren und Resuspendieren gewaschen. Die Zellzahl wurde abermals bestimmt und die Zellen in die Kokulturen mit den glatten GMZ eingesät.

5.13.1.5 Darstellung der Lysosomen in Makrophagen mittels adenoviraler Überexpression von LAMP-1-mKate2

Zur Darstellung der Lysosomen in MP für das *live-cell-imaging* wurde das unter 5.18.11 Adenovirale Vektorkonstruktion beschriebene Adenovirus verwendet. Zur adenoviralen Infektion wurden terminal differenzierte MP zehn Tage nach der Isolation auf den *ultra low attachment* 6-Loch Zellkulturplatten mit M-CSF (100 ng/ml) stimuliert. Die Stimulation erhöht die Expression des Integrins $\alpha V\beta 5$, welches für die effiziente Infektion von Makrophagen benötigt wird.¹⁰⁶ 48 h nach Stimulation wurde das LAMP-1-mKate2 kodierende Adenovirus mit einer M.O.I. von 25 zum Medium hinzugefügt. Die verwendete M.O.I. ist im Vergleich zur Literatur relativ niedrig und

fürhte nur zu einer ca. 50% Infektion der Makrophagen (gemessen an der Expression von LAMP-1-mKate2). Die Verwendung höherer M.O.I. wurde aber in Vorversuchen ausgeschlossen, da diese zur Überexpressionsartefakten bei der Ausformung der Lysosomen führten.

Die Makrophagen wurden 48 h nach der Infektion mit dem Adenovirus mit FL-acLDL beladen und in Kokulturen mit glatten GMZ eingesetzt.

5.13.2 Färbungen von glatten Gefäßmuskelzellen

5.13.2.1 Langzeitmarkierung zur Identifikation von glatten Gefäßmuskelzellen in der Kokultur

Zur Verfolgung der glatten GMZ über lange Zeiträume wurde initial mit GMZ aus GFP-positiven Mäusen gearbeitet. Um auch humane GMZ sicher anhand einer Markierung zu identifizieren, wurden membrangängige Fluoreszenzfarbstoffe mit zusätzlichen funktionalen Gruppen verwendet. Zu dieser Gruppe gehören das CFSE und die CellTrack™ Farbstoffe. Diese Farbstoffe können aufgrund ihrer Ladungsneutralität durch die Zellmembran diffundieren, werden durch intrazelluläre Esterasen funktionalisiert und binden dann an Thiolreste, hauptsächlich das Glutathion oder Methionin- bzw. Cysteinreste von Proteinen innerhalb der Zellen und können diese dann nicht wieder verlassen.

Zu Beginn der Färbungen lagen die GMZ in *fluorodishes* vor. Das Medium wurde durch Absaugen entfernt und durch eine 5 µM CellTracker™ Lösung in D10F+ ersetzt. Die Zellen wurden so für 60 min mit der CellTracker™ Lösung im Inkubator markiert. Hauptsächlich wurde in den Versuchen mit drei Fluoreszenzfarbstoffen das CellTracker™ blue CMAC eingesetzt. Bei Versuchen in denen nur zwei Fluoreszenzfarbstoffe verwendet wurden, wurden die Zellen auch mit CellTracker™ green CMFDA bzw. CellTracker™ red CMTPX markiert. Nach 60 min wurde die CellTracker™ Lösung entfernt, dreimalig mit PBS gewaschen und die Zellen mit frischem D10F+ überschichtet. Die Zellen wurden über Nacht weiter in Einzelkultur gehalten bis sie am nächsten Morgen zur Kokultivierung mit MP verwendet wurden.

5.13.2.2 Darstellung von Zellorganellen in glatten Gefäßmuskelzellen

Zellorganellen lassen sich in lebenden Zellen durch verschiedene spezifische Fluoreszenzfarbstoffe bzw. Fusionsproteine von an dieser subzellulären Struktur lokalisierter Proteine mit fluoreszenten Proteinen wie dem GFP, RFP oder mKate2 darstellen. Die Verwendung von Organell-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen beruht meist auf physikalischen Eigenschaften oder Enzymausstattungen der Zielorganellen. So beruht z.B. die Darstellung der aciden Lysosomen durch LysoTracker™ darauf, dass der Farbstoff unprotoniert membranpermeabel ist, jedoch in den Lysosomen durch den niedrigen pH-Wert protoniert wird. Der protonierte geladene LysoTracker kann dann nicht mehr durch die Membran der Lysosomen diffundieren und reichert sich daher in diesen an. Ein Beispiel, bei dem spezifische enzymatische Reaktionen genutzt werden, sind z.B. die MitoTracker™ Farbstoffe. Als eine sehr gute Informationsquelle für verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Anwendungen ist das *the Molecular Probes® Handbook* von lifetechnologies™ zu nennen.

Neben der Verwendung von Organell-spezifischen Farbstoffen kann man auch den Proteinbesatz der die Organellen vom Zytoplasma abgrenzenden Membran nutzen, um bestimmte Organellen in lebenden Zellen darzustellen. Als besonders nützlich für diese Studie haben sich dabei das LAMP-1 und die Ras-assoziierten Proteine der Rab-Familie erwiesen. Durch den Besitz mit den kleinen GTPasen der Rab-Familie, welche an der Sortierung von Membranvesikeln innerhalb der Zelle beteiligt sind, können daher Vesikel bestimmten Organellen, wie den frühen, späten und *recycling* Endosomen, dem Endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Netzwerk, zugeordnet werden (siehe auch Abbildung 6).¹⁰⁷⁻¹¹⁰

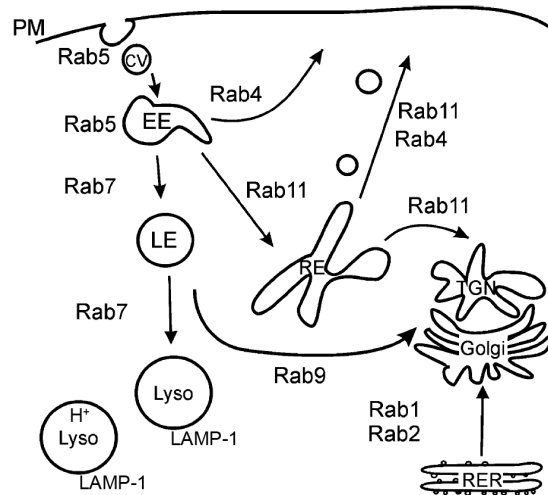


Abbildung 6: Modifizierte Karte der Lokalisation verschiedener Rab GTPasen nach Seachrist et al.¹¹⁰

Eine generelle vereinfachte Karte verschiedener membranöser Zellkompartimente, welche sich durch ihren unterschiedlichen Besitz durch Rab GTPasen charakterisieren lassen. Die Pfeile zeigen jeweils die Transportrichtung der Vesikel zwischen den Organellen. Von der Plasmamembran (PM) abgeschnürte Clatherin besetzte Vesikel (CV) und frühe Endosomen (EE) lassen sich durch ihren Besitz mit Rab5 kennzeichnen. Späte Endosomen (LE) sind durch Rab7 zu charakterisieren. Teilweise kann Rab7 zudem neben LAMP-1 auch auf der Membran von Lysosomen gefunden werden.¹⁰⁹ Recycling Endosomen (RE) zeichnen sich durch das Vorhandensein von Rab11 und Rab4 aus. Vesikel, die auf dem Weg vom rauhen Endoplasmatischen Retikulum (RER) Richtung Golgi-Apparat (Golgi) bzw. Trans Golgi Netzwerk (TNG) sind, können durch Rab1- und Rab2-Positivität beschrieben werden.

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Fluoreszenzsignalen des FL-acLDL in glatten GMZ u.a. wurde das Organelle Lights™ System erster, nicht mehr kommerziell erhältlicher, Generation von Invitrogen verwendet. Dabei handelt es sich um gebrauchsfertig präparierte Baculoviren, welche für Fusionsproteine aus verschiedenen Lokalisationsdomänen und fluoreszierenden Proteinen kodieren (siehe Abbildung 7).

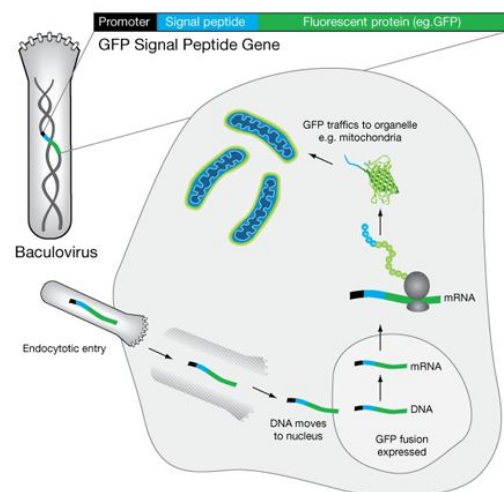


Abbildung 7: Funktionsprinzip der Organelle Lights™ (Quelle: www.invitrogen.com).

Das Baculovirus kodiert für einen eukaryotischen Promotor gefolgt von dem Zellorganell-spezifischen Signalpeptid und den fusionierten Fluoreszenzreporter, wie z.B. GFP. Nachdem das Virus die Zelle infiziert hat, wird die Virus-DNA in den Kern transportiert und dort in mRNA transkribiert. Durch die Translation in ein fluoreszentes Protein mit einem Organell-spezifischen Signalpeptid, reichert sich der Reporter in dem Organell an, so dass man dieses fluoreszenzmikroskopisch darstellen kann.

Zur Infektion der glatten GMZ mit dem Baculovirus wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann entsprechend eines *down scale* Ansatzes der Herstellerangaben mit 363 μl Organelle Lights™ Lösung, welche das Virus enthält, in 636 μl PBS infiziert. Die Zellen wurden während der Infektion für 1 h auf einem Wippschüttler bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Nach der Infektion wurde das Virus durch Absaugen entfernt und durch frisches angewärmtes D10F+ ersetzt. Dem Medium wurde dann für 1,5 h ein *enhancer*, bzw. der Kofaktor für einen *enhancer*, hinzugefügt, welcher nach der Inkubation bei 37 °C, 95% rel. Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ (v/v) durch einen weiteren Mediumwechsel wieder entfernt wurde. Die Zellen wurden über Nacht im Inkubator kultiviert, um den GMZ Zeit zur Expression der Fusionsproteine zu geben. Am folgenden Morgen wurden die GMZ dann mit einem CellTracker™ Farbstoff gegengefärbt und die Kokultur mit FL-acLDL markierten MP durchgeführt. Die Infektion für alle verwendeten Viren wurde immer gleich durchgeführt. Die verwendeten Varianten sind der Tabelle 5.8 zu entnehmen.

Tabelle 5.8: Verwendete Organelle Lights™ Viren:

Organelle Lights	Fusionsprotein, Markiertes Zellkompartiment
Endosomes-GFP	Ras-related protein 5a-GFP, Frühe Endosomen
Lysosomes-RFP	lysosomal associated membrane protein 1-RFP, Lysosomen
Golgi-GFP	Humanes Golgi-resident enzyme Nacetylgalactosaminyltransferase-2-GFP, Golgiapparat
Mito-GFP	Anfangssequenz der E1 α Pyruvate dehydrogenase-GFP, Mitochondrien
Peroxi-GFP	Peroxisomale C-terminale Transportsequenz-GFP, Peroxisomen

5.14 Färbungen an Kokulturen

Zur Auswertung der Kokulturen und zum Bestimmen der funktionalen Veränderungen durch die Kokultur wurden verschiedene Färbungen und zellbiologische Experimente mit den Kokulturen durchgeführt. Die Durchführung wird im Folgenden einzeln aufgeführt.

5.14.1 Darstellung der Lipidtröpfchen mittels Oil-Red-O-Färbung

Die für die Kokultur verwendeten Glasbodenschälchen wurden nach dem Waschen mit PBS für 10 min mit einer frisch angesetzten 3% Formalinlösung/PBS-Lösung (w/v) fixiert. Nach einem nochmaligen Waschen und Entwässern mit einer 60%igen ethanolschen Lösung wurden die Lipidtröpfchen mittels Inkubation mit einer frisch angesetzten Oil-Red-O-Lösung (3,5 mg/ml in 70% Ethanol) angefärbt. Nach viermaligem Waschen mit PBS erfolgte die mikroskopische Dokumentation.

5.14.2 Fluoreszenzbasierter Nachweis der Lipidtröpfchenbildung

Aufgrund der schlechten Quantifizierbarkeit von Farbbildern, wie sie bei der Oil-Rot Färbung entstehen, wurde zusätzlich eine Möglichkeit gesucht, um Fluoreszenz-basiert die Zunahme an *lipid droplets* in den glatten GMZ darzustellen. Dies erfolgte durch die Verwendung von HCS LipidTOX™ *green neutral lipid stain* Lösung. Diese Lösung ist eine 1000x konzentrierte Stammlösung mit einem Fluoreszenzfarbstoff in DMSO, welcher sich aufgrund seines eigenen hydrophoben Charakters in neutrale Lipide einlagert, und so neutrale *lipid droplets*, in denen auch das Cholesterin gespeichert wird, fluoreszenzmarkiert.

Die Färbung der *lipid droplets* fand an Kokulturen, bestehend aus CellTracker™ blue - gefärbten glatten GMZ, welche mit FL-acLDL-geladenen MP für 14 Tage kokultiviert wurden, statt. Die Lösung wurde dem Medium der Kokulturen in einfacher Konzentration, also 1 µl/ml D10F+, zugefügt. Die Kokulturen wurden so noch für 1 h im Inkubator bei 37 °C, 95% rel. Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ (v/v) kultiviert. Es folgte die fluoreszenzmikroskopische Dokumentation.

Nicht FL-acLDL positive glatte GMZ dienten hierbei als interne Kontrolle zu den GMZ, die FL-acLDL vom MP erhalten hatten. Es wurden pro n jeweils 10 zufällig

ausgewählte LDL positive und 10 FL-acLDL negative Zellen dokumentiert. Die Bilder wurden dann der Bildsegmentierung und einer semi-automatischen Auswertung unterworfen.

5.15 Messung der Phagozytoseaktivität glatter Gefäßmuskelzellen

Zur Messung der Phagozytoseaktivität nach Hook und Odeyale^{111, 112} wurden die glatten GMZ, wie unter 5.12.5 Re-Isolation kokultivierter glatter Gefäßmuskelzellen beschrieben, nach 14 Tagen aus den Kokulturen re-isoliert. Den re-isolierten glatten GMZ wurden dann fluoreszenzmarkierte Latex *beads* (Fluoresbrite® *beads*) mit einem Durchmesser von 0,5 µm in einer Endkonzentration im Zellkulturmedium von $3,5 \times 10^6$ Partikel/ml angeboten. Die Zellen wurden so für 6 h bei 37 °C, 95% rel. Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ (v/v) inkubiert.

Nicht phagozytierte *beads* wurden durch fünfmaliges Waschen der Kulturen mit erwärmtem PBS entfernt und das PBS am Ende durch D10F+ ersetzt. Die Zellen wurden daraufhin am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. Je n wurden jeweils 30 FL-acLDL positive, bzw. negative, zufällig ausgewählte GMZ dokumentiert. Analog dem Nachweis der Lipidtröpfchenbildung wurden FL-acLDL negative glatte GMZ als interne Kontrolle genutzt. Die Bilder wurden mittels ImageJ segmentiert und quantifiziert.

5.16 Mikroskopie, Bildverarbeitung und Darstellung

5.16.1 Mikroskopie

Für die mikroskopische Dokumentation wurden hauptsächlich die beiden inversen Weitfeld-Mikroskopsysteme Zeiss Axiovert 100 (Arbeitsgruppe: Labor für Experimentelle und Molekulare Kardiologie; Professor Dr. med. Strasser, Technische Universität Dresden) und Zeiss Axiovert 200m (Arbeitsgruppe: Experimentelle Kardiologie; Professor Dr. med. Braun-Dullaeus, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg) verwendet.

Das Axiovert 100 war zusätzlich mit einem PIFOC Piezoelement getriebenen Fokuselement ausgerüstet, welches es ermöglichte, schnelle Z-Stapel verschiedener Fluoreszenzfilter nacheinander aufzunehmen. Das voll motorisierte Axiovert 200m war zusätzlich mit einer sog. *life-cell-imaging box* versehen, so dass man Zellen über längere Zeit unter Kulturbedingungen auf dem Mikroskop beobachten konnte.

Außerdem wurde auch das *point scanning confocal LASER scanning microscope* (psCLSM), Leica TCS SP5 der *MTZ imaging light microscopy facility* stundenweise angemietet, um Ergebnisse der dreidimensionalen Mikroskopie, Weitfeld Z-Stapel mit anschließender Dekonvolution, zu verifizieren.

5.16.1.1 *time-lapse* Mikroskopie

Die Motorisierung und Ausstattung des Axiovert 200m mit einem sog. *cage incubator* machte es möglich, sog. *time-lapse* oder Zeitraffer *life-cell* Mikroskopie der Kokulturen anzufertigen. Aufgrund von Vorversuchen lag die Vermutung nahe, dass es sich nicht, wie zunächst vermutet, um eine Transdifferenzierung von MP in glatte GMZ, sondern um einen Transportprozess des FL-acLDL aus den MP in die glatte GMZ handelt. Diese neue Hypothese basierte auf Einzelaufnahmen von GMZ aus GFP-positiven Mäusen, Aufnahmen unter der Verwendung von fluoreszierenden beads, aber auch die in Dresden noch relativ einfach durchgeführte wiederholte Mikroskopie markierter Stellen.

In Vorversuchen wurden die entsprechenden mikroskopischen Parameter, wie Bildwiederholfrequenz, die optische Auflösung, Reduktion des phototoxischen Stresses sowie andere Fehlerquellen dieser relativ anspruchsvollen und sensiblen mikroskopischen Technik erprobt. Einen guten Überblick über eventuell auftretende Probleme, notwendige *hardware* und einige Lösungsansätze bieten hierbei die Arbeiten von Khodjakov et al. und Stephens et al. sowie die durch die Firma Nikon betriebene Internetseite MicroscopyU.com.^{113, 114}

5.16.1.2 Dreidimensionale Mikroskopie

Im Verlauf des Projekts wurde es immer wichtiger, die Lokalisation von Fluoreszenzsignalen bei der Fluoreszenzmikroskopie auch in die dritte Dimension zu erweitern. Dies ist vor allem zur intrazellulären Lokalisation von Fluoreszenzsignalen und für Kolokalisationsanalysen notwendig gewesen.

Um Objektive mit hoher numerischer Apertur, also optischem Auflösungsvermögen, verwenden zu können, wurde die Kokultur, wie zuvor in 5.12.4 Kokulturen in Glasbodenschälchen beschrieben, auf Glasbodenschälchen umgestellt. Durch den in die Zellkulturfläche eingelassenen Glasboden in Deckgläschenstärke ist die Verwendung von Objektiven mit Immersionsöl möglich. Diese Objektivklasse zeichnet sich baulich bedingt durch eine deutlich höhere Apertur als

Trockenobjektive aus, was zu einem höheren Auflösungsvermögen in allen Dimensionen führt. Es wurden für die dreidimensionale Mikroskopie ausschließlich Objektive des Typs Neofluar bzw. Achromat verwendet, welche über eine gute, bzw. bestmöglich, spektrale Korrektur über das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichts sowie Bildfeldebnung verfügen.

Das größte Problem in der dreidimensionalen Fluoreszenzmikroskopie liegt in dem sog. *out-of-focus* Licht, welches durch das Anregen von Fluoreszenzfarbstoffen außerhalb der fokussierten Ebene entsteht. Es wurde in den vergangenen Jahren durch die Entwicklung verschiedener mikroskopischer Verfahren und Bildverarbeitungen, wie dem *point scanning* CLSM (psCLSM), dem *spinning disc* CLSM (sdCLSM), der Zwei-Photonen Anregung, der strukturierten Beleuchtung und der Dekonvolution versucht, dieses Problem zu minimieren. Alle diese Systeme bieten gewisse Vor- und Nachteile, so dass man keines dieser Verfahren als Lösung jeglicher Probleme ansehen kann,^{115, 116} sondern die Wahl des mikroskopischen Verfahrens stark von der Fragestellung und Probe abhängt. Die Vor- und Nachteile lassen sich, wie in Tabelle 5.9 gezeigt, zusammenfassen.

Tabelle 5.9: Zusammenfassung der Vor- und Nachteile verschiedener mikroskopischer Verfahren.

Zusammengefasst nach Rizzuto et al. und Ronneberger et. al.^{117, 118}

Mikroskoptyp	psCLSM	sdCLSM	2-Photonen Anregung	Strukturierte Beleuchtung	Weitfeld + Dekonvolution
Auflösung in XY (nm)	210	230	250	130	250
Auflösung in Z (nm)	550	600	650	350	650
Sensitivität	mäßig	mäßig	schlecht	gut	gut
photodamage	mäßig	mäßig	out-of-focus:	mäßig	gut
photobleaching	schlecht		gut		
			in-focus:		
			schlecht		
Geschwindigkeit	schlecht	gut	schlecht	mäßig	gut
Preis	hoch	hoch	hoch	mäßig	gut
Variabilität der Systeme	mäßig	schlecht	schlecht	gut	gut

Für meine Fragestellung an lebenden Zellen stellte sich die Kombination aus Weitfeld- oder auch Epi-Fluoreszenz Z-Stapeln und anschließender Dekonvolution als beste Lösung heraus. Viele Ergebnisse wurden zusätzlich mittels psCLSM überprüft. Dabei wurden aber die Probleme eines psCLSM mit starkem Photobleaching, eine niedrige Sensitivität bei gering gefärbten Proben, aber vor allem die geringe zeitliche Auflösung offensichtlich.

5.16.1.2.1 Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie für die anschließende Dekonvolution

Das verwendete Axiovert 100 System in Dresden bot die Möglichkeit mittels des installierten Piezoelements Z-Stapel der verwendeten Fluoreszenzfarben nacheinander aufzunehmen. Die Kontrolle des Piezoelements und der Kamera erfolgte durch MetaVue Version 7.1 von Molecular Devices, LLC. Das Fehlen eines sog. *shutters*, ein elektronischer Verschluss vor der Fluoreszenzlichtquelle, fiel aufgrund der schnellen Fokuseinstellung des Piezoelements kaum ins Gewicht und konnte vernachlässigt werden.

Der gewählte Modus, jeden Z-Stapel komplett aufzunehmen und erst dann den Fluoreszenzfilter zu wechseln, birgt aber die Gefahr, dass es zu Fokussdifferenzen zwischen zwei Z-Stapeln oder zur Bewegungen innerhalb der beobachteten Zelle zwischen zwei Stapeln kommt.

Der Vorteil gegenüber dem permanenten Wechsel zwischen verschiedenen Fluoreszenzfiltern, wie dies am Axiovision Version 4.8 kontrollierten Axiovert 200m in Magdeburg möglich war, und einem erst dann folgenden Fokusschritt liegt in der schnellen Bildfolge zwischen zwei Fokusschritten, da diese zu einem besseren Ergebnis nach der Dekonvolution führt. Die Wahl, welcher Bildaufnahmemodus, also Z-Schritt vor Kanaländerung oder Kanaländerung vor Z-Schritt, günstiger ist, hängt stark von der Probe, Fragestellung und den erreichten Belichtungszeiten bzw. der Sensitivität und Schnelligkeit der Systemeinstellungen ab.

Auf beiden Axiovert-Systemen wurde entsprechend dem Nyquist-Shannonsche-Abtasttheorem mit einem sog. *over-sampling* im Vergleich zum optischen Auflösungsvermögen der verwendeten Objektiv gearbeitet. Bei der Aufnahme der Z-Stapel wurde auf die Einhaltung der in der Literatur beschriebenen Vorgehensweisen bzw. Einstellungsparameter geachtet.^{115, 118-120}

Da es in Dresden an dem Axiovert 100 nicht die Möglichkeit gab, Zellkulturbedingungen zu schaffen, wurden die lebenden Zellkulturen für die

Mikroskopie nur kurz dem Inkubator entnommen und nach 45 min durch ein Duplikat ersetzt. Dieses Vorgehen sollte Schäden durch die fehlenden Umweltbedingungen während der Mikroskopie und damit den Eingriff in die Zellphysiologie minimieren.

5.16.1.2.2 Aufnahme experimenteller *point spread functions*

Die *point spread function* (PSF) beschreibt die Parameter eines optischen Systems für ein punktförmiges Objekt, bzw. im Falle der Fluoreszenzmikroskopie einer Punktlichtquelle, und beinhaltet wichtige Informationen über das verwendete optische System, die für die spätere Dekonvolution benutzt wurden. Für die Aufnahme von PSF werden in der Regel *quantum dots* oder fluoreszierende *beads* verwendet, deren Größe unter der Auflösungsgrenze des Mikroskops liegt.

Unter Verwendung des *PS-Speck Microscope Point Source kit* wurden in Glasbodenschälchen Präparate aus blau, grün und rot fluoreszierenden *beads* angefertigt. Die Größe der *beads* lag bei 175 ± 5 nm. Sie wurden mit Deckgläschen und Eindeckmedium mit einer Brechzahl von 1,33, welche dem verwendeten wässrigen Zellkulturmedium entspricht, eingedeckt. Die Aufnahme der PSF erfolgte analog zu den Aufnahmen der jeweiligen Kulturen.

Zur Qualitätskontrolle der verwendeten Weitfeld-Mikroskopie-Systeme wurden zusätzlich regelmäßig Z-Stapel mehrfach fluoreszierender *beads TetraSpeck™* verwendet. Bei richtiger Ausrichtung aller optischen Komponenten ist hierbei eine Kolo-kalisation zu erwarten. Zudem können größere runde *beads* als bekannte Form und damit als Hilfsmittel zur Qualitätssicherung bei der Dekonvolution benutzt werden.¹¹⁵

5.16.1.2.3 Dekonvolution

Wie schon erwähnt, ist das Reduzieren des Streulichtes aus den *out-of-focus* Ebenen Grundlage für dreidimensionale Bildbearbeitungsschritte wie der Rekonstruktion und damit Lokalisation von Fluoreszenzsignalen in der dreidimensionalen Mikroskopie. Der der dreidimensionalen Mikroskopie zugrunde liegende dreidimensionale Datensatz wird hierbei aus zweidimensionalen Bildern unterschiedlicher Fokusebenen generiert. Die sog. Pixel bzw. *picture elements* werden dadurch zu sogenannten *voxel*, die nun nicht mehr den kleinsten Teil einer Fläche, sondern eines Volumens repräsentieren. Der Stapel zweidimensionaler Bilder enthält nun auch die gesamte dreidimensionale Information. Allerdings

entspricht, wie bei der zweidimensionalen Mikroskopie, auch das Abbild nicht dem Objekt, da bei der Mikroskopie nicht das Objekt betrachtet wird, sondern ein durch das optische System generiertes virtuelles Bild betrachtet bzw. aufgenommen wird. Das virtuelle Bild des Objektes wird dabei durch das optische System verzerrt. Das Objekt wird dabei durch die PSF des optischen Systems gefaltet (engl. *convolved*). Durch die Kenntnis der Faltung, also die experimentelle Aufnahme oder theoretische Errechnung der PSF, kann die Verzerrung mathematisch daher nahezu vollständig rückgängig gemacht werden. Die Abbildung wird mit der PSF entfaltet und damit in die ursprüngliche Form des Objektes zurück rekonstruiert. Diese Entfaltung nennt man Dekonvolution.

In den letzten Jahren wurden von diversen Arbeitsgruppen und Softwareherstellern verschiedene mathematische Algorithmen zur Dekonvolution und Bildverbesserung von mikroskopischen Bildern vorgestellt. Einen Überblick über die verschiedenen Algorithmen, deren Stärken und Schwächen, liefern Sarder und Nehorai, aber auch McNally et al.^{115, 121}

Die einfachste Variante zur Bildverbesserung von Fluoreszenzaufnahmen sind die *no neighbor* und *nearest neighbor* Filter. Bei einem *nearest neighbor* Filter handelt es sich jedoch nicht um eine echte Dekonvolution, sondern um die Reduktion von Bildrauschen aus dem ursprünglichen Bild ohne Berücksichtigung der umgebenen Bildebenen. Berücksichtigt werden jedoch die Wellenlänge des verwendeten Lichtes und die Objektivparameter, die zur Bildung einer theoretischen PSF herangezogen werden. Der Filter berücksichtigt bei der Bildverbesserung entweder nur das aktuell vom Filter betrachtete Pixel im Falle des *no neighbor* Filters bzw. die umgebenden Pixel im Falle des *nearest neighbor* Filters und entscheidet dann anhand einer Klassifizierung, ob das Pixel in seiner Intensität verstärkt oder verringert werden soll. Diese Methoden zeichnen sich vor allem durch ihre hohe Geschwindigkeit aus, führen aber nicht in allen Fällen zu einem akzeptablen Ergebnis. Das Durchführen eines *nearest neighbor* Filters bei einer Bilddatei von 88 MB dauerte auf dem verwendeten Rechner etwa 1,5 min. Bildverarbeitungen mittels *nearest neighbor* Filter wurden mit der MetaMorph 6.4.1 Software durchgeführt.

Außerdem wurde über mehrere Testlizenzen, die Huygens 3.1 Software von *Scientific Volumen Imaging* zur Dekonvolution der Z-Stapel einsetzt. Es wurde hierbei sowohl mit experimentell gewonnenen als auch mit theoretischen PSF gearbeitet. Diese Software arbeitet über die Iteration eines Algorithmus, der eine statistische Bewertung der Voxel durchführt, um die Dekonvolution zu erreichen. Die Ergebnisse der Huygens Dekonvolutionen waren in der Regel besser als die

Ergebnisse des *nearest neighbor* Filters. Nachteil dieser Methode ist die relative Länge der Rechenzeit von ca. 30 min für einen 88 MB Bilderstapel. Zudem wurde das Konkurrenzprodukt AutoQuant X2 der Firma MediaCybernetics ausprobiert. Der Vorteil der dort hinterlegten sog. *blind deconvolution* liegt darin, dass die PSF direkt aus dem Bilderstapel extrahiert wird. Dies setzt aber voraus, dass das beobachtete Objekt nicht zu flächig ist. Insgesamt wurde aufgrund der guten Ergebnisse überwiegend mit Huygens 3.1 gearbeitet.

Als Test der Güte eines Dekonvolutionsprogramms wurden fluoreszierende *beads* als Probe bekannter Form verwendet und diese mit sich selber oder einer separat aufgenommenen PSF verrechnet.

5.16.1.2.4 Konfokale LASER scanning Mikroskopie

Zur Kontrolle der am Axiovert 100 erhaltenen Ergebnisse der Weitfeld Z-Stapel mit anschließender Dekonvolution wurden diese an dem Leica TCS SP5 der *MTZ imaging - light microscopy facility* verifiziert. Dieses System bot wesentlich flexiblere Aufnahmebedingungen bezüglich verwendeter Fluoreszenzfilter und Auflösung als die beiden benutzten Weitfeld-Systeme.

Alle Aufnahmen wurden mit den vorhandenen 40x/1.3 Oil oder 63x/1.4 Oil apochromatischen Objektiven gemacht. Die flexible Konfiguration kam durch die Verwendung des *acousto-optical beam splitter* und durch die Detektion durch ein Prismenspektralphotometer zustande. Dieser Aufbau ließ eine wellenlängengenaue Einstellung auf die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe zu. Zur Anregung wurden die 405 nm LASER Diode, ein 488 nm Argon LASER und ein 594 nm HeNe LASER verwendet. Die *sampling rate* der Voxel wurde entsprechend der optischen Auflösung angepasst und die Geschwindigkeit der parallelen LASER Scans lag in der Regel bei 200 MHz. Trotzdem gelang es nicht immer, die Bewegungen der Organellen einzufrieren, da beim CLSM die Aufnahme eines Z-Stapels ca. 6 min dauerte. Im Vergleich dazu benötigte z.B. das Axiovert 200m System ca. 90-120 s für einen Z-Stapel eines vergleichbaren Volumens mit drei nacheinander detektierten Fluoreszenzfarben.

5.16.2 Bildverarbeitung und Darstellung

Die Bilder wurden aufgrund der verschiedenen Bilddateiformate und Möglichkeiten der einzelnen Bildverarbeitungsprogramme den aktuellen Aufgaben angepasst

Programmen verarbeitet. Es kamen dabei die LAS AF lite Version 2.6 von Leica, die Huygens essential Version 3.1 von SVI, die MetaMorph Version 6 und MetaVue Version 7 von Molecular Devices und ImageJ, das freie Java basierte Programm des National Institutes of Health in der *plug-in* Zusammenstellung des European Molecular Biology Laboratory in der Version f mit der manuellen Nachinstallation einzelner *plug-ins* in der Version 1.45p zum Einsatz (siehe auch Tabelle 5.10).

Tabelle 5.10: Häufig genutzte Bildverarbeitungsschritte und die dazu verwendeten Programme und *plug-ins*

Genutzte Verarbeitung	Genutztes Programm	Genutztes Funktion / <i>plug-in</i> autor
Export von CLSM Daten	LAS AF lite	Export und Trennung der einzelnen Kanäle
Aufbau und Annotation von Bildstapeln	MetaMorph und ImageJ EMBL f	Stack bulding
<i>nearest neighbor</i> Filter	MetaMorph	Dekonvolution mittels <i>nearest neighbor</i>
Dekonvolution	Huygens essential, Huygens essential batch processor und AutoQuant X2	Dekonvolution mittels experimenteller und theoretischer PSF
Merge von verschiedenen Fluoreszenzaufnahmen und Stapeln	MetaMorph und ImageJ EMBL f	Color align
Binäre Bildumwandlung / Threshold	ImageJ EMBL f	Threshold
Trennen von Partikeln zum Zählen	ImageJ EMBL f	Watershed Filter von Daniel Sage
Halbautomatisches Zählen 2D	ImageJ EMBL f	Analyze particles
Halbautomatisches Zählen 3D	ImageJ EMBL f	3D Object counter von Jonathan Jackson
Darstellen orthologer Ebenen	MetaMorph und ImageJ EMBL f	View ortholgical planes bzw. reslice
Dreidimensionale Darstellungen	MetaMorph und ImageJ EMBL f	3D reconstruction und Image 3D viewer von Benjamin Schmid und Johannes Schindelin
Kolokalisationsanalyse	ImageJ EMBL f	Image correlator von Wayne Rasband und Kevin Baler JACoP von Fabrice P. Cordelières und Susanne Bolte
Skalieren der Bilder und Z-Stapel	MetaMorph und ImageJ EMBL f	Calibration, Z-scale und microscope scale in der Version von Paul Baggethun und von mir entsprechend unserer Optiken editiert
Kontrast- und Helligkeitskorrekturen zur Darstellung	MetaMorph und ImageJ EMBL f	Adjust gamma, brightness and contrast

5.17 Molekularbiologische Methoden

5.17.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte unter Verwendung des *Invisorb® SpinCell RNA Mini kits* analog zum Protokoll des Herstellers. Nach der Lyse der Zellen durch einen Hochsalzpuffer wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Die RNA-Isolation erfolgte später durch das Aufgeben des Puffers auf eine DNA-bindende Säule. Das Eluat wurde anschließend mit EtOH versetzt und auf eine RNA-bindende Säule gegeben. Nach mehreren Waschschritten wurde die RNA mit Elutionspuffer von der Säule eluiert. Um eine RNA-Degradation zu verhindern, wurde dem Eluat 10 U RNase-Inhibitor (Fermentas GmbH) zugefügt. In verdünnten Aliquots der RNA wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt und die RNA dem Umschreiben in cDNA zugeführt. Um eventuelle DNA-Reste, welche zu falschen Messungen in der *real-time* PCR führen können, zu entfernen, wurden die Proben einer einstündigen DNaseI-Behandlung (Promega GmbH) unterworfen. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die DNaseI-Behandlung sind der Tabelle 5.11 zu entnehmen. Die DNaseI wurde anschließend durch die Zugabe von 1 μl DNase-Stop-Lösung und einer Hitzeinaktivierung von 10 min bei 65 °C inaktiviert.

Tabelle 5.11: Zusammensetzung der DNase-Verdau Reaktionsansätze

Komponente	Menge
RNA (aus der RNA-Isolation)	x μl (1 μg) Total RNA
5x Reaktionspuffer	2 μl (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT)
DNaseI	1 μl (1 U/ μl)
DEPC-Wasser	y μl (ad 10 μl)

5.17.2 cDNA-Synthese

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die cDNA-Synthese sind der Tabelle 5.12 zu entnehmen. Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung des *First Strand cDNA Synthesis Kit*. Es wurden die Reaktionsansätze aus der DNaseI-Behandlung nach der Zugabe von Oligo-dT-Primern für 5 min bei 70 °C erhitzt. Dies dient dem Aufschmelzen evtl. vorhandener RNA-Sekundärstrukturen. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt. Hierbei lagern sich die Oligo-dT-Primer an das Poly-desoxy-Adenosin-Ende der mRNA an. Anschließend

wurden die übrigen Komponenten des cDNA-Synthese-Reaktionsansatzes hinzugefügt. Vor der Zugabe der Reversen Transkriptase wurden die Reaktionsansätze für 5 min bei 37 °C vorgewärmt. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Zugabe der Reversen Transkriptase bei 42 °C für 60 min. Die Reaktion wurde danach durch Hitzeinaktivierung für 10 min bei 70 °C abgestoppt. Für die anschließende *real-time* PCR wurden die cDNA Proben auf 25 ng/µl verdünnt.

Tabelle 5.12: Zusammensetzung der cDNA-Synthese Reaktionsansätze

Komponente	Menge
RNA (aus der DNaseI-Behandlung)	11 µl (bzw. 1 µg)
Oligo(dT) ₁₈	1 µl (100 µM)
5x Reaktionspuffer	2 µl (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT)
dNTP	2 µl (10 mM)
RiboLock™ RNase Inhibitor	1 µl (20 U/µl)
DEPC-Wasser	2 µl
M-MuLV Reverse Transcriptase	0,7 µl (20 U/µl)

5.17.3 *real-time* PCR

Zur spezifischen Quantifizierung der RNA-Menge in den Proben, welche auf das Expressionsniveau verschiedener Gene schließen lässt, wurde eine *real-time* PCR eingesetzt. Die von mir gewählte Detektionsmethode beruht auf der Zugabe von *SYBR Green*, einem Fluoreszenzfarbstoff, welcher in DNA-Doppelstränge interkaliert und dann seine maximale Fluoreszenzintensität erreicht. Freies *SYBR Green* ist nur schwach fluoreszent. Die Fluoreszenz Menge verhält sich dabei proportional zur DNA-Menge, sodass eine Intensitätsmessung des Lichtes Aufschluss über die im Reaktionsansatz vorhandene PCR-Produkt Konzentration gibt. Nach jedem PCR Zyklus wurde das *SYBR Green* im *PCR-cycler* mittels eines entsprechenden Filtersatzes angeregt und die Intensität des abgestrahlten langwelligeren Fluoreszenzlichtes als Maß der DNA-Menge gemessen. Um nun zwei Proben miteinander vergleichen zu können, wurde ein relativer Abgleich des Gens des Interesses auf ein Haushaltsgen in derselben Probe in der exponentiellen Phase der PCR nach Livak und Schmittgen gemacht.¹²² Bei stark unterschiedlicher Effizienz der verwendeten Primer (mehr als 5%) wurde die Methode nach Pfaffl zur Auswertung angewendet, welche unterschiedliche Primereffizienzen ausgleicht.¹²³ Die PCR wurde für jede Probe und jedes Primerpaar in Doppelbestimmung durchgeführt. Es wurde für jedes Primerpaar jeweils eine RNA und Wasser-Kontrolle (als sog. *non template control*) anstatt der cDNA mitgeführt, um evtl. DNA-Verunreinigungen

ausschließen zu können. Die genaue Zusammensetzung der *real-time* Reaktionsansätze ist aus der Tabelle 5.13 zu entnehmen. Das eingesetzte FITC diente hierbei einer initialen Korrektur der einzelnen Fluoreszenzintensitäten über verschiedene Bereiche der PCR-Platte. Dieses Bild wurde dann durch die Software wie eine *shading*-Korrektur in der Mikroskopie bei der Datenaufnahme hinterlegt. Das oben angesprochene *SYBR Green* ist Bestandteil des Quantitect SYBR Green PCR Kits und im Reaktionsmix enthalten. Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit Hilfe der iCyclerTMI Optical System Software Version 3.0 (Dresden) bzw. BioRad CFX-Manager™ (Magdeburg) von BioRad.

Tabelle 5.13: Zusammensetzung der *real-time* PCR-Reaktionsansätze

Komponente	Endkonzentration in 20 µl	Menge
cDNA (25 ng/µl) bzw	50 ng	2 µl
Primermix (5 pmol/µl je Primer)	10 pmol	2 µl
2x PCR Reaktionsmix	1x	10 µl
FITC (1µM)	10 nM	0,2 µl
H ₂ O		5,8 µl

Die Reaktion wurde im iCycler bzw. CFX96 wie folgt (siehe Tabelle 5.14) durchgeführt.

Tabelle 5.14: *real-time* PCR-Temperaturverlauf

PCR-Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenanzahl (Wiederholungen)
FITC Abgleich, initiale Denaturierung und Aktivierung der DNA-Polymerase	13 min	95 °C	1
Denaturierung	20 s	95 °C	40
Annealing	30 s	58 °C	
Elongation	30 s	72 °C	
Abschließende Elongation	2 min	72 °C	1
Schmelzkurvenbestimmung	4 s	60-96 °C	90 Zyklen mit einer Erhöhung um 0,4°C
Kühlung	∞	4 °C	

Das Aufnehmen einer Schmelzkurve der PCR-Produkte ermöglichte es, evtl. amplifizierte Nebenprodukte zu erkennen. Alle verwendeten Primer wurden *in-silico* und in Vorversuchen intensiv untersucht. Es wurde anhand von Verdünnungsreihen einer Positivkontrolle die Effizienz für jedes Primerpaar bestimmt und die Schmelztemperatur des Produktes gemessen. Das entsprechende Produkt wurde in einer nachfolgenden Gelelektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt um sicher

zu stellen, dass die erwartete Größe erreicht wurde. Zusätzlich wurden die Produkte, soweit möglich, mittels Endonukleasebehandlung darauf überprüft, dass die richtigen Verdauungsprodukte, welche *in-silico* ermittelt wurden, entstehen. Dies diente der zusätzlichen Absicherung, dass das gewollte Produkt entstanden ist. Alle Informationen zu den verwendeten Primerpaaren sind der Tabelle 5.4 zu entnehmen.

Zu Beginn des Projektes wurde von einer Transdifferenzierung der humanen Monozyten bzw. MP in glatte GMZ ausgegangen. Um dieses neben der Fluoreszenzmikroskopie mit einer zweiten unabhängigen Methode zu untersuchen, wurden Primerpaare zur Untersuchung des Expressionsniveaus GMZ-typischer Gene *in-silico* designt. Das Problem bei der Analyse einer Kokultur besteht natürlich darin, dass man bei einfacher RNA-Lyse nicht bestimmen kann, welcher der beiden Zellpopulationen die Expression zuzuordnen ist. Daher wurden xenogen zusammengesetzte Kokulturen verwendet. Durch die Verwendung von Ratten GMZ und humanen MP und jeweils Spezies-spezifischen Primerpaaren wurde dieses Problem gelöst.

Diese Primerpaare dienen alle dem Nachweis spezifischer *splice*-Varianten GMZ-typischer zytoskelettaler Gene. Da sich die zu untersuchenden humanen Monozyten bzw. MP in einer Kokultur mit Ratten GMZ befanden, wurden die Bindungsorte der Primer auf der cDNA so gewählt, dass sie Spezies-spezifisch für den Menschen waren und keine Produkte mit den ebenfalls in dem cDNA-Gemisch vorhandenen Rattentranskripten entstehen konnten. Die Spezifität der Primerpaare für humane cDNA wurde bei jedem PCR-Lauf durch entsprechende Kontrollen, die nur aus cDNA einer Spezies bestanden, abgesichert.

In einer zweiten Serie, nachdem eine Transdifferenzierung ausgeschlossen werden konnte und der Übergang von FL-acLDL aus den MP in die glatten GMZ lichtmikroskopisch gesichert werden konnte, sollte die transkriptionelle Veränderung der GMZ durch die LDL/Cholesterol Stimulation beschrieben werden. Hierfür wurden wieder xenogen zusammengesetzte Kokulturen benutzt. Es wurden Primerpaare designt, die nun Spezies-spezifisch für Ratte waren. Untersucht wurden die von Rong et al. beschriebenen Cholesterol-sensitiven Gene in glatten GMZ.⁸² Auch hier wurde humane cDNA als zusätzliche Kontrolle mitgeführt, um die Spezifität für Rattentranskripte für jeden Lauf zu bestätigen.

5.18 Gentechnische Methoden

Grundlegende gentechnische Methoden wurden nach den Beschreibungen von Ausubel et al. und Sambrook et al. durchgeführt.^{124, 125}

5.18.1 Extraktion und Fällung von DNA

Zur Inaktivierung von Proteinen und Aufreinigung der DNA aus Lösungen wurden Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Fällungen durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 v/v/v) versetzt und das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert. Zur Phasentrennung wurde die Probe für 5 min bei 4 °C und 13 000xg zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Versetzen des Ansatzes mit 1/10 Volumenteil 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumenteilen 100%igem eiskaltem EtOH. Nach Zentrifugation (10 min, 13 000xg, 4 °C) wurde das DNA-Pellet mit 70%igem EtOH gewaschen, zentrifugiert und nach dem Trocknen in TE-Puffer oder Wasser aufgenommen.

5.18.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten, Plasmiden und PCR-Produkten erfolgte je nach erwarteter DNA-Länge bzw. Anwendung in 0,8 - 2%igen (w/v) Agarosegelen in 1x TAE-Puffer, versetzt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen 6x *Orange DNA Loading Dye* (Fermentas) versetzt und im elektrischen Feld bei 10 V/cm in 1x TAE Puffer aufgetrennt. Zur Interpretation wurden je nach erwarteter DNA-Länge verschiedene DNA-Leitern (Fermentas) mitgeführt. Die Dokumentation erfolgte in einem Agarose-Gel-Dokumentationssystem bei UV-Transillumination.

5.18.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten und Plasmiden aus Agarose-Gelen

Die Isolation von DNA aus ausgeschnittenen Agarosegel-Stücken erfolgte unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kit* nach Herstellerangaben.

5.18.4 Restriktionsendonuklease-Reaktionen

Für Endonuklease-Reaktionen wurde folgender Reaktionsansatz (siehe Tabelle 5.15) bzw. ein Vielfaches hiervon, verwendet:

Tabelle 5.15: Zusammensetzung der Endonuklease-Reaktionsansätze

Komponente	Menge
DNA (0,5-20 µg)	x µl
Restriktionsendonuklease (10 U/µl)	0,5-1 µl
10x Reaktionspuffer	1 µl
10x BSA (optional bei NEB-Enzymen)	1 µl
H ₂ O	ad 10 µl

Es wurde jeweils der vom Hersteller empfohlene Puffer mit höchster Aktivität verwendet. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte für 30 min bis über Nacht bei optimaler Temperatur in einem Heizblock. Die Reaktionen wurden durch Hitzeinaktivierung für 10 min bei 70 °C und Zugabe von 2 µl 6x *Orange DNA loading dye* gestoppt.

5.18.5 Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-DNA-Ligase

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Plasmide wurden molare Verhältnisse von 1:2 – 1:5 (Plasmid:Insert) in wässriger Lösung eingestellt. Die Reaktion (20 µl Ansätze) erfolgte dann durch Versetzen der Lösung mit 2 µl 10x Ligationspuffer und 1 U T4-Ligase und Inkubation über Nacht bei 16 °C. Die Reaktionen wurden durch Hitzeinaktivierung für 10 min bei 70 °C inaktiviert.

5.18.6 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von transformierten *E.coli* erfolgte in LB-Medium bzw. auf LB-Agarplatten unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums (Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 30 µg/ml) bei 37 °C. Die mit pAdenoX-Plasmid transformierten Stbl2-Kulturen wurden bei 30 °C kultiviert.

5.18.7 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Die Herstellung kompetenter *E.coli* erfolgte über eine einzelne Kolonie des entsprechenden Stammes. Dieser Klon wurde in einer 25 ml SOB-Medium Vorkultur

für 6-8 h auf einem Horizontalschüttler bei 37 °C und 250 rpm vorkultiviert. Anschließend wurden 5 ml der Vorkultur in 250 ml SOB-Medium überführt und diese Kultur bis zum Erreichen einer optischen Dichte von $A_{600\text{nm}} = 0,55$ weiter kultiviert. Die Zellsuspension wurde dann in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (1500xg, bei 4 °C, 10 min) pelletiert. Das Kulturmedium wurde abgenommen, die Zellen in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Der Puffer wurde durch 20 ml frischen Transformationspuffer ersetzt und die Zellen resuspendiert. Es wurden 1,5 ml DMSO zugegeben und die Zellen so für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension zur späteren Verwendung aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Transformationspuffer:

55 mM MnCl_2

15 mM CaCl_2

250 mM KCl

10 mM PIPES (0,5 M, pH 6,7)

5.18.8 Transformation von *Escherichia coli*

Zur Transformation der kompetenten *E.coli* wurde die Hitzeschock-Methode verwendet. Es wurden 50 µl der kompetenten *E.coli* Zellsuspension über ca. 30 min auf Eis aufgetaut, mit 5 µl Ligationsreaktion bzw. 50 ng Plasmid-DNA versetzt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30-120 s und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Es wurden 200 µl SOC-Medium zum Transformationsansatz hinzugefügt und die Zellen einer 90 min Vorkultur bei 37 °C und 200 rpm unterworfen. Anschließend wurden 50-100 µl der Vorkultur auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit pAdenoX bzw. seinen Abkömmlingen transformierte *E.coli* Stbl2 wurden bei 30 °C kultiviert. In der Regel wurde eine Positivkontrolle mit 50 ng pUC19 Plasmid-DNA mitgeführt.

5.18.9 Isolation der Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* Zellen

Zur Plasmid-DNA-Isolation aus den transformierten *E.coli* Zellen wurden, entsprechend dem Kulturmaßstab, die Kits *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* und *QIAPrep Spin Miniprep Kit* unter Verwendung der Herstellerprotokolle genutzt.

5.18.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte spektralphotometrisch über die Absorption bei 260 nm und 280 nm. Die Berechnung der Konzentration erfolgte dabei nach folgender Formel:

$$C_{[\mu\text{g/ml}]} = A_{260} \cdot \text{Koeffizient} \cdot \text{Verdünnung}$$

Wobei der Koeffizient für Doppelstrang-DNA 50, für RNA 40 beträgt. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm diente zum Abschätzen der Proteinkontamination innerhalb der Probe und sollte für Doppelstrang-DNA über 1,8 und für RNA zwischen 1,9 und 2,1 liegen.

5.18.11 Adenovirale Vektorkonstruktion

Die Konstruktion adenoviraler Vektoren wurde notwendig, um die Organellen von Makrophagen für das *life-cell-imaging* mittels der Expression von Fusionsproteinen aus Organell-spezifischen Proteinen und fluoreszierendem Reporter-Protein darstellen zu können.

Da primäre Makrophagen zu den Zellen gehören, die sich schlecht transfizieren lassen, wurde das adenoviral-basierte Expressionssystem *Adeno-X™-Expression-System 1* von Clontech/Takara verwendet.

Der mit dem *Lysosome-associated membrane glycoprotein 1* [LAMP-1] fusionierte, tiefrot fluoreszierende Reporter mKate2 wurde aus dem kommerziell erworbenen *pmKate2-lyso vector* (Evrogen) mittels PCR amplifiziert (siehe Tabelle 5.16 und Tabelle 5.17).

Tabelle 5.16: Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation von Inserts für Klonierungen

Komponente	Menge
H ₂ O	36 µl
dNTP	2 µl (0,2 mM)
Primermix (5 pmol/µl je primer)	2 µl (10 pmol)
10x PWO PCR Reaktionspuffer	5 µl (10 mM Tris-HCL (pH8,8), 25 mM KCl, 2 mM MgSO ₄)
<i>pmKate2-lyso</i>	2 µl (100 ng)
PWO-DNA-Polymerase	3 µl (3 U)

Die DNA-Polymerasekettenreaktion wurde wie folgt durchgeführt:

Tabelle 5.17: PCR-Temperaturverlauf für die Amplifikation mit PWO-DNA-Polymerase

PCR-Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenanzahl
Aktivierung der DNA-Polymerase	2 min	94 °C	1
Denaturierung	15 s	94 °C	35
Annealing	30 s	55 °C	
Elongation	105 s	68 °C	
Abschließende Elongation	5 min	68 °C	1
Kühlung	∞	4 °C	

Das in der PCR entstandene DNA-Fragment wurde nach dem Auftrennen im Agarosegel und der Extraktion einem Endonukleaseverdau unterworfen. Die innerhalb der Ursprungssequenz vorhandene NheI-Schnittstelle sowie die über den *reverse-Primer* eingefügte KpnI-Schnittstelle wurden genutzt, um das Fusionsprotein in die *multiple cloning site* des linearisierten pShuttle zu ligieren und damit *E.coli* zu transformieren. Positive Klone wurden mittels Endonukleaseverdau mit NheI und KpnI identifiziert und die Integrität des Fusionsproteins mittels Sequenzierung über den Dienstleister Eurofins MWG GmbH bestätigt.

Die nun vervollständigte Expressionskassette des *Adeno-X™-Expression-System 1* wurde über die beiden flankierenden Schnittstellen I-CeuI und PI-SceI aus dem pShuttle/NheI-KpnI LysoKate2 ausgeschnitten und nach erfolgter Aufreinigung aus der Agarose-Gelelektrophorese in den ebenfalls über I-CeuI und PI-SceI linearisierten pAdenoX Vektor ligiert und in *E.coli* Stbl2 transformiert. Die Überprüfung einzelner Transformanten fand durch Restriktionsanalyse statt.

5.18.11.1 Herstellung und Aufreinigung von Adenoviren

Der pAdenoX/LAMP1-mKate2 Vektor wurde mittels eines Endonukleaseverdaus mit PacI linearisiert. Dabei wurde das adenovirale Genom durch die beiden flankierenden PacI Schnittstellen aus dem prokaryotischen Vektor-*backbone* geschnitten. Die DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Calciumphosphat-Präzipitation in HEK293 Zellen transfiziert. Dazu wurden 10 µl der linearisierten adenoviralen DNA (1 µg/ml) in 98 µl Wasser aufgenommen und 120 µl einer 2,5 M CaCl₂-Lösung hinzugefügt. Die DNA/CaCl₂-Lösung wurde nun unter leichtem Schütteln tropfenweise mit 120 µl 2x HBS-Puffer versetzt. Zur weiteren Bildung der Ca₃(PO₄)₂/DNA-Präzipitate wurde die Lösung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Suspension wurde danach tropfenweise zu einer Kultur semi-konfluenten HEK293-Zellen niedriger Passage gegeben. 24 h nach der

Zugabe wurden die Präzipitate und das Zellkulturmedium durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.

Innerhalb von ca. sieben Tagen bildete sich ein zytopathischer Effekt aus, der durch das Abrunden und Ablösen der Zellen gekennzeichnet ist. Die Zellen wurden dann mit Hilfe des Kulturmediums von der Kulturfläche gespült und die Suspension in ein 15 ml Röhrchen überführt. Dieses wurde dreimalig bei -80 °C eingefroren und erneut aufgetaut, um die Zellen zu lysieren und das Virus in das Medium freizusetzen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10 min, 3500xg, bei RT) pelletiert und der Überstand, bestehend aus Zellkulturmedium und Virus, zur Infektion mehrerer 175 cm² Zellkulturflaschen verwendet. Nach dem Ausbilden des zytopathischen Effekts wurden die Zellen von der Kulturfläche gespült und durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde dann in 5 ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen und bei -80 °C bis zur Virusaufreinigung gelagert.

Die Aufreinigung des Virus erfolgte mit dem *Adeno-X™ Maxi Purification Kit* (Clonetech/Takara) nach Herstellerangaben. Es handelt sich bei dem *Adeno-X™ Maxi Purification Kit* um ein Spritzensystem, dem ein Viruspartikel-absorbierender Filter aufgesetzt ist. Dieser wird genutzt, um Viruskapside zu binden, durch mehrere Waschschrte zu reinigen und anschließend durch Elution vom Filter zu konzentrieren. Das Konzentrat wurde dann zu je 100 µl aliquotiert und zur späteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.18.11.2 Titerbestimmung von Adenoviren

Der Virustiter der Adenoviruspräparationen wurde mittels *Adeno-X™ Rapid Titer Kit* bestimmt. Der *Kit* beruht auf der immunzytochemischen Anfärbung des Hexon-Viruskapsid-Proteins in infizierten HEK293-Zellen. Bei dieser Methode können, im Gegensatz zur beispielsweise photometrischen Bestimmung der Kapside, nur infektiöse Partikel, aber nicht die ebenfalls in der Viruslösung befindlichen leeren Kapside bestimmt werden. Die Titerbestimmung wurde nach Herstellerangaben im 24-Lochplattenformat durchgeführt.

5.19 Statistische Auswertung und Darstellung der Daten

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von GraphPad InStat[®]. Es wurde, soweit nicht anders aufgeführt, eine zweiseitige-*analysis of variance*, ANOVA, durchgeführt. Wenn die Daten, z.B. auf Grund zu kleiner Stichproben, nicht den

Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung bestanden, wurde der nicht-parametrische *student's t-test* benutzt. Ein Ergebnis wurde bei einem p von ≤ 0.05 als statistisch signifikant angenommen.

Die Darstellungen der erhobenen Daten wurden mit SigmaPlot 2001 Version 7 von SPSS Inc. ausgearbeitet.

Mikroskopische Bilder wurden nach der Verarbeitung mit den in der Tabelle 5.10 genannten Programmen in Adobe Photoshop CS6 zu Abbildungen zusammengefügt.

6 Ergebnisse

6.1 Ausschluss der Transdifferenzierung von Monozyten/Makrophagen in glatte Gefäßmuskelzellen durch lösliche Faktoren

Trotz der großen Vielfalt an Stimulationsmöglichkeiten konnte unter den insgesamt 292 getesteten Kombinationen aus Oberflächenbeschichtungen und Kombinationen verschiedener Konzentrationen von VEGF, bFGF und IGF-1 keine Bedingung identifiziert werden, die zur Differenzierung von Monozyten bzw. Makrophagen in glatte GMZ führte. Es konnte keine Expression von glattmuskulären Markerproteinen, wie smooth muscle α -actin und dem noch spezifischeren smooth muscle 22- α , immunzytochemisch nachgewiesen werden. Eine Transdifferenzierung fand unter den getesteten Bedingungen nicht statt.

6.2 Ergebnisse der Kokultivierung von glatten Gefäßmuskelzellen mit Monozyten/Makrophagen

Zur weiteren Testung des Transdifferenzierungspotentials von Monozyten/Makrophagen wurden diese mit glatten GMZ kokultiviert. Grundidee dieser Versuche war, dass die *in-vivo* beschriebene Transdifferenzierung von hämatopoetischen Zellen in glatte GMZ⁷⁰ nicht nur durch lösliche Faktoren, sondern auch durch Oberflächenbestandteile, der die hämatopoetischen Zellen umgebenden glatten Muskelzellen, ausgelöst werden könnte.

Zur späteren Identifizierung wurden die Monozyten/Makrophagen vor Beginn der Kokultur, in sog. Einzelkultur, mittels FL-acLDL markiert. In Vorversuchen war ausgeschlossen worden, dass glatte GMZ das verwendete FL-acLDL aus dem Medium aufnehmen konnten. MP sind hingegen in der Lage, das FL-acLDL nicht nur aufzunehmen und zu inkorporieren, sondern blieben auch noch 6 Wochen nach der FL-acLDL Exposition an dessen Fluoreszenzmarkierung klar identifizierbar.

Die Verwendung der FL-acLDL-markierten Makrophagen und in der Proliferation blockierten, semi-konfluenten glatten GMZ führte in der immunzytochemischen Aufarbeitung der Proben zu Zellen, die sowohl die Markierung des FL-acLDL als auch die Expression glattmuskulärer Markerproteine zeigten. Wie in Abbildung 8 gezeigt, war der Nachweis des für glatte GMZ hoch spezifischen SM22- α , auch

bekannt als Transgelin (einem Aktin-Bindeprotein der Calponin-Familie), in Zellen möglich, die gleichzeitig die FL-acLDL Markierung aufweisen.

Die als Kontrolle verwendeten fluoreszenzmarkierten 1 μm *beads*, welche analog dem FL-acLDL den MP vor Beginn der Kokultur zur Phagozytose angeboten worden waren, bestätigten die Ergebnisse zunächst. Auch in diesen Experimenten konnte eine beträchtliche Anzahl von Zellen nachgewiesen werden, die für GMZ-Marker gefärbt werden konnten und ebenfalls die initial mittels Phagozytose beigebrachte Markierung der MP aufwiesen.

Die Zunahme dieser doppelt positiven Zellen wurde dann durch die Aufnahme kinetischer Experimente, anschließender immunzytochemischer Färbungen und der Quantifizierung am Fluoreszenzmikroskop weiter untersucht. Wie in Abbildung 8b dargestellt, konnte eine zeitliche Abhängigkeit der Zunahme doppelt positiver Zellen festgestellt werden. Die Verwendung hochreiner Monozyten/Makrophagen aus der Selektion mit magnetischen Antikörpern gegen CD14 zeigte zudem die Abhängigkeit des Auftretens doppelt positiver Zellen von der Anwesenheit der MP. Die Monozyten/Makrophagen depletierte sog. Negativfraktion, welche hauptsächlich aus T-Zellen besteht, wies mit 1,2% nur einen sehr geringen Anteil FL-acLDL positiver GMZ auf.

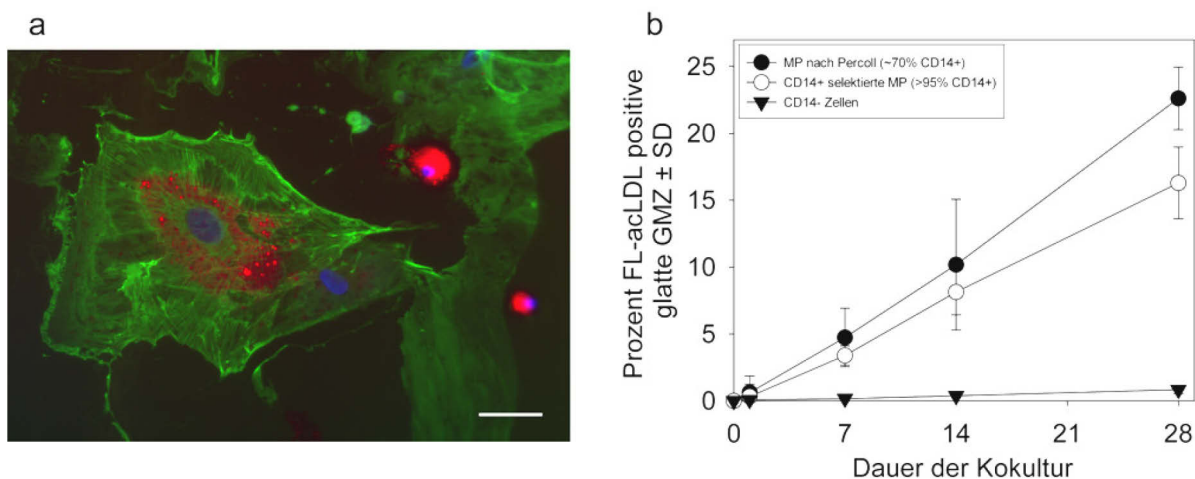


Abbildung 8: Quantifizierung der FL-acLDL positiven glatten Gefäßmuskelzellen.

Exemplarische immunzytochemische Färbung einer Kokultur (a). Die glatten GMZ wurden mittels Färbung gegen den hoch spezifischen GMZ-Marker SM22- α dargestellt (grün). Das FL-acLDL wurde rot dargestellt. Deutlich sind die beiden FL-acLDL beladenen Makrophagen am rechten Bildrand zu erkennen. Außerdem kann man die punktuelle Einlagerung des FL-acLDL in der glatten GMZ links erkennen. Die Zellkerne wurden mittels DAPI Färbung (blau) zusätzlich dargestellt. Maßstabsbalken: 30 μm .

Quantifizierung der FL-acLDL positiven glatten GMZ in (b). Zur Erhebung der Daten wurden je Färbung der GMZ-Marker (smooth muscle α -actin, Calesdmon, Calponin und SM22- α) jeweils hundert GMZ in zufällig gewählten Gesichtsfeldern ausgezählt ($n=5$ /Gruppe). Man erkennt deutlich die zeitabhängige Zunahme der FL-acLDL positiven GMZ innerhalb der Kokulturen mit FL-acLDL beladenen MP. Die Negativfraktion der CD14-Aufreinigung, also die CD14-negativen Zellen, weist eine Depletion der Monozyten/Makrophagen auf und zeigt damit, dass das Auftreten FL-acLDL positiver GMZ Makrophagen-abhängig ist.

6.2.1 Zell-Zell-Kontakt Abhängigkeit des FL-acLDL Transports

Durch die Verwendung einer räumlichen Trennung der Kokulturen aus glatten GMZ und MP mittels *trans-well*-Einsätzen konnte die Notwendigkeit von Zell-Zell-Kontakten für das Auftreten doppelt positiver glatter GMZ gezeigt werden. Die räumliche Trennung durch *trans-well*-Einsätze ermöglichte hierbei weiterhin den Austausch löslicher Faktoren, sowie auf Grund des gewählten Durchmessers das Herabfallen kleinerer Partikel. Der verwendete Porendurchmesser von 1 µm erlaubt nach Herstellerangabe (persönliche Mitteilung eines Mitarbeiters des technischen Kundendienstes der Greiner Bio-One GmbH) dabei sogar den Austausch von Exosomen und während der Apoptose gebildeten Vesikeln, den *apoptotic bodies*. Ein Unterschied zwischen Kokulturen, in denen MP in das obere Kompartiment und die glatten GMZ unterhalb der MP kultiviert wurden und der umgekehrten Anordnung in den Kokulturen, konnte nicht festgestellt werden.

6.2.2 Nachweis der Expression humaner glattmuskulärer Marker mittels *real-time* PCR

Die Verwendung xenogen zusammengesetzter Kokulturen erlaubte es, die Expression der beiden verwendeten Spezies, humane MP und glatte GMZ der Ratte, durch die Verwendung Spezies-spezifischer Primer getrennt voneinander in der *real-time* PCR nachzuweisen. Wäre es zur Transdifferenzierung der Monozyten/Makrophagen, wie zunächst angenommen, gekommen, hätten die Transkripte für humane GMZ-Marker signifikant ansteigen müssen. Dies war jedoch nicht der Fall: Während das Transkript des smooth muscle α -actin (Gen: ACTA2) ein relativ hohes Expressionsniveau auch in den einzeln kultivierten humanen Makrophagen und den Kokulturen im Vergleich zu humanen glatten GMZ erreicht, ist das für glatte GMZ spezifischere Transkript des smooth muscle 22- α (Gen: TAGLN) kaum exprimiert. Wie in Abbildung 9 ersichtlich, gibt es so gut wie keine Unterschiede in den Expressionsniveaus beider Transkripte in den Kokulturen und den als Kontrolle verwendeten einzeln kultivierten MP. Die statistische Analyse zwischen den Kokulturen und den einzeln kultivierten MP zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Transkripte der ebenfalls untersuchten GMZ-Marker Calponin H1 (Gen: CNN1) und Caldesmon (Gen: CALD1) waren weder in den Kokulturen noch in einzeln kultivierten MP exprimiert. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der Mikroskopie, die die

Anwesenheit von Zellen hämatopoetischen Ursprungs, die eine Expression von GMZ-Markerproteinen aufzuweisen schienen, suggerierten.

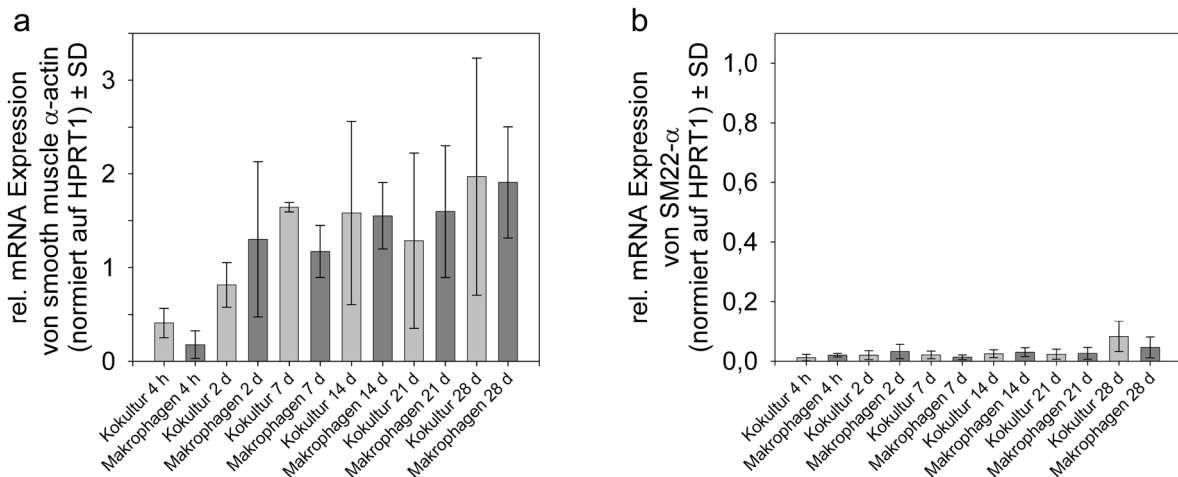


Abbildung 9: Relative Expression humaner glatter Gefäßmuskelzell-Marker innerhalb der Kokultur.

Durch die Verwendung xenogen zusammengesetzter Kokulturen ist es möglich, mittels Spezies-spezifischen Primern zwischen der Expression der humanen MP bzw. der glatten GMZ aus Ratten zu diskriminieren. Mittels *real-time* PCR und humanen Primern konnte gezeigt werden, dass smooth muscle α -actin einen schlechten Marker auf Transkriptebene darstellt (a). Makrophagen exprimieren relativ zu humanen glatten GMZ ebenfalls in vergleichbarem Maße smooth muscle α -actin. Ein differenzieller Unterschied zwischen den einzelkultivierten Makrophagen und den Kokulturen, in denen FL-acLDL positive GMZ auftraten, konnte nicht festgestellt werden.

Das Expressionsniveau des spezifischeren Markers smooth muscle 22- α (SM22- α) (b), wieder relativ zu humanen glatten GMZ dargestellt, zeigte, dass es nicht zur Expression von humanen GMZ-Markern innerhalb der Kokultur kam. Die ebenfalls als relativ spezifisch geltenden Marker Caldesmon und Calponin konnten weder in der Kokultur noch in den einzeln kultivierten MP nachgewiesen werden. (n=3)

6.2.3 Erste mikroskopische Hinweise auf den Transport des FL-acLDL von Makrophagen in die glatten Gefäßmuskelzellen

Aufgrund des Widerspruchs zwischen den mikroskopischen Ergebnissen und den Ergebnissen der quantitativen PCR wurden nochmals Kontrollen zur Spezifität und Stabilität der Markierung durchgeführt. Hierfür wurden neben dem FL-acLDL auch noch einmal *beads* verwendet, die den MP vor Beginn der Kokultur zur Phagozytose angeboten wurden. Die bei diesen Versuchen angebotenen *beads* waren jedoch mit 8-10 μ m deutlich größer als die zuerst benutzten 1 μ m *beads*.

Es zeigte sich, wie in der Abbildung 10g-i ersichtlich, dass es möglich ist, dass sowohl die *beads* als auch das FL-acLDL von den MP an die glatten GMZ abgegeben werden. Leider war es an dem in Dresden verwendeten Axiovert 100 nicht möglich eine entsprechend lange *time-lapse* Aufnahme anzufertigen. Es wurde dann versucht durch das wiederholte Beobachten ein und derselben Stelle der Kokulturen, unter Verwendung einer Skalpell-Markierung an der Unterseite des

Zellkulturplastiks, die fehlende *time-lapse* Fähigkeit des Mikroskopsystems zu kompensieren (Abbildung 10a-f).

Die dabei gewonnene Zeitreihen weisen zwar eine schlechte zeitliche Auflösung auf, bestätigten aber die bei den Momentaufnahmen (Abbildung 10g-i) gewonnene Erkenntnis, dass es sich bei dem Auftreten doppelt positiver Zellen nicht um einen Transdifferenzierungs-, sondern um einen Transportvorgang handelt.

Die Verwendung von glatten GMZ aus Mäusen, die ubiquitär GFP exprimieren, bestätigte zusätzlich, dass sich alle FL-acLDL positiven GMZ aus den initial eingesäten GFP-positiven glatten GMZ gebildet hatten (Abbildung 10j-m).

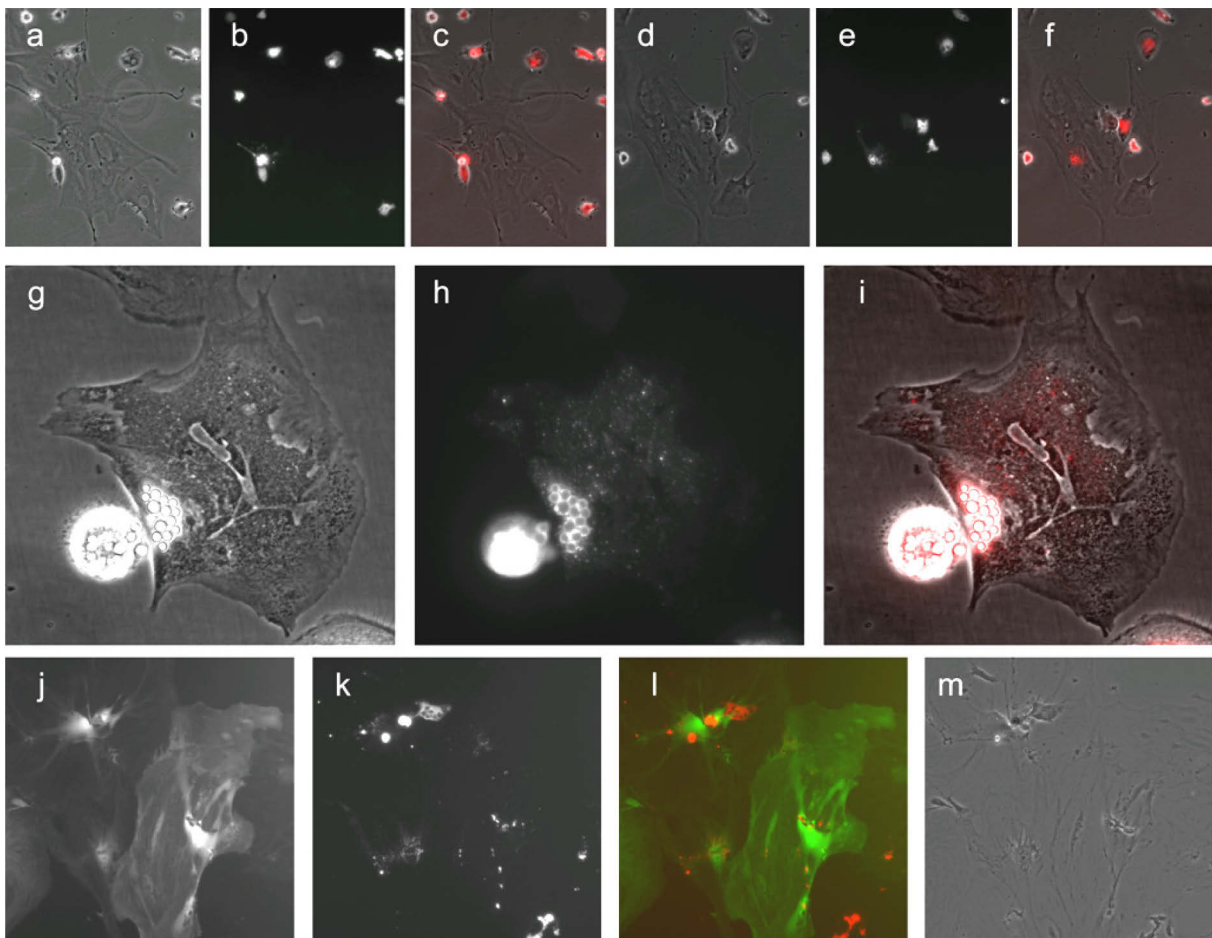


Abbildung 10: Hinweise auf einen Transport des FL-acLDL von den Makrophagen in die glatten Gefäßmuskelzellen.

(a-f) Durch die wiederholte Dokumentation markierter Stellen über 56 Zeitpunkte innerhalb von vier Wochen Kulturdauer konnte beobachtet werden, dass es sich bei den Ergebnissen aus der immunzytochemischen Färbung, dem Nachweis von FL-acLDL positiven Zellen, welche glatte GMZ-Marker exprimierten, nicht um die Transdifferenzierung von MP in glatte GMZ handelte, sondern um den Transport von FL-acLDL aus MP in die glatten GMZ. Hier gezeigt sind die Aufnahmen der Phasenkontrastierung (a & d) zum Identifizieren der GMZ, das FL-acLDL (b & e) und die Überlagerung beider Bilderpaare (c & f). Die perinukleäre Lokalisation des FL-acLDL in (e) und das Aussparen des GMZ Zellkerns ist ein klares Indiz für die intrazelluläre Lokalisation des FL-acLDL Signals.

(g-i) Zusätzlich wurden mit *beads* und FL-acLDL vor der Kokultur beladene MP für die Kokultur eingesetzt. Bei der regelmäßigen Beobachtung konnten Zellpaare, wie das hier gezeigte, im Moment des Transports sowohl des FL-acLDL als auch der *beads* gefunden werden. Deutlich in der Phasenkontrastierung (g) zu erkennen sind der mit *beads* beladene MP links und die polyedrische glatte GMZ. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse des FL-acLDL (h) demonstriert, dass fast schon

das gesamte Zytoplasma der GMZ mit FL-acLDL gefüllt ist. Der *merge* (i) beider Bilder verdeutlicht die FL-acLDL Lokalisation innerhalb der glatten GMZ.

(j-m) Die Verwendung von glatten GMZ aus GFP-positiven Mäusen (j) bei der Kokultur mit FL-acLDL beladenen MP (k) schloss endgültig die Transdifferenzierung von MP in glatte GMZ während der Kokultur aus. Es wurden ausschließlich GMZ beobachtet, die sowohl FL-acLDL als auch GFP-positiv waren, wie deutlich im *merge* (l) zu erkennen. Der Phasenkontrast (m) dient der besseren Zuordnung der Fluoreszenzsignale.

6.2.4 *time-lapse* Mikroskopie des Transports von fluoreszenzmarkiertem acLDL

Das in Magdeburg innerhalb der Arbeitsgruppe verfügbare Axiovert 200m-basierte Mikroskopiesystem ermöglichte es, die Kokulturen für bis zu drei Tage auf dem Mikroskop unter Zellkulturbedingungen zu beobachten. Um die Chance der Beobachtung des Transports zu erhöhen, wurden durch die Verwendung des Software-Moduls *Mark&Find* mehrere Stellen derselben Kokultur beobachtet.

Die Bilderserien bestätigten, dass es sich nicht um eine Transdifferenzierung der Makrophagen, sondern um einen Transport des FL-acLDL von den MP in die glatten GMZ handelte. Zusätzlich zeigten die gewonnenen Zeitrafferaufnahmen, dass der Transport einzelner FL-acLDL Partikel relativ schnell stattfindet. Exemplarisch ist hier (Abbildung 11) eine ROI einer *time-lapse* Serie gezeigt. Zusätzlich zeigten diese Aufnahmen, dass es sich bei dem Transport des FL-acLDL in die glatten GMZ nicht um einen durch die Apoptose von MP getriebenen Prozess handelt, da der mittels Hoechst 33342 angefärbte Kern des in dieser Sequenz transportierenden MP auch noch über zwölf Stunden nach dem erfolgten Transport keine Anzeichen einer Apoptose-typischen Degradation zeigte.

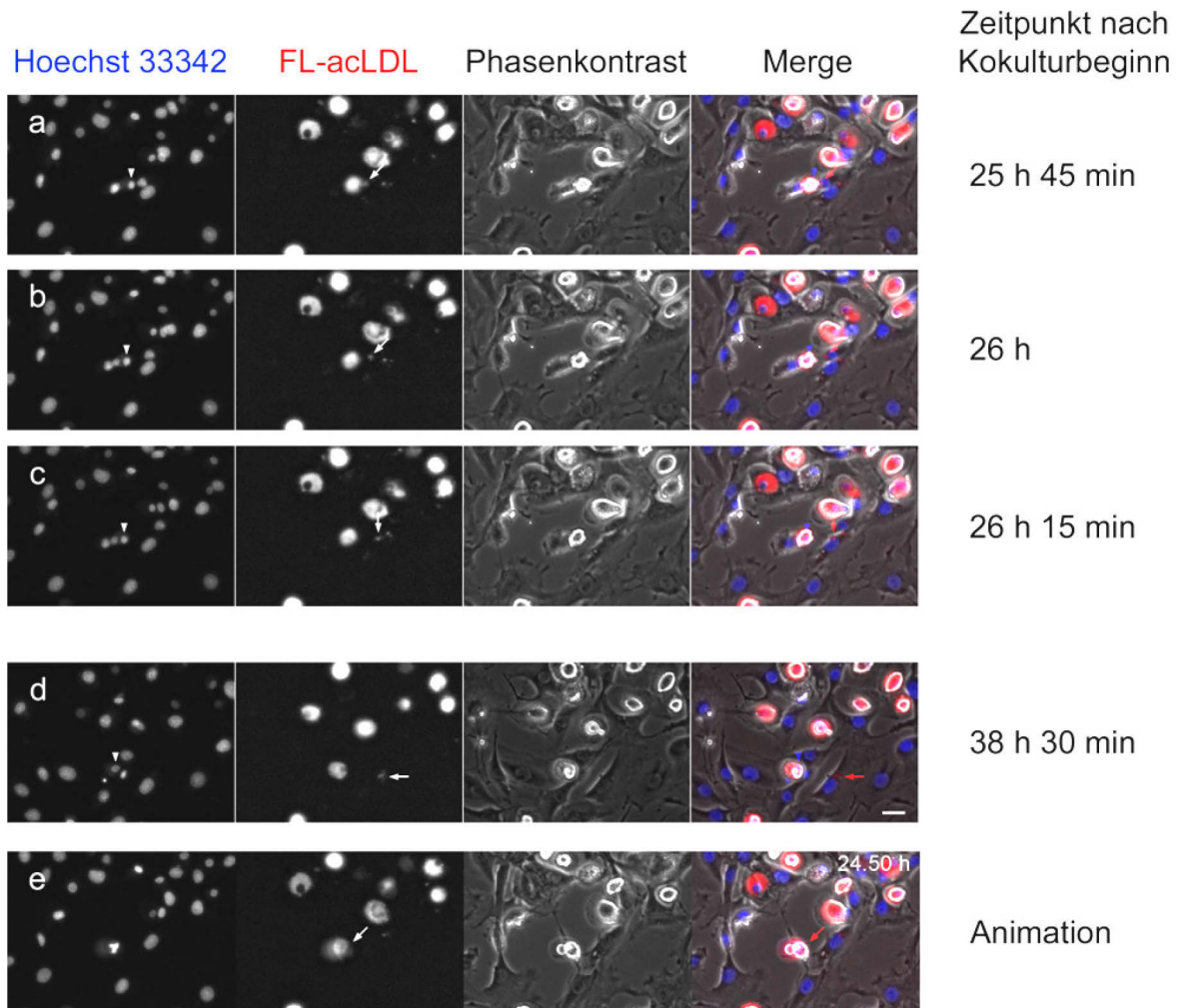


Abbildung 11: Ausgewählte Einzelbilder aus einer *time-lapse* Serie. Zur weiteren Analyse des FL-acLDL Transfers wurden *time-lapse* Serien lebender Kokulturen am Mikroskop angefertigt. Die erste Zeile zeigt die Hoechst 33342 DNA Färbung, welche zum Ausschluss einer Apoptose/Nekrose, aber auch als Fokusreferenz verwendet wurde. Der übertragende MP wurde mittels Pfeilspitze markiert. Die zweite Zeile zeigt das FL-acLDL, der dargestellte Pfeil markiert das in die glatte GMZ transferierte FL-acLDL. Zeile drei zeigt die phasenkontrastierten Zellen während des FL-acLDL Transfers. Zeile vier zeigt als *merge* die Überlagerung der drei vorhergehenden Zeilen. Maßstabsbalken: 30 μ m.

Die *time-lapse* Serien zeigten, dass der einzelne FL-acLDL Transfer, wie in den Reihen (a-c) dargestellt, relativ schnell stattfand. Die Reihe (d) zeigt, dass es sich bei dem interzellulären FL-acLDL Transport nicht um einen durch die Apoptose von MP getriebenen Prozess handelt, da der transportierende MP noch 12 h nach dem erfolgten Transfer, am Ende dieser *time-lapse* Serie, eine normale Kernmorphologie in der Hoechst-Färbung aufweist.

In der Reihe (e) kann der Leser dieser Arbeit der auf CD beiliegenden PDF-Datei den dort hinterlegten Film durch Klicken starten.

6.3 Intrazelluläre Lokalisation des acLDL innerhalb der glatten Gefäßmuskelzelle

Mittels dreidimensionaler Fluoreszenzmikroskopie wurde untersucht, ob sich das Signal des FL-acLDLs tatsächlich in den glatten GMZ befand. Die Kokulturen wurden dazu in Glasbodenschälchen vorbereitet, um die höhere Auflösung von Oil Immersions-Objektiven in Z-Richtung zu nutzen. Sowohl die Aufnahme von Weitfeld-Fluoreszenz Z-Stapeln und anschließende Dekonvolution (siehe Abbildung

12) als auch die Aufnahmen des psCLSM (siehe Abbildung 13) zeigten hierbei, dass sich das FL-acLDL nach dem erfolgten Transport durch die MP innerhalb der glatten GMZ befand. Es zeigte sich hierbei auch, dass der Transport des FL-acLDL von den MP in die glatten GMZ schon relativ früh nach Beginn der Kokultivierung beginnt. Erste, sehr stark FL-acLDL positive GMZ konnten bereits, wie hier in Abbildung 12 gezeigt, sechs Stunden nach Kokulturbeginn gefunden werden.

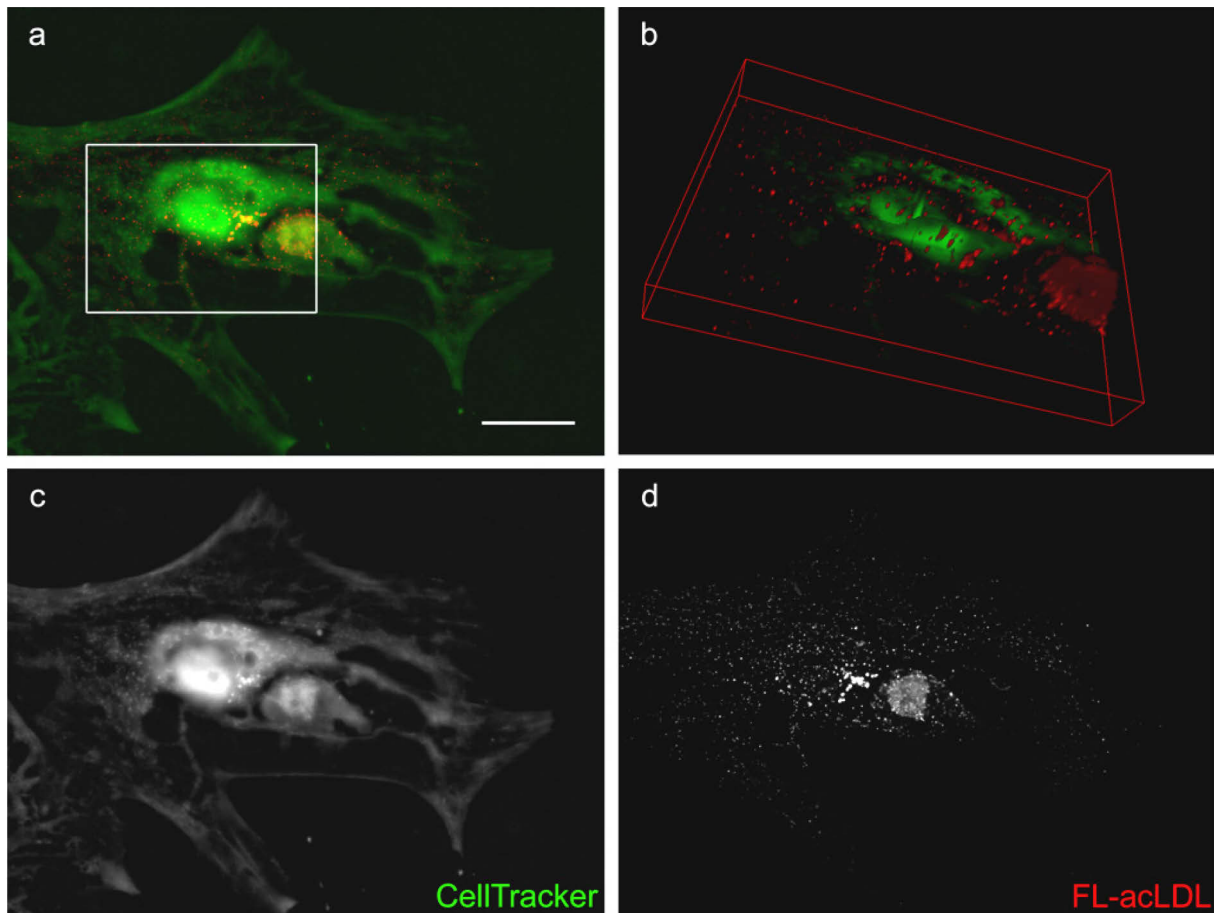


Abbildung 12: Nachweis der Lokalisation des FL-acLDL in glatten Gefäßmuskelzellen in der Weitfeld-Fluoreszenz mit anschließender Dekonvolution.

Mittels Weitfeld-Fluoreszenz Z-Stapel Aufnahmen und anschließender Dekonvolution wurde die Lokalisation des FL-acLDL in den glatten Gefäßmuskelzellen untersucht. Die glatten GMZ wurden vor Beginn der Kokultur mittels CellTracker (grün) gefärbt und mit FL-acLDL (rot) beladenen MP kokultiviert. Die gezeigte Aufnahme entstand 24 h nach Kokulturbeginn.

In (a) ist die Maximum-Intensitäts-Projektion der zusammengeführten Fluoreszenzkanäle des 192 x 144 x 14 µm mikroskopischen Volumens dargestellt. Der weiße Rahmen beschreibt die ROI des für die Rekonstruktion (b) verwendeten Volumens. Maßstabsbalken: 30 µm. Die dreidimensionale Rekonstruktion (b), hier zusammengesetzt aus einem gerenderten Volumen für das FL-acLDL (rot) und der CellTracker-Färbung der glatten GMZ als orthologe Ebenenschnitte, bestätigte die intrazelluläre Lokalisation des FL-acLDL in den glatten GMZ. Die Maximum-Intensitäts-Projektion des CellTrackers in (c) lässt den auf der glatten GMZ sitzenden Makrophagen rechts vom Zellkern auf Grund seiner Autofluoreszenz erkennen. Der Teil (d) der Abbildung zeigt die Maximum-Intensitäts-Projektion des FL-acLDL Signals. Hierbei ist zu bemerken, dass die gesamte glatte GMZ mit punktförmigem FL-acLDL angefüllt ist, und dass an Stellen hoher Zytoplasmadichte, ersichtlich durch ein stärkeres CellTracker Signal, wie z.B. im perinukleären Raum, auch die FL-acLDL Signale verstärkt auftreten.

Der Leser der dieser Arbeit auf CD beiliegenden PDF-Datei kann durch Mausklick auf die Abbildung (b) den dort hinterlegten Film der dreidimensionalen Rekonstruktion starten.

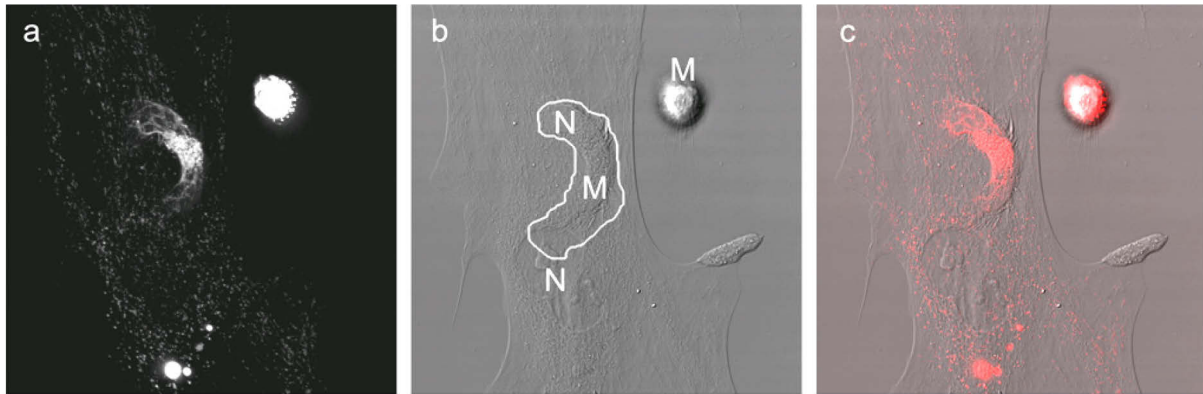


Abbildung 13: Bestätigung der intrazellulären Lokalisation im konfokalen LASER-scanning Mikroskop.

MP wurden in Einzelkultur mit FL-acLDL beladen und hiernach mit glatten GMZ kokultiviert. Nachdem die ersten FL-acLDL positiven glatten GMZ im Weitfeld-Mikroskop beobachtet werden konnten, wurde die Probe der konfokalen Mikroskopie unterworfen. Es bestätigte sich, dass das FL-acLDL innerhalb der glatten GMZ vorlag. Abbildungsteil (a) zeigt die Maximum-Intensitäts-Projektion des analysierten Volumens von $142 \times 142 \times 13 \mu\text{m}$. Anhand des FL-acLDL Signals kann man deutlich einen MP auf der glatten GMZ im Differentialinterferenzkontrast (DIC) Bild aus der Mitte des Z-Stapels (b) erkennen (markiert durch eine Umrandung). Zur besseren Interpretation wurden Zellkerne mit N und MP mit M markiert. Der *merge* beider Bilder (c) zeigte zudem, dass das FL-acLDL Signal innerhalb der glatten GMZ mit den im DIC-Bild erkennbaren granulären Strukturen innerhalb der Zelle korreliert.

6.4 Nachweis des Transports von Cholesterol/acLDL-Komplexen in glatte Gefäßmuskelzellen

Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Cholesterol sollte untersucht werden, ob neben dem FL-acLDL oder gar nur des an dem FL-acLDL gebundenen Farbstoffs, bioaktive und pro-atherogene Substanzen von den MP in die glatten GMZ transportiert werden können. Dazu wurde das FL-Cholesterol mit FL-acLDL komplexiert. Dies ermöglichte eine Aufnahme des Wasser-unlöslichen Cholesterols in die Makrophagen in der Einzelkultur.

In Vorversuchen zeigte sich, dass sich die FL-Cholesterol/FL-acLDL-Komplexe entsprechend der Lehrbuchkenntnis verhalten. Es wurden die Komplexe aus dem Medium aufgenommen und zeigten initial eine Kolokalisierung beider Fluoreszenzsignale, des FL-acLDL und des FL-Cholesterols, innerhalb der Makrophagen. Nach ca. 24 h war zu beobachten, dass das FL-Cholesterol vom FL-acLDL gelöst war und sich in Lipidtröpfchen, sog. *lipid droplets*, welche die Speicherform von Lipiden innerhalb der Zelle darstellen, in der Nähe der Zellmembran befand. In wenigen Einzelfällen konnte auch die Anfärbung der gesamten Zellmembran der Makrophagen mit dem FL-Cholesterol beobachtet werden.

Es wurden nun Kokulturen glatter GMZ und mit FL-Cholesterol/FL-acLDL-Komplexen beladener MP hergestellt. Nach ca. einem Tag konnten erste glatte GMZ in der Kokultur beobachtet werden, welche neben dem FL-acLDL aus den MP auch

FL-Cholesterol aufwiesen (Abbildung 14). Auch hier war eine initiale Kolokalisation beider Fluoreszenzsignale, die sich bald in die Abspaltung und Bildung von *lipid droplets* auf der Zelloberfläche (Abbildung 15) weiterentwickelte, zu beobachten.

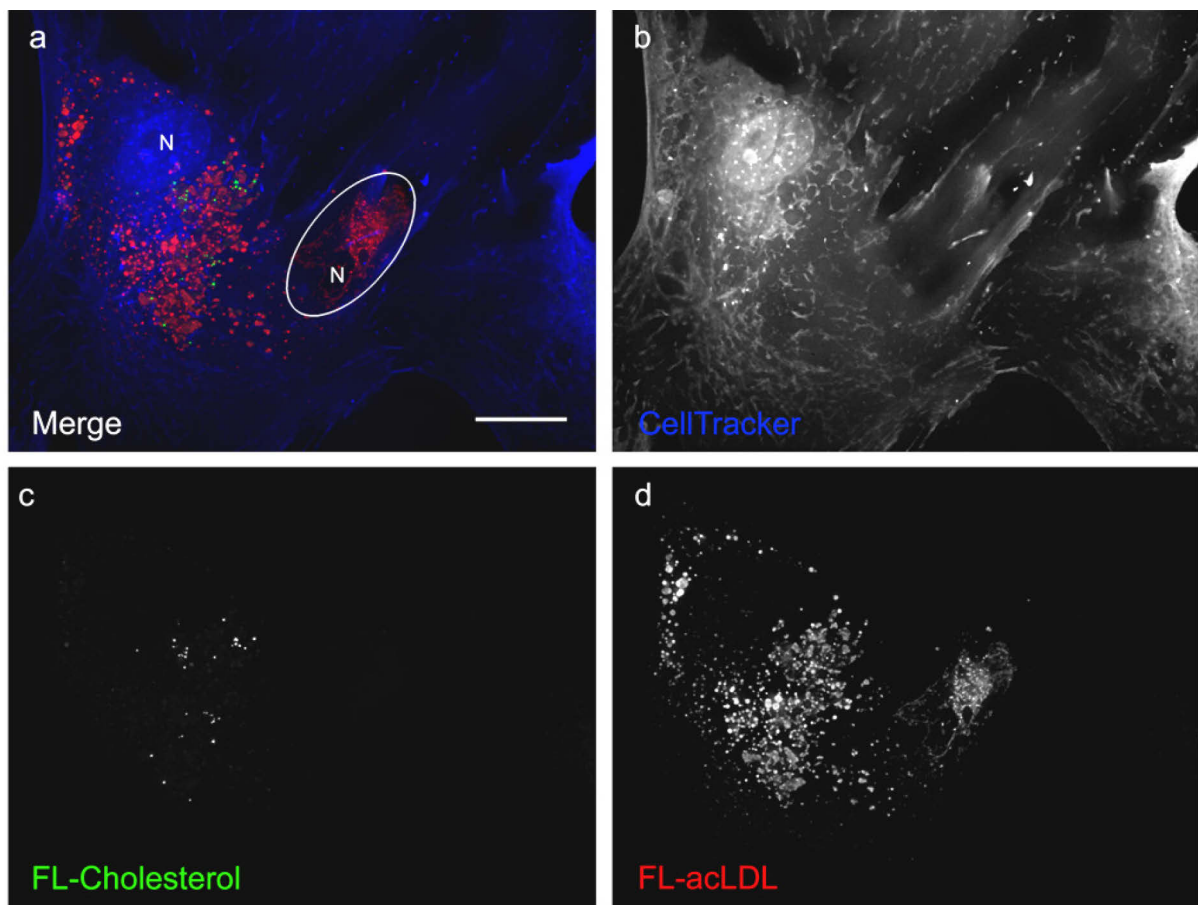


Abbildung 14: Nachweis des Transports von Cholesterol aus Makrophagen in die glatten Gefäßmuskelzellen.

Die verwendeten MP wurden vor Beginn der Kokultur mit Komplexen aus unterschiedlich fluoreszenzmarkiertem Cholesterol und acLDL beladen und daraufhin mit CellTracker (blau) gegengefärbten glatten GMZ kokultiviert. Dabei zeigte sich, dass neben dem FL-acLDL (rot) auch das komplexierte Cholesterol (grün) von den Makrophagen in die glatten GMZ transportiert wurde. Maßstabsbalken: 30 μm .

In (a) ist die Maximum-Intensitäts-Projektion eines Volumens von 192 x 144 x 13 μm als *merge* aller Fluoreszenzkanäle nach Dekonvolution und 20 h Kokultur dargestellt. Die Zellkerne wurden mit einem N markiert, zusätzlich wurde der auf der glatten GMZ (b CellTracker Gegenfärbung) sitzende MP mit einem Oval markiert. Deutlich sind die FL-acLDL Signale in der glatten GMZ zu erkennen (d). Das ebenfalls mit von den MP in die GMZ transportierte FL-Cholesterol (c) lag als Lipidtröpfchen auf der Oberfläche der GMZ vor.

Der Leser der dieser Arbeit auf CD beiliegenden PDF-Datei kann durch Mausklick auf die Abbildung (a) den dort hinterlegten Film der dreidimensionalen Rekonstruktion starten.

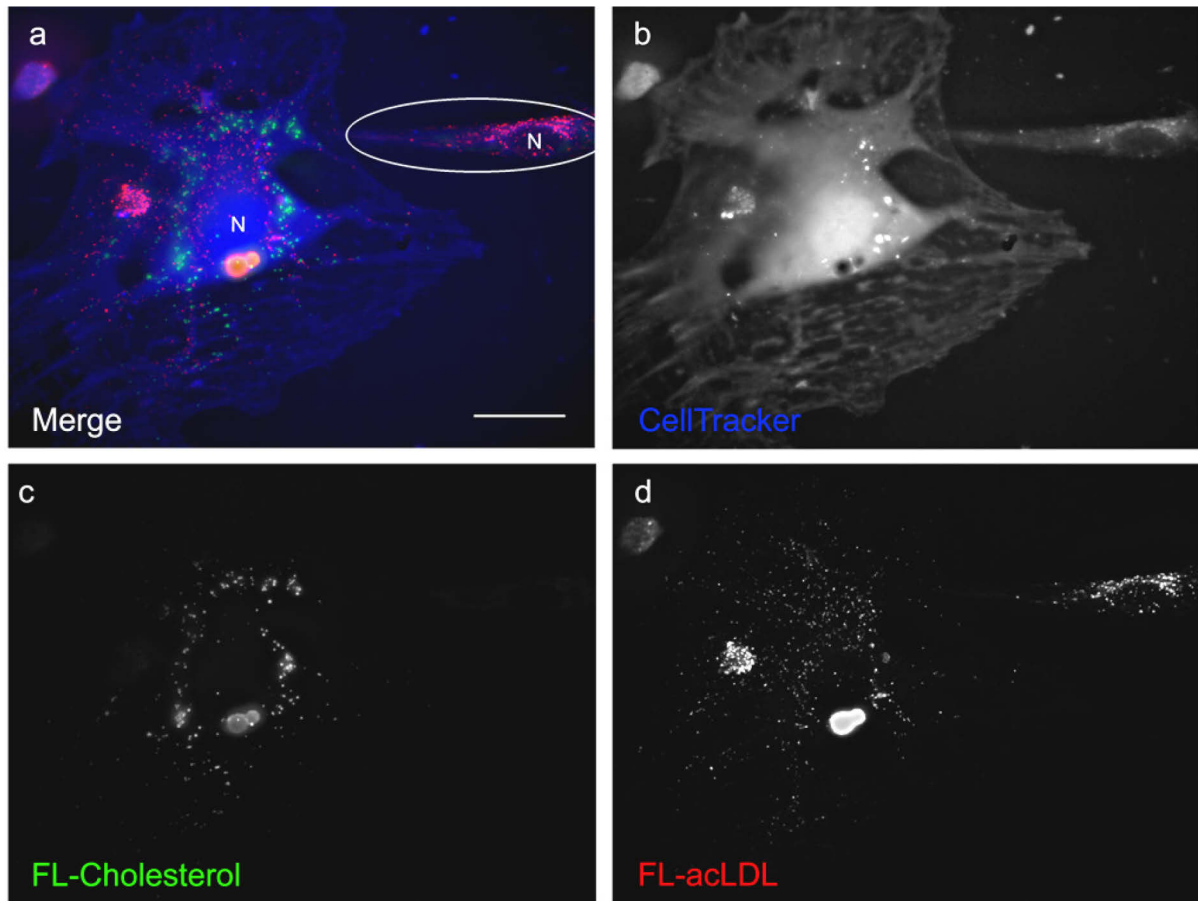


Abbildung 15: Nachweis des Transports von Cholesterolem aus Makrophagen in die glatten Gefäßmuskelzellen zu späteren Zeitpunkten.

Wie in Abbildung 14 wurden die verwendeten Makrophagen vor Kokultur-Beginn mit FL-Cholesterolem/FL-acLDL beladen und mit CellTracker gefärbten GMZ kokultiviert, hier nun gezeigt nach 3 Tagen Kokultur. Es fällt auf, dass das CellTracker Signal der glatten GMZ zu diesem Zeitpunkt schon relativ schwach, und dadurch, wie in (a) und (b) zu sehen, die Autofluoreszenz der Makrophagen durch die notwendige längeren Belichtungszeiten ebenfalls von der Kamera erfasst wurde. Zur besseren Übersicht wurden die Kerne wieder mit N und der MP mittels Umrandung markiert. Maßstabsbalken: 30 μm .

In (a) ist die Maximum-Intensitäts-Projektion aller Fluoreszenzkanäle des beobachteten Volumens von 192 x 144 x 15 μm gezeigt. Man kann deutlich eine nur noch teilweise vorliegende Kolo-kalisation des FL-Cholesterolem (c) mit dem FL-acLDL (d) erkennen. Beim Durchfahren des Bilderstapels in Z-Richtung bzw. in der dreidimensionalen Rekonstruktion (beides hier nicht gezeigt) konnte zudem die Lokalisation der meisten FL-Cholesterolem Signale in der Nähe der Zellmembran in *lipid droplets* festgestellt werden.

Der Leser der dieser Arbeit auf CD beiliegenden PDF-Datei kann durch Mausklick auf die Abbildung (a) den dort hinterlegten Film der dreidimensionalen Rekonstruktion starten.

6.5 Phänotypische Veränderungen der glatten Gefäßmuskelzellen nach dem interzellulären Transport des FL-acLDL

Wie von Rong et al. schon beschrieben, kommt es nach der Stimulation von glatten GMZ mit Cholesterolem zu einer phänotypischen Veränderung der glatten GMZ in Richtung von MP bzw. Schaumzellen. Die beschriebene Aktivierung der Phagozytose, die Bildung von *lipid droplets*, aber auch die veränderte Genexpression der durch Cholesterolem stimulierten glatten GMZ sollte nun auch als eine mögliche

Folge des interzellulären FL-acLDL Transports von den MP in die glatten GMZ untersucht werden.

6.5.1 Aktivierung der Phagozytose in glatten GMZ als Folge des interzellulären FL-acLDL Transports

Aufgrund der unterschiedlichen Trypsinsensitivität von MP und glatten GMZ war es möglich, die glatten GMZ mit hoher Reinheit von >95% aus den Kokulturen zu re-isolieren. Die so gewonnenen glatten GMZ wurden dann über Nacht weiter kultiviert, um den Einfluss der Re-Isolation auf die folgenden Versuche zu minimieren. Am folgenden Tag wurden den Kulturen fluoreszierende *beads* mit einem Durchmesser von 0,5 μm für sechs Stunden zur Phagozytose angeboten.

Nach mehrmaligem Waschen wurden die Zellkulturen der Analyse am Fluoreszenzmikroskop unterworfen und die Zahl phagozytierter *beads* pro Zelle semi-automatisch mittels ImageJ bestimmt. Dabei dienten FL-acLDL negative glatte GMZ, die ebenfalls mit re-isoliert wurden, als interne Negativkontrolle für die jeweiligen FL-acLDL positiven Zellen. Es zeigte sich (siehe Abbildung 16), dass glatte GMZ nach erfolgtem FL-acLDL Transport aus den MP in die GMZ, also FL-acLDL positive GMZ, eine ca. fünffach erhöhte phagozytotische Aktivität gegenüber den, ebenfalls aus der selben Kokultur isolierten, FL-acLDL negativen GMZ aufwiesen.

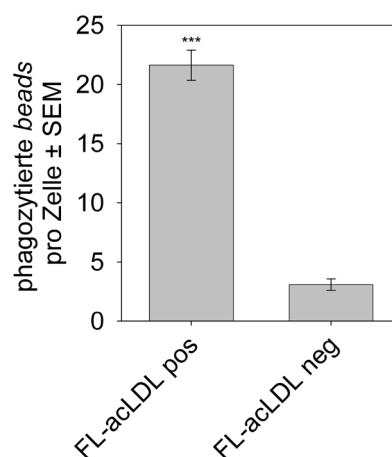


Abbildung 16: Quantifizierung der Phagozytoseaktivität re-isolierter glatter Gefäßmuskelzellen. Nach zweiwöchiger Kokultur mit FL-acLDL beladenen MP wurden die glatten GMZ basierend auf der unterschiedlichen Trypsinsensitivität in hoher Reinheit re-isoliert. Die glatten GMZ wurden über Nacht kultiviert und am nächsten Morgen dem Zellkulturmedium 0,5 μm fluoreszierende *beads* zugesetzt. Nach 6 h wurde das Zellkulturmedium ersetzt, verbleibende *beads* durch mehrfaches Waschen entfernt und die Zellen der fluoreszenzmikroskopischen Analyse zugeführt. Es wurden 20 zufällig gewählte Zellen pro Gruppe dokumentiert (n=5), die FL-acLDL negativen Zellen aus der Kokultur dienten als interne Kontrolle. Die Bilder wurden dann der Bildsegmentierung und semi-automatischen Quantifizierung in ImageJ unterworfen. (***) $p < 0,01$) Es zeigte sich deutlich, dass die FL-acLDL

positiven glatten GMZ gegenüber den aus denselben Kokulturen stammenden FL-acLDL negativen GMZ eine erhöhte Phagozytoseaktivität aufwiesen.

6.5.2 Lipidakkumulation innerhalb FL-acLDL positiver glatter Gefäßmuskelzellen

Die Lipidakkumulation innerhalb der FL-acLDL positiven glatten GMZ, welche schon durch die Versuche mit den FL-Cholesterol/FL-acLDL-Komplexen impliziert wurde, konnte durch die Verwendung Lipid-spezifischer Färbungen weiter bestätigt werden. Die klassische Oil-Red-O-Färbung, welche trotz der häufigen Präzipitatbildung unter Histologen und Pathologen immer noch die Methode der Wahl darstellt, bestätigte die Einlagerung von Lipiden in den perinukleären Raum (Abbildung 17).

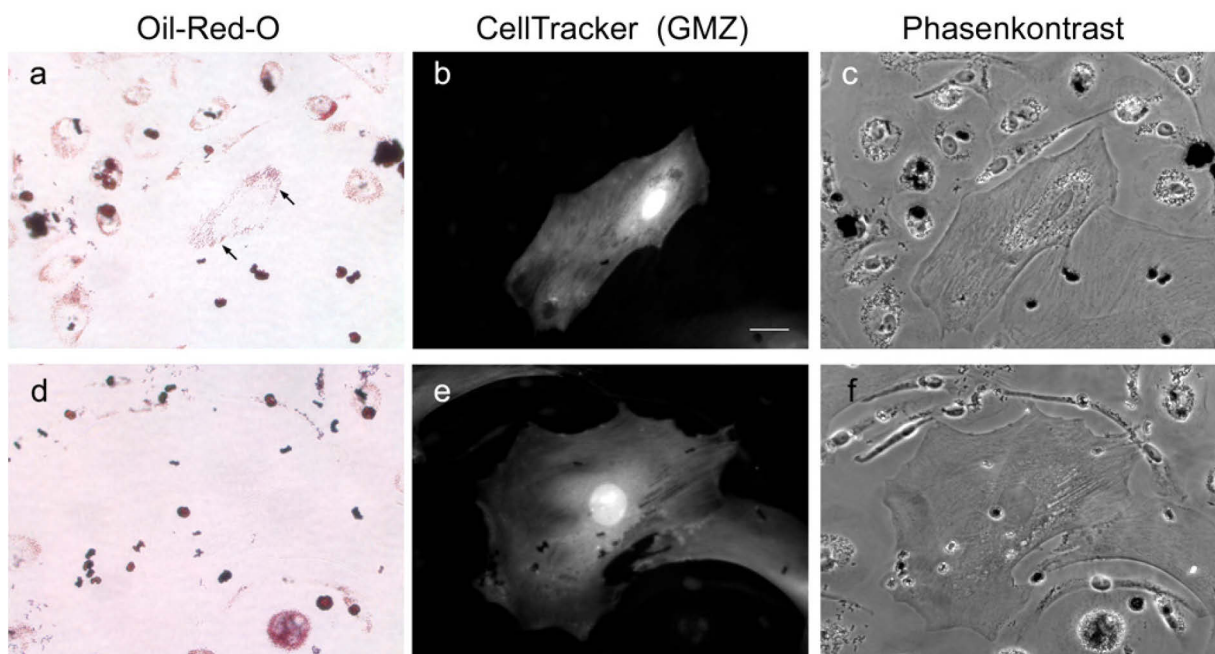


Abbildung 17: Oil-Red-O-Färbungen der Kokulturen zeigten, dass es zur Anreicherung von Lipiden in den FL-acLDL positiven glatten Gefäßmuskelzellen kommt.

Kokulturen glatter GMZ und FL-acLDL beladener MP wurden 14 Tage nach Kokulturbeginn mittels klassischer Oil-Red-O-Färbung untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Transport von FL-acLDL in die glatten GMZ zur Anreicherung von Lipiden, welche durch die rote Oil-Red-O-Färbung detektiert wurden, führte.

Die FL-acLDL positiven GMZ (a-c) ließen sich dabei hauptsächlich im perinukleären Raum (siehe Pfeile in a) mit dem lipophilem Oil-Red-O anfärben. Maßstabsbalken: 30 µm.

Die Oil-Red-O-Färbung korrelierte dabei sowohl mit der Granulierung in den Phasenkontrastbildern (c) als auch mit der Lokalisation des FL-acLDL in den immunzytochemischen Analysen (siehe Abbildung 8a). Die Identität der glatten GMZ wurde mittels CellTracker Gegenfärbung (b & e) und dem Phasenkontrast, hierbei ist im Zweifel das stark ausgeprägte Zytoskelett der GMZ zu beachten, überprüft. Im Gegensatz dazu wiesen FL-acLDL negative glatte GMZ aus der Kokultur (d-f), aber auch Kontrollen aus Einzelkulturen (hier nicht gezeigt), keine Oil-Red-O-Färbung auf (d).

Die als tief rote bis schwarze sichtbaren Verunreinigungen in den Bildern (a, c, d & f) wurden durch Präzipitate der gesättigten Oil-Red-O-Lösung verursacht und wiesen zu dem eine quentchende Eigenschaft (b & e) gegenüber dem verwendeten CellTracker CMAC auf.

Aufgrund der störenden Präzipitatbildung und der schlechteren Segmentierbarkeit von Farbbildern wurde für die Quantifizierung der Lipidtröpfchenbildung innerhalb der glatten GMZ eine fluoreszenzbasierte Methode gewählt. Nach 2 Wochen Kokultur wurden die Kokulturen mit dem für neutrale Lipide spezifischen LipidTOX™ gefärbt. Die Präparate wurden einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse zugeführt, bei der jeweils 10 zufällig gewählte FL-acLDL positive und negative GMZ dokumentiert wurden. Die Bilder wurden dann der Segmentierung und Analyse in ImageJ unterworfen und die Anzahl LipidTOX™ positiver Pixel pro Zelle bestimmt (Abbildung 18). Es zeigte sich, dass FL-acLDL negative glatte GMZ, die auch hier wieder als interne Kontrolle dienten, so gut wie keine *lipid droplet* Bildung an der Zelloberfläche zeigten. Die FL-acLDL positiven glatten GMZ wiesen hingegen eine, wenn auch stark streuende, deutliche Zunahme an Lipideinlagerungen auf.

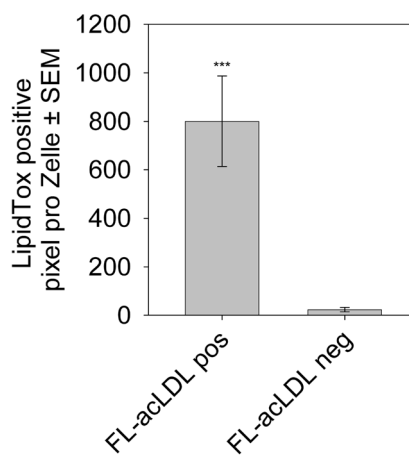


Abbildung 18: Quantifizierung der Akkumulation neutraler Lipide in glatten Gefäßmuskelzellen.

Um eine semi-automatische und Betrachter-unabhängige Quantifizierung zu realisieren, wurden nach 14 Tagen die neutralen Lipide innerhalb der Zellen mittels LipidTox dargestellt. Es wurden je Gruppe (FL-acLDL positive versus FL-acLDL negative GMZ, n=5) 10 Zellen dokumentiert und die Anzahl LipidTox positiver *pixel* nach Konvertierung in binäre Bilder durch die Anwendung eines Li-Thresholds quantifiziert. (***) $p < 0,01$)

Der schon durch die Oil-Red-O-Färbungen gewonnene Eindruck, dass FL-acLDL positive glatte GMZ Lipide einlagern, konnte hierbei bestätigt werden und ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den FL-acLDL positiven GMZ zu den FL-acLDL negativen Zellen derselben Kokultur festgestellt werden. Die starke Streuung bei den FL-acLDL positiven glatten GMZ lässt sich durch große Unterschiede bei den Zellgrößen erklären. Eine Normierung auf die Zellgröße, z.B. über eine Flächenmessung nach Segmentierung des CellTracker Signals, könnte diese Streuung minimieren.

6.5.3 Transkriptionelle Veränderungen der glatten Gefäßmuskelzellen durch den Transport von FL-acLDL in die glatten Gefäßmuskelzellen

Wie schon beim Ausschluss einer Transdifferenzierung beschrieben, ist es durch die Verwendung einer xenogenen Zellkomposition der Kokulturen möglich, die transkriptionellen Veränderungen einer der beiden Zellpopulationen mittels

Spezies-spezifischer Primer innerhalb der gesamt cDNA zu detektieren. Diese Möglichkeit wurde genutzt, um die von Rong et al. beschriebenen Veränderungen der Transkription nach Cholesterol-Stimulation auch in den Kokulturen nach erfolgtem FL-acLDL Transport zu untersuchen. Die verwendeten Primerpaare wurden vorab auf ihre Spezifität für Ratten-Transkripte ausführlich getestet. Sowohl einzeln kultivierte glatte Ratten-GMZ, als auch durch *trans-well*-Einsätze getrennte Kokulturen dienten als Negativkontrollen für die direkte Kokultur.

Es zeigte sich, dass es, korrespondierend zu den Ergebnissen von Rong et al.,⁸² zu einer anhaltenden signifikanten Herabregulation der an der Cholesterolbiosynthese beteiligten HMG-CoA-Reduktase nach 9 Tagen kam (Abbildung 19a). Die zum Vergleich eingesetzten, räumlich getrennten Kokulturen, aber auch die Einzelkulturen, zeigten keine transkriptionelle Regulation der HMG-CoA-Reduktase (Abbildung 19b).

Auch die durch Rong et al. beschriebene Hochregulation Makrophagen-typischer Transkripte, wie das CD68 und das Mac2, konnte in den Kokulturen nach 14 Tagen festgestellt werden (Abbildung 19a). Eine Aktivierung fand auch hier in den mitgeführten Negativkontrollen nicht statt (Abbildung 19b).

Eine differentielle Regulation des ebenfalls Cholesterol-sensitiven ICAM-1 konnte nicht festgestellt werden.

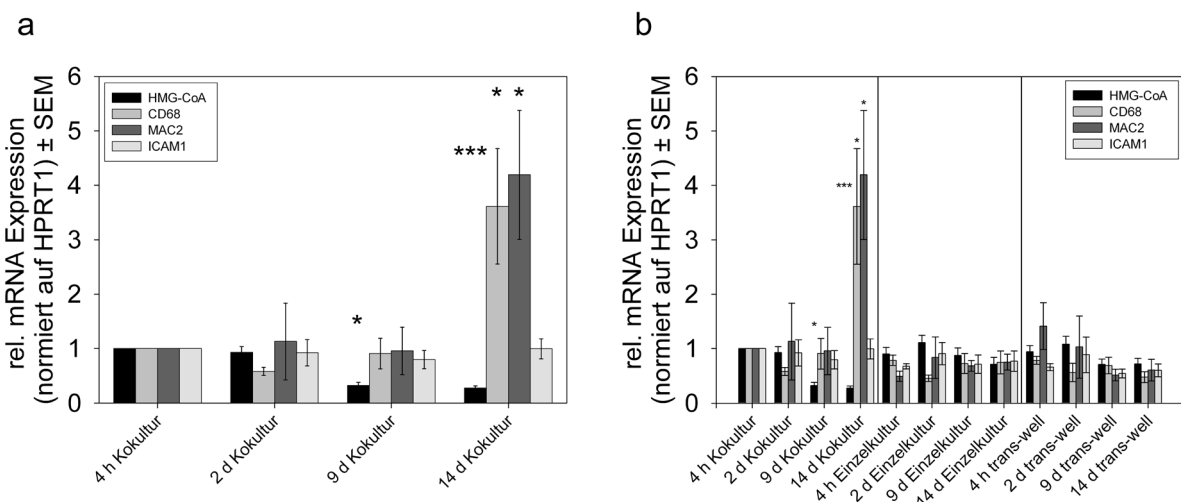


Abbildung 19: Transkriptionelle Aktivierung Makrophagen-typischer Gene in den glatten Gefäßmuskelzellen nach erfolgtem FL-acLDL Transport.

Durch die Verwendung xenogener Kokulturen, ist es möglich, mittels Spezies-spezifischen Primern zwischen der Expression der humanen MP bzw. der Ratten glatten GMZ zu diskriminieren. (a) Mittels *real-time* PCR und Ratten-spezifischen Primern konnte gezeigt werden, dass es durch den Transport des FL-acLDL von den MP in die glatten GMZ zu einer signifikant erhöhten Transkription Makrophagen-typischer Gene in den glatten GMZ kommt. Außerdem konnte eine Herabregulation der an der Cholesterolbiosynthese beteiligten HMG-CoA-Reduktase (HMG-CoA) festgestellt werden. Dies bestätigt die Arbeiten von Rong et al.⁸² und kann als zusätzlicher Beweis für den Transport von Cholesterol gemeinsam mit dem FL-acLDL gewertet werden.

(b) Die entsprechenden Kontrollen, einzeln kultivierte Ratten GMZ und über *trans-well*-Einsätze getrennte Kokulturen, zeigten keine differenzielle Regulation der untersuchten Gene.

(n=5; * p<0,05; *** p<0,01)

6.6 Transport von Membranbestandteilen der Makrophagen in glatte Gefäßmuskelzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass zuvor phagozytiertes FL-acLDL von den MP in die glatten GMZ abgegeben werden kann, stellte sich die Frage, wie das FL-acLDL in die glatten GMZ kommt und ob noch andere Zellbestandteile dabei ausgetauscht werden. Um zu Überprüfen, ob auch Zellmembranbestandteile von den MP auf die GMZ übertragen werden, wurde die Membran der für die Kokultur verwendeten MP in der vorhergehenden Einzelkultur mittels Dil bzw. DiO gefärbt. Den einzelkultivierten membrangefärbten MP wurde dann FL-acLDL zur Phagozytose angeboten.

In Vorexperimenten zeigte sich, dass neben der Zelloberfläche der MP auch die während der Phagozytose von der Oberfläche abgeschnürten Endosomen bzw. Lysosomen den Membranfarbstoff enthalten. Es konnte sogar eine erhöhte Fluoreszenzintensität innerhalb der mit dem FL-acLDL kolokalen Endosomen/Lysosomen festgestellt werden. Diese könnte zum einen auf eine höhere lokale Konzentration innerhalb der Endosomen/Lysosomen, aber auch auf die Veränderung des pH-Werts innerhalb der Endosomen/Lysosomen zurückzuführen sein, da die Quanteneffizienz eines Fluorophors von der Umgebung abhängt.

Durch die Verwendung der membrangefärbten FL-acLDL-markierten MP in der Kokultur konnte nicht nur gezeigt werden, dass Membranbestandteile mit dem FL-acLDL von den MP in die GMZ transportiert werden, sondern, dass auch nicht FL-acLDL-gefüllte Endosomen/Lysosomen der MP in den glatten GMZ vorliegt (siehe Abbildung 20).

Es konnte dabei aber kein direkter Übergang des membrangebundenen Fluoreszenzfarbstoffs, wie dies z.B. von Blumenthal et al. für Membranfusionen beschrieben wurde,¹⁰⁵ beobachtet werden.

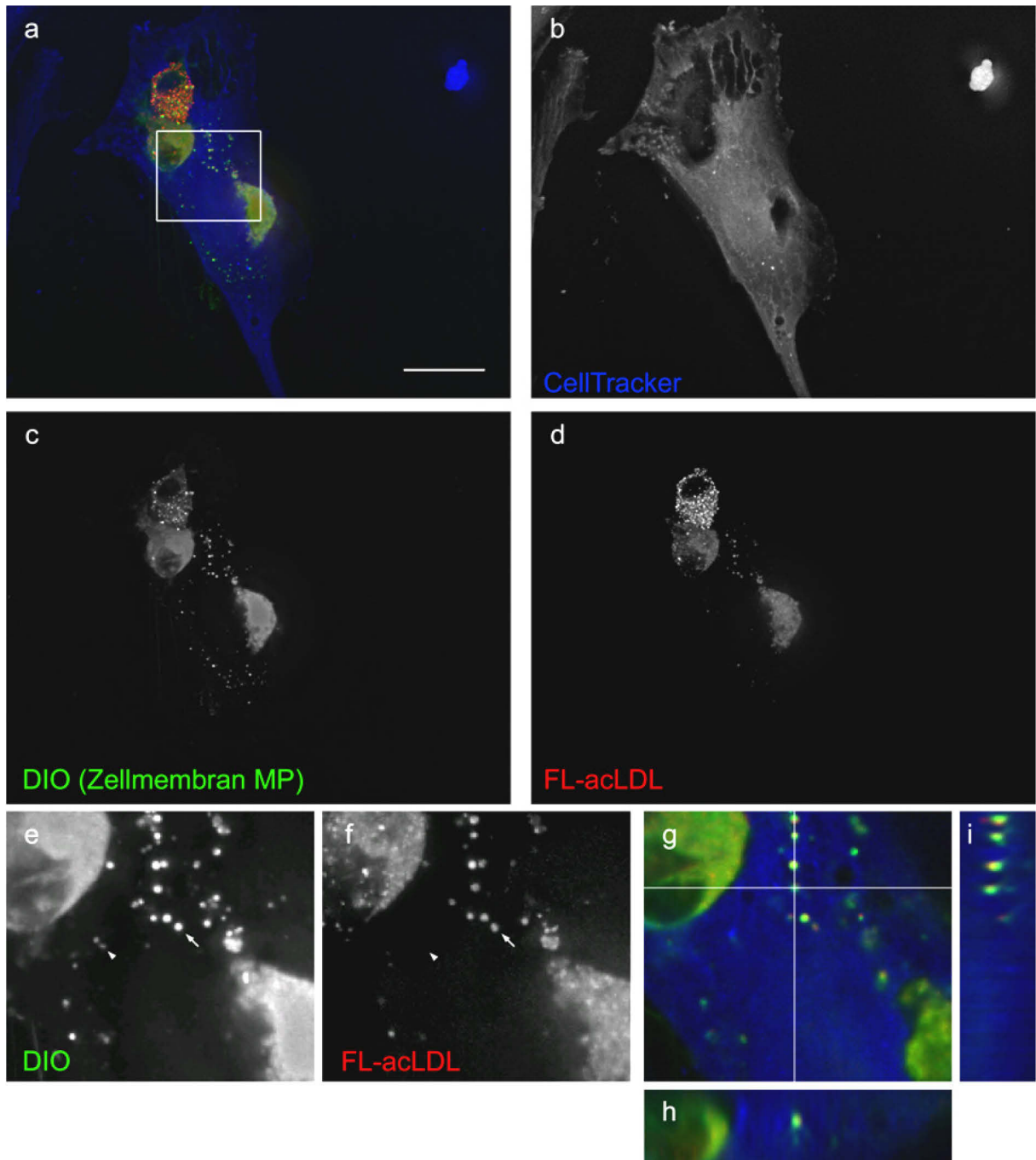


Abbildung 20: Transport von Membranbestandteilen und FL-acLDL negativen Makrophagenbestandteilen in glatte Gefäßmuskelzellen.

Aufgrund der fehlenden Kontrastierbarkeit von MP mittels Phasenkontrast an dem Axiovert 100 und zur Untersuchung der Rolle der Zellmembran der MP wurden die MP in Einzelkultur durch den mit Alkylankern funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoff, dem Vybrant® DiO, an der Membran angefärbt. Nach der Färbung wurden die MP mit FL-acLDL beladen. Durch die Einstülpung der Zellmembran während der Phagozytose wurden die entstehenden Endosomen/Lysosomen sowohl positiv für das FL-acLDL (hier in rot) als auch für das auf der Zellmembran schwimmende DiO (grün). Die so angefärbten und beladenen MP wurden nun mit CellTracker gegengefärbten glatten GMZ kokultiviert. Es konnten dabei glatte GMZ dokumentiert werden, die sowohl FL-acLDL/DiO positive aber auch ausschließlich DiO positive Vesikel enthielten. Der *merge* (a) zeigt eine Maximum-Intensitäts-Projektion der einzelnen Färbungen, (b) CellTracker Gegenfärbung glatter GMZ, (c) DiO Membranfärbung der MP und (d) FL-acLDL, hier wieder als Maximum-Intensität-Projektionen dargestellt. Maßstabsbalken: 30 μm . Die ROI in (a) markiert die in (e & f) dargestellten Volumina. Es konnte dabei dokumentiert werden, dass sowohl DiO einzeln positive (**Pfeilkopf**) aber auch FL-acLDL/DiO-doppelt positive Vesikel (**Pfeil**) in die glatten GMZ transportiert wurden. Die intrazelluläre Lokalisation innerhalb der glatten GMZ ist hier durch die Darstellung der orthologen Ebenen (**X-Z, Y-Z Schnitte h & i**) entlang der Schnittlinien in dem *merge* der ROI (g) gezeigt.

6.7 Subzelluläre Lokalisation des FL-acLDL innerhalb der glatten Gefäßmuskelzellen

Um festzustellen, in welchem subzellulären Kompartiment der glatten GMZ sich das FL-acLDL befand, wurden verschiedene Organellen der GMZ mittels spezifischer Farbstoffe oder der Expression von Fusionsproteinen, bestehend aus Lokalisationssequenz und Fluoreszenzreporterprotein, eingesetzt. Zum besseren Verständnis der verwendeten Marker sei hier auf die modifizierte Abbildung 6, Seite 51, nach Seachrist und Ferguson verwiesen.¹¹⁰

Durch die Verwendung des acidotropen LysoTrackers™ in Verbindung mit dreidimensionaler *live-cell* Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass sich zwar ein Teil des von den MP in die glatten GMZ transportierten FL-acLDL in den aciden Lysosomen befand, aber der größere Teil nicht mit dem Signal des LysoTrackers™ kolokal war (Abbildung 21a-e).

Die Expression von LAMP-1-RFP innerhalb der glatten GMZ färbte nun, im Gegensatz zum LysoTracker™, der nur acide Lysosomen färbt, alle Lysosomen der glatten Gefäßmuskelzellen. Die Verwendung beider Lysosomenmarkierungen in Vorversuchen mit glatten GMZ zeigte, dass nur ein geringer Teil von ca. 20% - 30% aller LAMP-1 positiven Lysosomen einen so niedrigen pH-Wert aufweisen, dass sie sich mit LysoTracker™ anfärben ließen. Durch die Expression des LAMP-1-RFP Reporters konnte eine nahezu perfekte Kolokalisation zwischen den RFP-markierten Lysosomen und dem in der glatten GMZ befindlichen FL-acLDL festgestellt werden (Abbildung 21f-j). Die Messung der Kolokalisation mittels der qualitativen Methode, in Bezug auf die Fluoreszenzintensität, nach Manders¹²⁶ innerhalb des mikroskopischen Volumens ergab einen M1-Koeffizienten (grün überlappt mit rot) von 0,93 innerhalb der hier gezeigten ROI. Im Mittel überlappten 90% aller Voxel im grünen Fluoreszenzkanal des für diese Versuche verwendeten FL-acLDL mit den roten Markierungen der Lysosomen. Die nicht perfekte Kolokalisation zwischen dem FL-acLDL und den Lysosomen könnte von der relativ schnellen subzellulären Bewegung der Zellorganellen während dieser Aufnahmen herrühren. Die Messung der Kolokalisation der Lysosomen mit dem FL-acLDL ergab ein M2 von 0,45. Dies lässt den Schluss zu, dass sich das gesamte FL-acLDL innerhalb der Lysosomen der glatten GMZ befindet, nicht jedoch jedes Lysosomen auch mit FL-acLDL gefüllt ist.

Um die Frage zu beantworten, wie das FL-acLDL in die Lysosomen der glatten GMZ gekommen ist, wurde ein Reporter für die frühen Endosomen, ein Rab5a-GFP Fusionsprotein, in den glatten GMZ exprimiert. Erstaunlicherweise konnte zu keinem

Zeitpunkt der Kokultur eine Kolokalisation zwischen dem Rab5a-GFP Reporter und dem FL-acLDL festgestellt werden (Abbildung 21k-o). Dies zeigt, dass das intrazelluläre FL-acLDL nicht über einen endosomal Phagozytoseweg in die glatten GMZ gelangte.

Zur Kontrolle der Ergebnisse mit dem Rab5a-GFP Reporter wurden zusätzlich Endothelzellen, welche FL-acLDL aus dem Kulturmedium aufnehmen können, als positive Kontrolle verwendet. Hierbei zeigte sich eine deutliche Assoziation zwischen dem FL-acLDL Signal und dem Rab5a-GFP.

Eine Assoziation mit anderen Zellorganellen, wie Peroxisomen, Mitochondrien oder dem Golgi-Apparat, konnte nicht festgestellt werden (Daten hier nicht gezeigt).

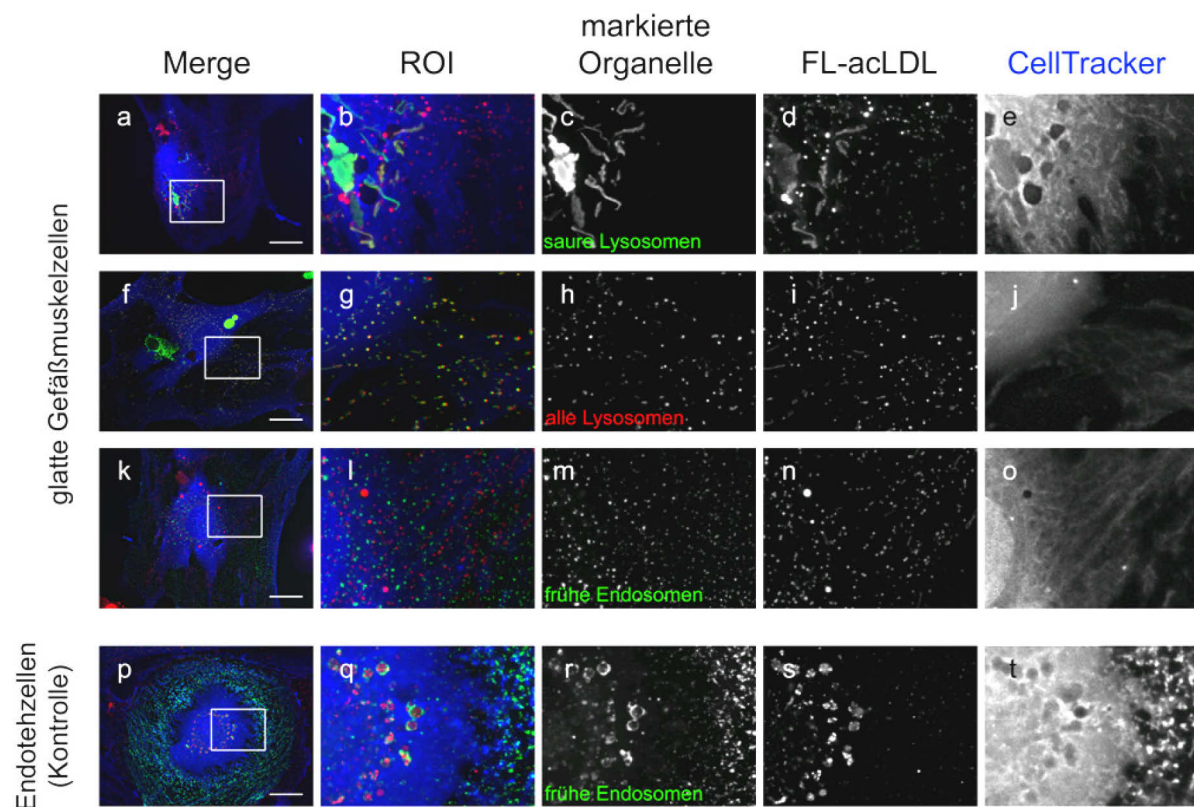


Abbildung 21: Subzelluläre Lokalisation des fluoreszenzmarkierten acLDL innerhalb der glatten Gefäßmuskelzellen.

Um die Frage der subzellulären Lokalisation des FL-acLDL in den glatten GMZ beantworten zu können, wurden mittels spezifischer Farbstoffe bzw. der Expression Organell-spezifisch markierter Fluoreszenzproteine in den glatten GMZ, die verschiedenen Zellorganellen dargestellt.

Die **erste Spalte** zeigt jeweils die Maximum-Intensitäts-Projektionen der jeweiligen mikroskopischen Volumen. Maßstabsbalken: 30 μ m. Die **zweite Spalte** zeigt die Maximum-Intensitäts-Projektionen aller Fluoreszenzkanäle der jeweils in Bildern der ersten Zeile markierten ROI mit einem Volumen von 48 x 36 x 13,1 μ m. Die **dritte Spalte** zeigt den Kanal der jeweils untersuchten Zellorganelle; **(c)** saure Lysosomen, dargestellt durch LysoTracker™; **(h)** alle Lysosomen, dargestellt durch die Expression einer LAMP-1-RFP Fusion; **(m)** frühe Endosomen, dargestellt durch die Expression einer Rab5a-GFP Fusion; Die **vierte Spalte** das von den MP in die glatten GMZ transportierte **(d, i & n)** bzw. das von den Endothelzellen **(s)**, welche als Kontrolle für das Rab5a-GFP eingesetzt wurden, direkt aus dem Kulturmedium phagozytierte FL-acLDL. Die **fünfte Spalte** zeigt die jeweilige CellTacker Gegenfärbung der zu untersuchenden Zellen.

Es konnte eine teilweise Kolokalisation zwischen den sauren Lysosomen und dem FL-acLDL Signal beobachtet werden. Durch die Färbung aller Lysosomen konnte eine nahezu perfekte Kolokalisation zwischen dem Lysosomenmarker LAMP-1 und dem FL-acLDL festgestellt werden. Erstaunlicherweise konnte zu keinem Zeitpunkt eine Kolokalisation zwischen dem frühen Endosomen-Marker Rab5a und dem FL-acLDL festgestellt werden.

Die entsprechende Kontrolle, arterielle Endothelzellen, welche auf Grund ihres Rezeptorbesatzes in der Lage sind FL-acLDL direkt aus dem Medium aufzunehmen, zeigten in Gegensatz zu den glatten GMZ eine deutlich Assoziation zwischen den Rab5 besetzten Endosomen und dem FL-acLDL Signal. Der Leser der dieser Arbeit auf CD beiliegenden PDF-Datei kann durch Mausklick auf die Abbildung (g) und (q) die dort hinterlegten Filme der dreidimensionalen Rekonstruktionen starten.

6.8 Transport intakter Lysosomen von den Makrophagen in die glatten Gefäßmuskelzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das durch die MP phagozytierte FL-acLDL in der Kokultur durch Zell-Zell-Kontakte auf die glatten GMZ übertragen wurde, stellte sich die Frage, ob dies durch einen Transport der Lysosomen von einer Zelle in die andere geschehen konnte. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Lysosomen der MP durch die Expression eines Lysosomen-spezifischen Reporterkonstrukts, LAMP-1-mKate2, markiert. Da primäre MP zu den schlecht transfizierbaren Zellen gehören, wurde für die Expression ein adenoviral-basiertes Expressionssystem verwendet. In Vorversuchen, siehe Abbildung 22, zeigte sich, dass in MP zur Phagozytose angebotenes FL-acLDL in LAMP-1-mKate2 markierten Lysosomen vorlag. Dabei ist zu beachten, dass das FL-acLDL sich innerhalb der Lysosomen befand und das LAMP-1 mit der Membran der Lysosomen assoziiert ist. Dies stimmte auch mit den Ergebnissen der hier gezeigten Fluoreszenzmikroskopie überein.

Ein sich schon in diesen Vorversuchen zeigendes Problem bei der starken Überexpression des LAMP-1-mKate2 Reporters war, dass es bei hohen adenoviralen Titern und somit auch hoher Expression in den Makrophagen zu unphysiologischen Veränderungen in der Ausgestaltung der Lysosomen kam. Daher wurde die M.O.I. gesenkt, was zur Folge hatte, dass nicht mehr alle MP der Einzelkultur den LAMP-1-mKate2 Reporter exprimierten. Es konnten deshalb nur MP eingesetzt werden, die zwar alle FL-acLDL positiv waren, von denen aber nur ein Teil auch den LAMP-1-mKate2 Reporter in ausreichender Menge aufwies.

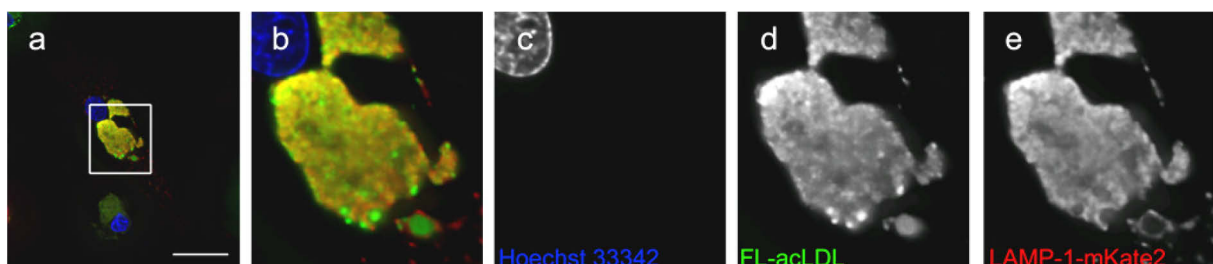


Abbildung 22: Darstellung von Lysosomen in Makrophagen mittels Expression einer LAMP-1-mKate2 Fusion.

Zur Darstellung der Lysosomen innerhalb lebender MP wurde auf Grund ihrer schlechten Transfizierbarkeit ein replikationsdefizientes Adenovirus hergestellt, welches für eine Fusion des Lysosomen-Markers LAMP-1 und dem tief rot fluoreszierenden mKate2 kodiert. Die Infektion von MP

und die anschließende Beladung der Zellen mit FL-acLDL führte zur Assoziation der Fluoreszenzsignale des membranösen LAMP-1 und des FL-acLDL.

Die Abbildung (a) zeigt die Maximum-Intensitäts-Projektion zweier infizierter und mit FL-acLDL beladener MP, die zur zusätzlichen Orientierung mittels Hoechst 33342 in den Kernen gefärbt wurden. Der weiße Rahmen beschreibt die ROI des Volumens der folgenden Projektionen (b-e). Maßstabsbalken: 30 µm.

Die Maximum-Intensitäts-Projektion des *merge* der ROI (b) mit einem Volumen von 31,5 x 35 x 13,1 µm zeigt dabei die Lokalisierung des Kerns (c) und beweist die Internalisierung des FL-acLDL (d) in die LAMP-1-mKate2 positiven Lysosomen (e). Deutlich war hierbei auch die membranöse Lokalisation des LAMP-1-mKate2 bei größeren Lysosomen (wie z.B. in (e) unten rechts) zu beobachten.

Der Leser der dieser Arbeit auf CD beiliegenden PDF-Datei kann durch Mausklick auf die Abbildung (a) den dort hinterlegten Film der dreidimensionalen Rekonstruktion starten.

Solch doppelt, FL-acLDL und LAMP-1-mKate2, markierte MP wurden nun mit CellTracker gefärbten glatten GMZ kokultiviert. Nach wenigen Tagen konnte der Transport des FL-acLDL beobachtet werden. Außerdem fanden sich GMZ innerhalb der Kokultur, die neben dem FL-acLDL auch den initial in den MP exprimierten lysosomalen LAMP-1-mKate2 Reporter aufwiesen. Auch konnte man eine Assoziation des LAMP-1-mKate2 mit dem FL-acLDL beobachten, hier gezeigt in Abbildung 23h-j, wie diese zuvor in den Makrophagen zu beobachten war. Leider ist es bisher nicht gelungen den Übertritt der intakten LAMP-1-mKate2 markierten und FL-acLDL gefüllten Lysosomen von den MP in die glatten GMZ in einer hochaufgelösten *time-lapse* Zeitserie zu verfolgen.

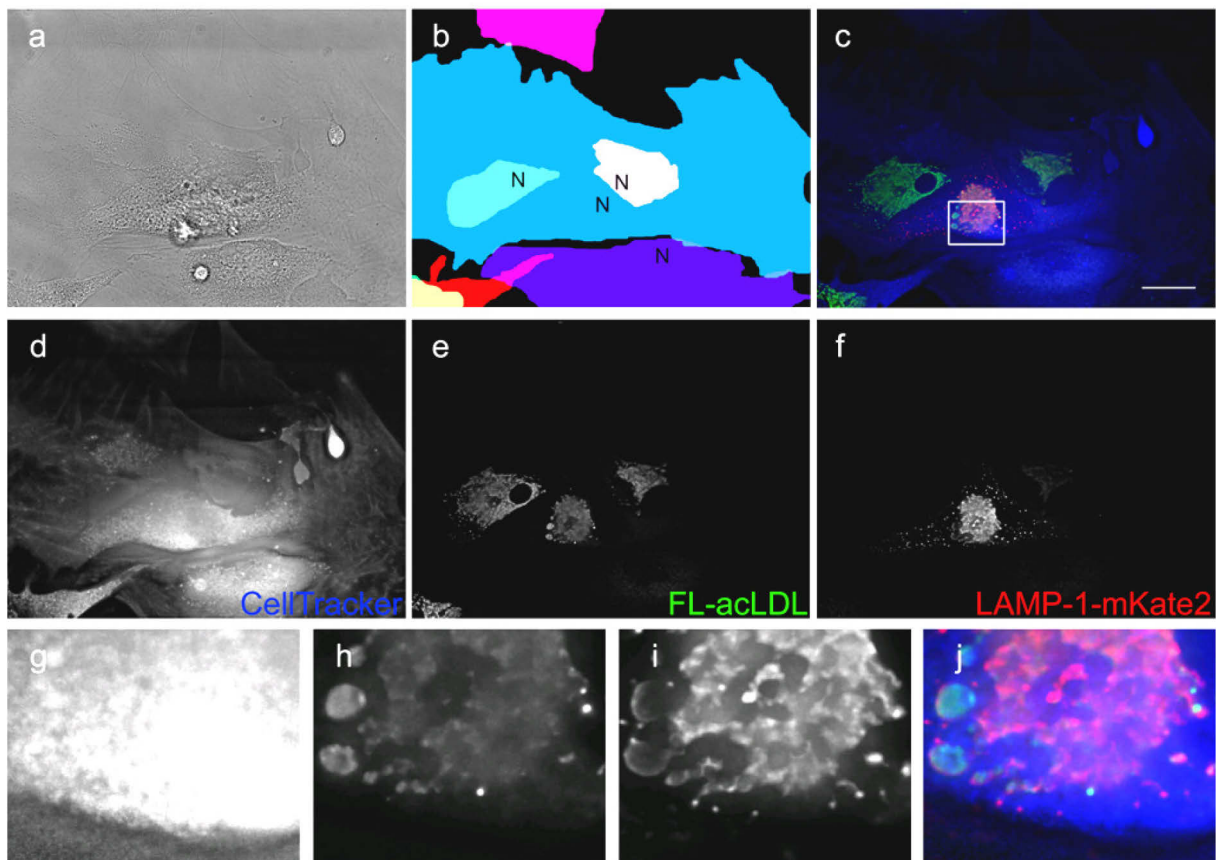


Abbildung 23: Transport intakter FL-acLDL gefüllter Lysosomen aus Makrophagen in die glatten Gefäßmuskelzellen.

Mittels der Infektion mit einem für LAMP-1-mKate2 kodierenden Adenovirus wurden die Lysosomen innerhalb der MP durch das rot fluoreszierende mKate2 dargestellt und anschließend mit FL-acLDL

beladen. Die so doppelt markierten MP wurden anschließend mit CellTracker gegengefärbten glatten GMZ kokultiviert.

(a) Durchlichtbild zur Orientierung. (b) Darstellung der Zellkomposition durch Bildsegmentierung, hellblau die vom Transport betroffene glatte GMZ, dunkelblau, pink und rot umgebende glatte GMZ, gelb, türkis und rosa MP. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit einem N markiert. (c & j) Maximum-Intensitäts-Projektionen des 223 x 167 x 12,3 µm großen Volumens, bzw. der in (c) markierten ROI (g-j, 29,8 x 24 x 12,3 µm) als *merge*. Maßstabsbalken: 30 µm. (e & h) Das ursprünglich in den Makrophagen vorliegende FL-acLDL konnte innerhalb der vom Transport betroffenen glatten GMZ nachgewiesen werden. (f & i) Das ursprünglich in den MP exprimierte LAMP-1-mKate2 konnte, assoziiert mit dem transportierten FL-acLDL, innerhalb der glatten GMZ dokumentiert werden. Auch hier lässt sich die schon in Abbildung 22 deutliche Assoziation des LAMP-1-mKate2 an der Membran der Lysosomen mit dem FL-acLDL in den Lysosomen erkennen. Es ist zu bemerken, dass die Belichtungszeit bei diesem Z-Stapel an den Signalen der glatten GMZ adjustiert wurde, und dass daher das LAMP-1-mKate2 Signal in dem rechten Makrophagen (in b rosa maskiert) nur als schwaches Signal dokumentiert werden konnte. Die Gegenfärbung mit CellTracker der glatten GMZ (d & g) wie auch die Maximum-Intensitäts-Projektion der ROI (j) zeigten die intrazelluläre Lokalisation des FL-acLDL und LAMP-1-mKate2 Signals in der glatten GMZ. Dies lässt darauf schließen, dass es zum Transport intakter und in den Makrophagen maturierten LAMP-1-mKate2 positiver Lysosomen in die glatten GMZ gekommen ist.

Der Leser der dieser Arbeit auf CD beiliegenden PDF-Datei kann durch Mausklick auf die Abbildung (a) den dort hinterlegten Film der dreidimensionalen Rekonstruktion starten.

7 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich beim Auftreten FL-acLDL markierter Gefäßmuskelzellen innerhalb der Kokultur nicht um eine Transdifferenzierung FL-acLDL markierter Makrophagen handelt, sondern um den Transport des FL-acLDL aus den MP in die glatten GMZ. Eine Transdifferenzierung konnte mittels GFP-exprimierenden GMZ, *time-lapse* Mikroskopie und *real-time* PCR humaner GMZ-spezifischer Transkripte in xenogenen Kokulturen sicher ausgeschlossen werden.

Neben dem FL-acLDL war es auch möglich, den Kotransport von Cholesterol aus den MP in die glatten GMZ nachzuweisen. Die GMZ nahmen dabei einen schaumzellähnlichen Phänotyp an, der sich durch die Einlagerung von vakuolisierten Lipiden im perinukleären Raum sowie die Bildung von *lipid droplets* an der Zelloberfläche auszeichnete. Diese phänotypische Veränderung konnte zudem durch die Expression MP-typischer Gene sowie eine erhöhte Phagozytoseaktivität charakterisiert werden.

Durch die subzelluläre Lokalisation wurde gezeigt, dass das transportierte FL-acLDL in den glatten GMZ in den Lysosomen vorlag. Eine Aufnahme durch von MP gebildete Exosomen durch Phagozytose und der anschließende Transport über Rab5a positive frühe Endosomen konnte ausgeschlossen werden. Stattdessen konnte mittels Markierung der in den MP entstandenen Lysosomen mittels Membranfarbstoffen und der Expression von LAMP-1-mKate2 in den MP gezeigt werden, dass es sich bei dem Transport um den Transfer vollständiger und funktionaler Lysosomen von den MP in die glatten GMZ handelt.

7.1 Transdifferenzierung von Monozyten/Makrophagen in glatte Gefäßmuskelzellen

Der mögliche hämatopoetische Ursprung einiger glatter GMZ in der atherosklerotischen Plaque wurde inspiriert durch die Entdeckung der im Blut zirkulierenden EPC durch Asahara et al 1997.⁴² Simper und Kollegen konnten im Jahr 2002 im Blut gesunder Spender erstmals Vorläuferzellen nachweisen, die *in-vitro* sowohl zu Zellen differenziert werden konnten, die Marker für Endothelzellen exprimierten, als auch in Zellen, welche Marker für glatte GMZ exprimierten.⁵¹ Im Jahr 2003 konnten diese Befunde durch eine Studie von Caplice et al. im Menschen

bestätigt werden.⁵² Beide Studien weisen jedoch, wie schon in der Einleitung erwähnt, experimentelle Defizite auf.

Die eigentliche Frage bei der Betrachtung von Transdifferenzierung einer Zellpopulation ist die Charakterisierung der Zielzellpopulation, ebenso wie die Klärung welche und wie viele Kriterien für die valide Aussage einer erfolgten Transdifferenzierung notwendig sind. So wurde in o.g. Studien ausschließlich die Expression verschiedener Markerproteine für die Beschreibung der Transdifferenzierung von hämatopoetischen Zellen in glatte GMZ verwendet. Lange Zeit wurden in der Tat Gefäßmuskel-spezifische Splicevarianten von Proteinen des kontraktiven Apparats, wie smooth muscle α -actin⁵⁷⁻⁵⁹, smooth muscle myosin heavy chain⁶⁰⁻⁶³, h1-calponin,^{64, 65} h-caldesmon⁶⁶ und smooth muscle 22- α ^{63, 67, 68} als spezifische Gefäßmuskelzell-Marker angesehen. Jedoch muss festgestellt werden, dass diese Markerproteine weder permanent in glatten GMZ exprimiert sind,¹²⁷⁻¹²⁹ noch die Expression, bis auf smooth muscle myosin heavy chain, exklusiv auf glatte GMZ begrenzt ist.^{75, 76} So wurden zum Beispiel in atherosklerotischen Läsionen Zellen beschrieben, die eine gleichzeitige Expression des Makrophagen-Markers CD68 und des Gefäßmuskelzell-Markers smooth muscle α -actin aufwiesen.¹³⁰ Gleichzeitig wurden aber aus Monozyten differenzierte MP beschrieben, die Marker sowohl für Endothelzellen, wie den von-Willebrand-Faktor oder VE-Cadherin, als auch Makrophagen typische Marker wie CD45 und CD68 *in-vitro* koexprimierten.⁴⁷ Auch wenn die Identität einer Zelle sicherlich mit der Expression bestimmter Marker auf Proteinebene beschrieben werden kann, so ist eine Charakterisierung spezifischer zellulärer Funktionen, zumindest *in-vitro*, sicherlich eine bessere und zuverlässigere Variante. Die Beschreibung des funktionellen Phänotyps, wie z.B. die Angiotensin-vermittelte Längenreduktion oder der Besatz mit spezifischen Ionen-Kanälen, scheuten jedoch viele Autoren, die eine Transdifferenzierung hämatopoetischer Zellen in glatte Gefäßmuskelzellen beschrieben.

In-vivo sind solche funktionalen Beschreibungen transdifferenzierter hämatopoetischer Zellen innerhalb der atherosklerotischen Plaque natürlich ungleich schwieriger. Tiermodelle, die benutzt wurden, um Hinweise auf eine Differenzierung hämatopoetischer Zellen zu Endothelzellen oder glatte GMZ zu finden, beruhen meist auf der Generierung von Mäusen mit chimärem Knochenmark. Dazu wurden Mäuse durch Bestrahlung und anschließende Transplantation mit Knochenmark von GFP-positiven Mäusen innerhalb der hämatopoetischen Zellpopulation markiert. Nach dem erfolgreichen Anwachsen des Knochenmarks wurden die Mäuse z.B. in einem gefäßproliferativen Modell, wie der Gefäßdilatation, verwendet und

anschließend der lichtmikroskopischen Analyse zugeführt.⁷⁰ Die experimentellen Schwierigkeiten dieses Ansatzes ergeben sich hierbei vor allem durch Probleme bei der Fixierung, wie sie von Daniel et al. beschrieben wurden,⁷³ der Autofluoreszenz der atherosklerotischen Plaque, der Überlagerung verschiedener Zellen im histologischen Schnitt, sowie der schlechten Auflösung in Z-Richtung bei der lichtmikroskopischen Analyse. Einzig Sata et al. zeigten auch elektronenmikroskopische Bilder immunogold-gefärbter Präparate,⁷⁰ deren Ergebnisse unter Berücksichtigung der aktuellen Literaturlage, welche zunehmend die Möglichkeit der Transdifferenzierung hämatopoetischer Zellen zu glatten GMZ bezweifelt,⁷¹⁻⁷⁴ aber zu hinterfragen sind. Bemerkenswert ist hierbei vor allem, dass Jahre später eine Studie, an der Sata selbst beteiligt war, zu diesem Schluss kommt.⁷⁴

Sowohl die in der Literatur vorliegenden *in-vivo* Studien von Bentzon et al.^{71, 72} und Iwata et al.⁷⁴ als auch eine Studie⁷³, die in einer Kooperation mit dem Labor von Professor Sedding am Universitätsklinikum Giessen und Marburg durchgeführt wurde, kommen übereinstimmend zu dem Schluss, dass es, wenn überhaupt, zu keiner nennenswerten oder klinisch relevanten Transdifferenzierung hämatopoetischer Zellen in glatte GMZ während der Entstehung und Progression der atherosklerotischen Plaque kommt.

Dies bestätigen auch die in der hier vorliegenden Studie vorgestellten *in-vitro* Daten. Es kommt durch Stimulation von Monozyten/Makrophagen durch lösliche Faktoren bzw. vorkonditioniertes Medium zu keiner Transdifferenzierung in glatte GMZ. Die in der Literatur durch Martin et al.⁷⁵ und Stewart et al.⁷⁶ beschriebenen *smooth muscle α-actin* Expressionen hämatopoetischer Zellen, die mittels Dichtegradientenisolation gewonnen wurden, stehen zwar im Widerspruch zu diesem Ergebnis, konnten jedoch bis heute von den Autoren nicht *in-vivo* bestätigt werden.

Die Abbildung, in der Stewart et al. die Expression von *smooth muscle α-actin* belegen, zeigt zudem nicht die für das Zytoskelett typische fibrilläre Struktur. Auch arbeiteten Martin et al. nicht mit humanen Zellen, sondern mit Blutproben aus dem Hausschwein. Es bleibt fraglich, ob die beschriebene Expression eine mögliche Artefakt bzw. eine Stressreaktion der Zellen auf die Stimulation ist. Ebenfalls denkbar ist eine Kontamination der Blutproben mit Zellen der Gefäßwand während der Punktion des Gefäßes. Dafür spricht die durchgeführte funktionelle Charakterisierung und die Kontraktion in Reaktion auf eine 10 nM Stimulation mit Angiotensin II, wie sie durch Stewart beschrieben wurde.⁷⁶

7.2 Ausschluss einer Transdifferenzierung *in-vitro*

Die in dem Kokultur-Modell zuerst beobachtete scheinbare Transdifferenzierung von FL-acLDL markierten MP ließ sich auf den Transport der Markierung zwischen MP und glatten GMZ zurückführen.

Durch die Verwendung Spezies-spezifischer Primer war es möglich, die Expression der beiden Zellpopulationen, glatte GMZ aus der Ratte und humane MP, getrennt in der quantitativen *real-time* PCR zu untersuchen. Es zeigte sich, dass smooth muscle α -actin ein relativ schlechter Marker für glatte GMZ auf RNA-Ebene ist, da eine Expression sowohl in der Kokultur, als auch bei MP in Einzelkulturen nachzuweisen war. Da smooth muscle α -actin zumindest in MP-Einzelkulturen, die eine ähnlich hohe, nicht signifikant unterschiedliche Expression zu den Kokulturen zeigten, nicht durch entsprechende immunozytochemische Färbungen nachweisbar war, scheint es sich hier um eine post-transkriptionelle Regulation zu handeln. Wie schon beschrieben, handelt es sich aber bei smooth muscle α -actin um einen relativ schlechten GMZ-Marker, der durchaus auch in diversen anderen Zelltypen zu finden ist.⁹³ Die Untersuchungen zur Expression spezifischerer Marker, wie smooth muscle 22- α sowie glattmuskulärer Splicevarianten von Caldesmon und Calponin, zeigten jedoch, dass es zu keiner Expression GMZ-spezifischer Gene in den MP der Kokultur kam.

Durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter *beads*, der wiederholten Beobachtung von Kokulturen zu zeitlich schlecht aufgelösten *time-lapse* Bildserien, sowie die Verwendung von GMZ aus GFP-Mäusen konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie eine Transdifferenzierung endgültig ausgeschlossen werden.

Dieses Ergebnis passt zu der Entwicklung in der aktuelleren Literatur zur *in-vivo* Transdifferenzierung, die vorab diskutiert wurde.

7.3 Schaumzellbildung aus Gefäßmuskelzellen

Das Konzept einer stabilen bzw. instabilen oder vulnerablen atherosklerotischen Plaque geht von der Annahme aus, dass Plaque, die von einer intakten, gleichförmig aus mehreren Zellschichten glatter GMZ bestehenden fibrösen Kappe bedeckt sind, vor einer Ruptur geschützt sind. Im Gegensatz dazu wird einer Plaque, die eine relativ dünne fibröse Kappe, unter 65 μm , und einen hohen MP-Anteil aufweist, eine gewisse Instabilität nachgesagt.¹³¹ Dieses Konzept stützt sich dabei vor allem auf histologische und mittels Ultraschallkatheter, dem sog. IVUS, *intravascular*

ultrasound, gewonnenen Befunden. IVUS-Untersuchungen ermöglichen dabei sogar mittels der unterschiedlichen Reflektion des Ultraschalls verschiedener Gefäß- bzw. Plaquebestandteile eine sog. virtuelle Histologie, welche eine grobe Quantifizierung der nekrotischen, der fettreichen, der fibrösen und der verkalkten Anteile zulässt.¹³²

Die IVUS-Untersuchungen ermöglichen damit auch erstmals die Möglichkeit, mit relativ einfachem instrumentellen Aufwand relativ hoch aufgelöst einen Verlauf atherosklerotischer Plaqueentwicklung und -zusammensetzung aufzuzeichnen.¹³³

Allerdings wird das Konzept der die Plaque-stabilisierenden GMZ durch die Erkenntnis um die Beteiligung der glatten GMZ auch an Plaque-destabilisierenden Prozessen in Frage gestellt. So ist bekannt, dass glatte GMZ durch die Expression und Sekretion diverser Wachstumsfaktoren, Zytokine und MMP auch an der Destabilisierung der atherosklerotischen Plaque beteiligt sind.¹³⁴⁻¹³⁶ Wenn man jedoch in Betracht zieht, dass die Expression von MMP durch den Zell-Zell-Kontakt mit Monozyten¹³⁷, aber auch die Expression von MMP als eine Reaktion der glatten GMZ auf die in der Plaque freigesetzten Wachstumsfaktoren durch eingewanderte Entzündungszellen erhöht werden,^{138, 139} kann man schon davon ausgehen, dass eine gefäßmuskelreiche Plaque stabiler ist als eine, die eher durch entzündliche Zellen, Schaumzellen und nekrotischen Kern gekennzeichnet ist.

Jedoch konnten Ross und Kollegen in der Vergangenheit mittels Elektronenmikroskopie zeigen, dass auch glatte Gefäßmuskelzellen sich zu schaumzellähnlichen Zellen entwickeln können.^{3, 22} Trotz dieser Beobachtung ist festzustellen, dass die Mehrheit der Schaumzellen in der atherosklerotischen Plaque auf eingewanderte Makrophagen zurückzuführen ist. Ob diese auch wirklich ursächlich für die Destabilisierung der Plaque verantwortlich sind, bleibt auf Grund des langsamen Krankheitsverlaufes und der nur mäßigen temporalen Auflösung vorhandener Zeitreihen in der Literatur unklar. Die Destabilisierung der Plaque wird häufig mit dem Dünnwerden des zellulären Verbands und der Degradation der extrazellulären Matrix innerhalb der fibrösen Kappe, die den nekrotischen Kern abschließt, in Verbindung gebracht.^{30, 38, 131, 132} Es wäre aber auch denkbar, dass die schützenden glatten GMZ über den Krankheitsverlauf langsam zu Schaumzellen transformiert werden, wie dies *in-vitro* durch die Beladung glatter GMZ mit Cholesterol gezeigt werden konnte.⁸² Zudem gibt es Beschreibungen, dass unter bestimmten Bedingungen innerhalb der Plaque über die Hochregulation von Rezeptoren auf glatten GMZ, wie dem für natives LDL,¹⁴⁰ CD36,^{92, 141} und der Typ I und Typ II *scavenger* Rezeptoren,^{141, 142} die Aufnahme von modifiziertem freien LDL/Cholesterol aus der Umgebung möglich sein könnte.

Des Weiteren wurde eine Abhängigkeit gewisser LDL-Rezeptor-Regulationen vom niedrigen Sauerstoffpartialdruck der Umgebung gezeigt,¹⁴³ was aber für die fibröse Kappe aus räumlichen Gründen, der direkten Nähe zum Blutfluss, ausgeschlossen werden kann. Eine Aufnahme über den LDL-Rezeptor selber wird von vielen Autoren, u.a. von Josef L. Goldstein, der für seine Arbeiten auf dem Gebiet des LDL-Metabolismus 1985 den Nobelpreis erhielt, bezweifelt.^{35, 143} Trotz der grundsätzlichen Möglichkeit der Aufnahme von LDL/Cholesterol in glatte GMZ aufgrund des Vorliegens bestimmter Milieu-Faktoren, ist die Aktivität unter unstimulierten Bedingungen relativ gering, so dass verschiedene Aktivierungs-Szenarien für die LDL/Cholesterol Aufnahme vorgeschlagen wurden.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Auch nicht LDL- oder *scavenger*-Rezeptor vermittelte Aufnahmemöglichkeiten, wie die Bindung von LDL/Cholesterol an Bestandteile der extrazellulären Matrix oder von Mastzellen freigesetztes Heparin, wurden vorgeschlagen.^{88, 145-147}

Bei der Exposition glatter GMZ mit FL-acLDL konnte, im Rahmen der für diese Studie durchgeführten Kontrollen, keine Aufnahme von FL-acLDL in glatte GMZ beobachtet werden. Dies steht zwar im Widerspruch zu Teilen der älteren Literatur, die sowohl die Expression entsprechender Rezeptoren auf glatten GMZ, als auch die Aufnahme markierten acLDLs nachwies.^{141, 142} Es wurde mir aber mehrfach von Kollegen auf Kongressen (u.a. persönliche Mitteilung von Mitgliedern der Arbeitsgruppe um Dr. Claudia Monaco am Imperial College London) bestätigt, dass auch andere Gruppen keine Aufnahme von FL-acLDL in glatte GMZ beobachten konnten. Neuere Arbeiten bestätigen zu dem, dass acLDL weder in glatte GMZ aufgenommen wird, noch zu deren direkter Schaumzellbildung beiträgt.¹⁴⁸

Eine andere Erklärung für die in der Literatur beschriebenen Widersprüche für glatte GMZ, kann in der Heterogenität dieser Zellpopulationen insgesamt gesehen werden. Nicht nur, dass es zwei, schon in den 90er Jahren deutlich unterschiedlich beschriebene Phänotypen, die kontraktile und synthetische GMZ gibt,^{3, 32, 99} heute ist zudem bekannt, dass Heterogenitäten sowohl innerhalb verschiedener Blutgefäße¹⁴⁹ als auch innerhalb eines Gefäßabschnitts bzw. der atherosklerotischen Plaque vorliegen können.¹⁵⁰⁻¹⁵³ Das vorwiegende Vorhandensein des einen oder anderen Phänotyps ist dabei sowohl von der Zellisolationmethode³ als auch von den Kulturbedingungen abhängig.^{3, 99} Obwohl sich beide Phänotypen mittels Phasenkontrastmikroskopie mit relativ hoher Sicherheit unterscheiden lassen, so ist doch ihre unterschiedliche Physiologie die bessere Wahl bei der Charakterisierung.⁹⁹ Zusammenfassend kann man sagen, dass sich der kontraktile Phänotyp durch eine geringere Proliferationsrate und Reaktion gegenüber PDGF-BB sowie einer geringen

Expression von Bindegewebsproteinen auszeichnet. Den synthetischen Typ zeichnet die Reaktion gegenüber PDGF-BB, eine verminderte Kontraktilität in Reaktion auf Angiotensin II und eine bis zu 30-mal höhere Expression extrazellulärer Matrixbestandteile aus.^{3, 31, 99} Die in dieser Studie verwendeten glatten GMZ wurden mittels Auswachsen aus mechanisch gereinigten und klein geschnittenen Gefäßexplantaten gewonnen. Diese Methode begünstigt, auf Grund der benötigten Migrationsfähigkeit das Auswachsen und Anreichern des synthetischen Phänotyps, welcher auch der in der atherosklerotischen Plaque dominierende Phänotyp ist.³

Nun liefern die Daten dieser Studie erstmals Hinweise darauf, dass es auch über den Transfer von Lysosomen zu einem direkten Transfer von LDL/Cholesterol von MP in glatte GMZ kommen kann. Es zeigte sich im Rahmen der Untersuchung, dass der direkte Zell-Zell-Kontakt Bedingung für diesen Transfer ist. Dies konnte sowohl durch *time-lapse* Mikroskopie, als auch durch das Trennen der MP und glatten GMZ mittels *trans-well*-Einsätzen bewiesen werden. Eine ähnlich große räumliche Nähe, die mögliche Zell-Zell-Kontakte impliziert, kann auch innerhalb der atherosklerotischen Plaque für glatte GMZ und MP auf ultrastruktureller Ebene in Tiermodellen bestätigt werden.²²⁻²⁵

Dass es sich bei dem Transfer um den Transfer von acLDL/Cholesterol und nicht alleine um die zur Markierung genutzten Farbstoffe handelt, konnte durch die Lokalisationsanalyse bestätigt werden. Es kam nicht nur zur erwarteten Kolo-kalisation mit den Lysosomen innerhalb der glatten GMZ, sondern auch bei der Verwendung von FL-Cholesterol/FL-acLDL-Komplexen zu der zu erwartenden Abtrennung des FL-Cholesterol und zur Formation von FL-Cholesterol positiven *lipid droplets* in den GMZ in der Nähe der Zellmembran. Dieses Ergebnis ist kongruent mit entsprechenden Beschreibungen für MP in der Literatur.¹⁵⁴⁻¹⁵⁸ Neben dem Kotransport von FL-Cholesterol und FL-acLDL konnte zusätzlich der Beweis der Zunahme neutraler Lipide in den GMZ mittels Oil-Red-O- und *lipid droplet*-Färbung mit HCS LipidTOX™ geführt werden. Dass diese Färbungen nicht ganz so stark ausfallen wie dies teilweise für acLDL stimulierte MP beschrieben wird, z.B. durch Falcone et al.,¹⁵⁹ ist darauf zurückzuführen, dass in der Literatur bei der Stimulation mit acLDL häufig Konzentrationen zwischen 50-100 µg/ml verwendet wurden. Im Gegensatz dazu hat sich für diese Studie eine Konzentration von 15 µg/ml FL-acLDL als sinnvoll für die Fluoreszenzmikroskopie erwiesen. acLDL Konzentrationen in der Größenordnung von 50-100 µg/ml lassen sich mit FL-acLDL nicht realisieren, da zum einem die Kosten zu hoch wären und zum anderem die daraus folgende sehr hohe

Fluoreszenzintensität sich nicht mehr sinnvoll für die Mikroskopie eignen würde. Der am acLDL gebundene Farbstoff würde in die anderen Fluoreszenzkanäle „durchbluten“. Dieses Durchbluten von Fluoreszenzfarbstoffen, die unspezifische Anregung und Detektion in einem nicht dafür vorgesehenen Fluoreszenzfilterset, stellt ein grundsätzliches Problem in der Fluoreszenzmikroskopie dar und kann bei Mehrfach-Färbungen über das Einstellen der Fluoreszenzintensität bzw. der Konzentration der einzelnen Farbstoffe zueinander vermieden werden. Bei einzelner Betrachtung einer Färbung mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff bei hoher Intensität würde dieser zwar immer noch leicht in einem nahen roten Fluoreszenzfilterset durchbluten, allerdings wird durch einen roten Fluoreszenzfarbstoff ähnlicher Intensität eine so kurze Belichtungszeit realisiert, dass das Durchbluten des grünen Farbstoffes nicht mehr oder in zu vernachlässigbarer Intensität durch die Kameras zu detektieren ist.

Neben dem rein optischen Nachweis des Transfers vom LDL/Cholesterol konnte der Nachweis geführt werden, dass sich auch die Funktion der glatten GMZ entsprechend der Beschreibung für Cholesterol-geladene GMZ nach Rong et al.⁸² verändert. Rong und Kollegen verwendeten mit Methyl- β -Cyclodextrin komplexiertes Cholesterol, welches dadurch wasserlöslich und für die Zellkultur nutzbar wird, um glatte GMZ mit Cholesterol zu beladen. Die Kollegen um Rong stellten dabei fest, dass die glatten GMZ in einen Makrophagen-ähnlichen Phänotyp transdifferenzieren. Die von Rong et al. beschriebenen Veränderungen auf transkriptioneller Ebene, als auch die Erhöhung der Phagozytoseaktivität der glatten GMZ konnte ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Studie für glatte GMZ, die FL-acLDL durch den Transfer aus MP erhalten hatten, bestätigt werden.

Der Verlust der Expression von smooth muscle α -actin und α -tropomyosin, wie es von Rong et al. für Cholesterol-beladene glatte GMZ beschrieben wurde,⁸² konnte bei den FL-acLDL positiven glatten Gefäßmuskelzellen dieser Studie allerdings nicht bestätigt werden. Dies lässt sich wahrscheinlich auf die deutliche geringere Konzentration innerhalb der Zellen zurückführen, wenn auch Kollegen bei deutlich höheren als den von Rong et al. beschriebenen Konzentrationen Defekte des Zytoskeletts ebenso nicht bestätigen konnten.¹⁶⁰ Die deutlich geringere intrazelluläre Cholesterol-Konzentration äußert sich auch durch die deutlich weniger intensive Oil-Red-O-Färbung der FL-acLDL positiven glatten Gefäßmuskelzellen dieser Studie im Vergleich zu den von Rong et al. gezeigten mikroskopischen Bildern.

Rong et al. waren die Ersten, die mit Hilfe dieser artifiziellen Beladung glatter GMZ mit Cholesterol, zeigten, dass glatte GMZ durch die Aufnahme von Cholesterol in einen Makrophagen- oder sogar schaumzellartigen Phänotyp überführt werden können. Das Ergebnis dieser Studie, dass von MP vorher aufgenommenes modifiziertes LDL auf glatte GMZ übertragen werden kann, bietet jetzt ein Szenario für die Gefäßmuskelladung mit LDL, das einen deutlich größeren Bezug zur *in-vivo* Situation darstellt.

7.4 Der interzelluläre Organell-Austausch

Der interzelluläre Austausch größerer Moleküle wie Proteine oder ganzer Organellen ist zumindest in der Zellkultur ein häufig beschriebenes Phänomen. So gibt es schon sehr frühe Beschreibungen, die einen Transfer von Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase zwischen Fibroblasten gesunder Probanden und Fibroblasten von Probanden, die am Lesch-Nyhan-Syndrom leiden, und daher Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase defizient sind, zeigen.¹⁶¹ Dieser Transfer wurde damals von Cox et al. auf *gap junctions* zurückgeführt,¹⁶¹ obwohl sie den Beweis, dass es sich um einen *gap junction*-vermittelten Prozess handelt, schuldig blieben. Eine spätere Arbeit von Dean et al. konnte mittels Mikroinjektion FITC-markierten Dextrans zeigen, dass dieses von Peritonealmakrophagen aus Mäusen auf humane Fibroblasten übertragen werden kann.¹⁶² Aufgrund der Molekularmasse von 70 kDa kann das FITC-Dextran jedoch nicht über *gap junctions* zwischen den Zellen transferiert worden sein, da diese auf Moleküle mit bis zu 1500 Da beschränkt sind.¹⁶³

Außerdem sind verschiedenste Exosomen-basierte Transportvorgänge beschrieben worden. Unter anderem konnte 1976 von Bucana et al. mittels Videomikroskopie und Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass Lysosomen über Exozytose von MP auf Zellen einer Nierenkarzinomzelllinie übertragen werden können und diese darauf hin apoptotisch werden.¹⁶⁴ Aber auch neuere Arbeiten, wie z.B. die von Liu et al., lassen auf einen interzellulären Exosomen-basierten Austausch von Lysosomen innerhalb der zytotoxischen Immunsynapse schließen.¹⁶⁵ Auch der direkte Austausch von Exosomen-ähnlichen, mit Doppelmembran ausgestatteten Vesikeln zwischen benachbarten und über *gap junctions* verbundene Zellen ohne das Freisetzen in das Kulturmedium konnte in der Vergangenheit, siehe Abbildung 24, beschrieben werden.¹⁶⁶

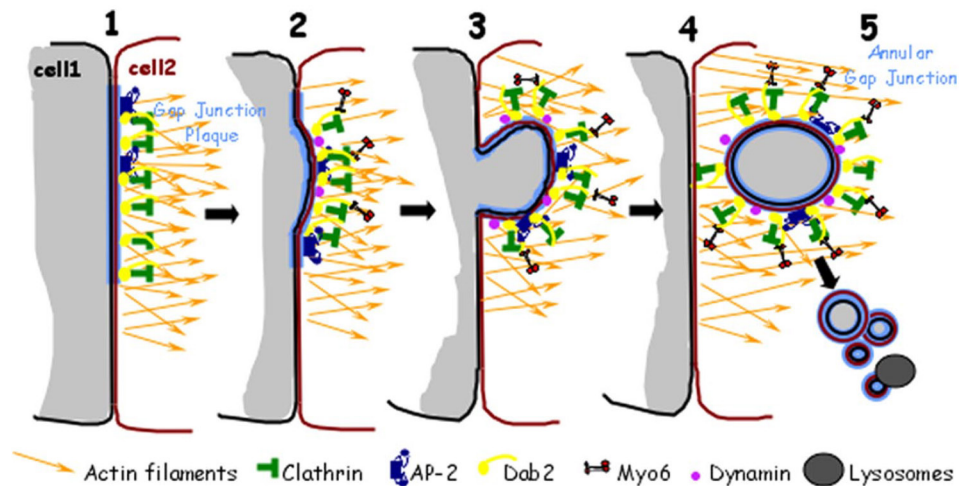


Abbildung 24: Mechanismus eines Vesikelaustausches zwischen zwei benachbarten Zellen ohne vorherige Freisetzung als Exosomen ins Kulturmedium. Zusammenfassende Grafik aus Piehl et al.¹⁶⁶

In der Arbeit von Piehl et al. wird auf Basis von fluoreszenz- und elektronenmikroskopischer Daten ein Mechanismus vorgeschlagen, wie benachbarte Zellen, welche über *gap junctions* entlang der lateralen Membranen verbunden sind, mittels Ausstülpung und entsprechende endozytotische Einstülpung größere Vesikel austauschen können. Mit diesem Mechanismus kann ein Transfer von Zellmaterial auch ohne die vorherige Freisetzung von Exosomen in das Zellkulturmedium erklärt werden.

Kürzlich konnte auch die Übertragung von miRNA zwischen Endothelzellen und glatten GMZ mittels 0,1 μm großen Exosomen gezeigt werden.¹⁶⁷ Diese Exosomen können auf Grund ihrer Ladung mit miRNA direkt auf die Transkription der glatten GMZ Einfluss nehmen.¹⁶⁷

Dass es sich bei dem in dieser Studie beschriebenen Transport von Lysosomen aus MP in glatte GMZ um einen Exosomen-unabhängigen Transport handelt, wurde durch den Transfer konditionierten Mediums von Makrophagenkulturen auf glatte GMZ überprüft. Da dies jedoch nur ein schwacher Hinweis wäre, und z.B. eine durch glatte GMZ ausgelöste Exosomenausschüttung nicht ganz ausschließt, wurde zusätzlich ein räumlich getrenntes Kokultur-System verwendet. Die Verwendung dieses räumlich getrennten Kokultur-Modells analog zu z.B. Hergenreider et al.,¹⁶⁷ durch die Verwendung von sog. *trans-well*-Einsätzen, bewies neben der *time-lapse* Mikroskopie die Unabhängigkeit von Exosomen.

Was alle diese Transportvorgänge gemeinsam haben, ist die spätere Aufnahme der Exosomen mittels Phagozytose und die dazu notwendige Bildung von frühen Endosomen. Frühe Endosomen können u.a. durch ihren Besitz mit der Ras-assoziierten GTPase Rab5 charakterisiert werden. Durch die Verwendung eines Fusionsproteins aus Rab5a und dem grün bzw. rot fluoreszierenden Protein wurden in dieser Studie die frühen Endosomen in den glatten GMZ markiert. Eine Kolokalisation des FL-acLDL mit der Endosomenmarkierung konnte zu keinem Zeitpunkt fluoreszenzmikroskopisch festgestellt werden. Die Unfähigkeit, eine

Kolokalisation zu beobachten, schließt eine Endosomenvermittlung zwar nicht sicher aus, liefert jedoch einen Hinweis auf die Häufigkeit eines solchen Ereignisses. Da eine Beobachtung zu den verschiedensten Zeitpunkten bei mehreren hundert betroffenen Zellen ausblieb, ist davon auszugehen, dass es sich, wenn es überhaupt innerhalb der Kokulturen vorkam, um ein sehr seltenes Ereignis handeln würde.

Weitere Versuche, die Endozytose der glatten GMZ in den Kokulturen zu hemmen, um diesen Weg des Transfers weiter auszuschließen, waren nicht erfolgreich. Die Hemmung der Endosomenbildung und der Endosomenbewegung durch eine rapide Temperaturreduktion war auf Grund der hohen Temperaturstabilität des für das *life-cell-imaging* verwendeten Inkubators, des Mikroskop umschließenden *cage* Typs, nicht möglich. Hier wäre nur die Verwendung eines Inkubators des sog. *stage* Typs, der nur die Probe umschließt und wärmt notwendig gewesen. Allerdings ist dieser Inkubatorotyp durch eine höhere Sensibilität gegenüber wechselnden Umgebungstemperaturen und einer Neigung zur Fokusdrift bekannt¹¹⁴ und daher nur für solche Anwendungen zu empfehlen. Die pharmakologische Inhibition durch z.B. Latrunculin B, welches die Aktinpolymerisation inhibiert, stellte keine Alternative dar, da sich die anhaltende Inhibition bei der benötigten relativ langen Kulturdauer stark negativ auf die Viabilität der glatten GMZ auswirkte. Es ist zudem davon auszugehen, dass eine absolute Inhibition der Endozytose quasi nicht zu erreichen ist, die Inhibition vom Zelltyp abhängig ist und, wie schon erwähnt, mit großen Einschränkungen der Viabilität der Zellen einher geht.¹⁶⁸

Eine Möglichkeit des Endosomen-unabhängigen Transports stellt jede Art der Membranfusion und damit eine kurzzeitige Fusion der Donor- und Akzeptorzelle dar. Eine spezielle Form der Membranfusion, die erst in den letzten Jahren entdeckt wurde, stellen die sog. *tunneling nanotubes* (TNT) dar.¹⁶⁹ TNT werden als tubuläre Verbindungen mit einer mittleren Länge von 25 μm und einem Durchmesser von wenigen hundert Nanometern beschrieben.^{170, 171} Diese TNT wurden unter anderem für diverse immortalisierte Zelllinien,^{169, 170} aber auch primäre Zellen¹⁷⁰ sowie Immunzellen beschrieben.¹⁷¹ Sie können auch zwischen verschiedenen Zelltypen und Spezies ausgebildet werden.¹⁷⁰ Allen Beschreibungen ist die F-Actin-Positivität der TNT gemein, wie diese schon in der Erstbeschreibung durch Rustom et al. gezeigt wurde.¹⁶⁹

Welche intrazellulären Komponenten oder Signale ausgetauscht werden können ist nach aktueller Literaturlage nicht klar zu definieren. Die Weiterleitung von Calciumströmen zwischen zwei TNT verbundenen Zellen ist noch leicht über eine

niedermolekulare Kopplung der Zellen zu erklären und könnte auch ohne eine direkte zytoplasmatische Brücke durch *gap junctions* vermittelt werden.

Die meisten Beschreibungen gibt es jedoch für aus Endosomen entstandene Organellen, die mittels der Lipidanker-gekoppelten Farbstoffe wie DiI, DiO oder DiD dargestellt wurden. (zusammengefasst in ¹⁷⁰) Diese Fluoreszenzfärbung löst jedoch weder zwischen verschiedenen Endosomentypen, wie frühen-, späten- und recycling-Endosomen, noch zwischen Endosomen und Lysosomen auf.

Die Verwendung von DiO zur Markierung der MP Zellmembran zeigte auch in dieser Studie, dass DiO positive Endosomen von MP auf glatte GMZ übertragen werden können. Jedoch war dazu immer ein direkter Zellkontakt notwendig. Das Ausbilden von TNT zwischen MP und glatten GMZ konnte weder während der *time-lapse* Serien, noch zu einem anderen Zeitpunkt beobachtet werden.

Durch die Verwendung eines Fusionsproteins aus LAMP-1 und dem Fluoreszenzprotein mKate2 ist es möglich, die Lysosomen einer Zelle darzustellen. Durch die Infektion der MP mit dem für LAMP-1-mKate2 kodierenden Adenovirus vor Beginn der Kokultur konnte im Rahmen dieser Studie gezeigt werden, dass neben dem FL-acLDL auch die in den MP entstandene und mit LAMP-1-mKate2 besetzte Lysosomalemembran der MP in die glatten GMZ transportiert wurde. Das mKate2 ist hierbei durch die c-terminale Fusion am LAMP-1 an der zytoplasmatischen Seite der Lysosomenmembran lokalisiert, so dass im Gegensatz zu einer lysosomalen Lokalisation davon auszugehen ist, dass es sich bei den transportierten Lysosomen um vollständige und intakte Lysosomen handelt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse und dreidimensionale Rekonstruktion der GMZ nach erfolgtem Transport von FL-acLDL und LAMP-1-mKate2 positiven Lysosomen zeigte, dass die Lysosomen ihre strukturelle Integrität, innen FL-acLDL, außen eine dünne Schicht aus LAMP-1-mKate2, behalten hatten. Bei den im Ergebnisteil verwendeten Maximum-Intensitäts-Projektionen äußert sich dies durch eine geringe Intensität des LAMP-1-mKate2 in der Mitte der transportierten Lysosomen und eine ansteigende Intensität mit einem Maximum am Rand (siehe Abbildung 22e und Abbildung 23i). Wäre die Intensität des mKate2 anders herum verteilt, mit einem Maximum in der Mitte der Lysosomen, müsste man davon ausgehen, dass dieses vom LAMP-1 abgespalten worden wäre und sich gleichmäßig in den kugelförmigen Lysosomen verteilt hätte. Eine solche Verteilung wäre ein Hinweis auf den lysosomalen Verdau des LAMP-1-mKate2 und damit für die Inkorporation des MP Lysosomen in ein Lysosomen der glatten GMZ.

7.5 Limitationen der Studie

In-vitro Studien, wie diese, stellen natürlich immer nur ein stark reduziertes Modell der tatsächlichen Verhältnisse *in-vivo* dar. Die Komplexität der atherosklerotischen Plaque, bestehend aus diversen Zelltypen, verschiedenen extrazellulären Matrixbestandteilen, physikalischen Einflüssen, wie dem Blutfluss und der mit der Pulswelle einhergehenden mechanischen Beanspruchung der Plaque, können nicht *in-vitro* nachgestellt werden.

Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist die Verwendung etablierter Tiermodelle, wie der LDL-Rezeptor *knock-out*¹⁷² oder der Apolipoprotein E (ApoE) *knock-out*¹⁷³⁻¹⁷⁵ Maus. Allerdings kann man auch hier feststellen, dass die beiden am weitesten verbreiteten Tiermodelle diverse Nachteile haben und daher nur bedingt als Modell für die humane atherosklerotische Plaque dienen können.^{93, 176-178}

Wenn man den hier beschriebenen Transport von FL-acLDL von MP in GMZ *in-vivo* zeigen wollte, wäre wahrscheinlich das von Sata et al.¹⁷⁹ beschriebene Tiermodell der Denudation der A. femoralis das Beste gewesen. Zwar handelt es sich hierbei eher um ein Restenose-Modell, das vor allem durch einen hohen Anteil von GMZ und wenigen Entzündungszellen geprägt ist, jedoch würde die Manipulation der Femoralarterie wahrscheinlich am besten die notwendige Zweiphotonenmikroskopie zulassen. Neben der Denudation zum Auslösen der experimentellen atherosklerotischen Plaque könnte man durch die Verwendung der ApoE *knock-out* Maus in diesen Versuchen die zelluläre Zusammensetzung der Plaque entzündlicher gestalten.¹⁸⁰ Einem solchen Tiermodell könnte man dann mit FL-acLDL beladene *ex-vivo* aus Knochenmark differenzierte MP¹⁸¹ über die Schwanzvene injizieren.¹⁸² Anschließend wäre eine Beobachtung der Interaktion der FL-acLDL-beladenen MP mit den GMZ mittels Zweiphotonenmikroskopie notwendig. Das einfache Erstellen histologischer Präparate und die Suche nach FL-acLDL in den glatten GMZ hätte den Nachteil, dass diese nicht zweifelsfrei auf den hier beschriebenen Mechanismus des interzellulären Lysosomentransfers zurückzuführen wäre, sondern auch auf die Phagozytose apoptotischer Makrophagen zurückzuführen sein könnte.

Auf Grund der eher langsamen Akkumulation von FL-acLDL positiven GMZ und dem Unvermögen vorherzusehen, welche GMZ in einer Kokultur als nächstes von einem Lysosomentransport betroffen ist, ist es bisher nicht gelungen, hochaufgelöste

time-lapse Aufnahmen des Transports zu erstellen. Die Beobachtungen multipler Stellen innerhalb der Kokultur lässt sich zudem in hoher Auflösung, also Objektiven mit Oil Immersion, nur schwierig und mit massiven Fokusverschiebungen innerhalb der Aufnahmeserie realisieren. So wird es notwendig sein, eine hohe Zahl einzelner GMZ zu beobachten und durch die pure Anzahl an *time-lapse* Serien die Chance zu erhöhen, den Transport hoch aufgelöst zu beobachten.

Zudem stehen im Moment nur Objektive zur Verfügung, die keine weitere Kontrastierung der Zellen in Phasenkontrast oder DIC zulassen. Es wäre sicher sinnvoll, die angestrebte hoch aufgelöste *time-lapse* Serie zusätzlich durch eine Kontrastierung mittels Phasenkontrast oder DIC aufzuwerten und so zusätzliche Informationen z.B. über eine evtl. Membranfusion zu erhalten.

Weitere wichtige Informationen über den zu Grunde liegenden Mechanismus könnte man zusätzlich über eine Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erhalten. Hierzu müssten die transportierten Lysosomen der Makrophagen so beladen werden, dass man diese in einer TEM-Aufnahme identifizieren könnte. Dies wäre über Goldkügelchen, wie sie bei TEM-immunocytochemischen Färbungen an Antikörper gebunden verwendet werden, oder *quantum dots* möglich. Die Verwendung von *quantum dots* wäre dabei zu bevorzugen, da diese sowohl eine hohe Elektronendichte für die Kontrastierung bei der TEM besitzen, als auch fluoreszent sind. Nach erfolgtem und fluoreszenzmikroskopisch beobachtetem Transport *quantum dots* positiver Lysosomen, könnte man mittels TEM zusätzlich belegen, dass die Lysosomen nur mit einer Membran umgeben sind. Dies wäre ein weiterer Beweis, dass vollständige Lysosomen mittels Membranfusion von den MP in die glatten GMZ gelangen. Sollte eine weitere Membran nachzuweisen sein, würde dies, obwohl bisher keine Anzeichen dafür beobachtet wurden, für eine Aufnahme der Lysosomen mittels Endozytose sprechen.

7.6 Die klinische Perspektive

Neben der Tatsache, dass *in-vitro* Zellkulturen nur ein spärliches Modell für die komplexen Prozesse innerhalb der atherosklerotischen Plaque darstellen, ist das aktuelle Fehlen entsprechender Hinweise *in-vivo* ein wichtiger Punkt der Bewertung der möglichen Relevanz *in-vivo*. Bisher gibt es nur einen Hinweis in der Literatur von Lou et. al¹⁸³, der das Vorhandensein entsprechender Strukturen, in diesem Fall von TNT, zum interzellulären Organell-Transfer *in-vivo* beschreibt.

Unabhängig von dem Fehlen eines *in-vivo* Beweises des Lysosomentransfers zwischen Zellen liefert das Ergebnis dieser Studie ein Cholesterol-Ladeszenario, das im Vergleich zur Arbeit von Rong et al. deutlich näher an der *in-vivo* Situation orientiert ist. Der Beitrag glatter GMZ zur Schaumzellbildung ist auf Grund ihrer geringen Bedeutung im Maus-Modell für die Schaumzellbildung in den letzten Jahren etwas vernachlässigt worden.⁸³ Insbesondere in frühen Stadien der humanen Atherosklerose ist die Bedeutung glatter GMZ und der aus ihnen entstandenen Schaumzellen sowie die extrazelluläre Anreicherung von Lipiden jedoch evident.^{84, 184} Zudem spielen die GMZ bzw. ihr Untergehen eine wichtige Rolle bei der Plaquestabilisierung.⁸⁶ So kann man schließen, dass eine Transformation glatter GMZ in einen schaumzellähnlichen Phänotyp, die übermäßige und unkontrollierte Ladung mit Lipiden sowie die daraus resultierende Apoptose einen wesentlichen Teil für die frühe Progression der Atherosklerose als auch für die Destabilisierung der Plaque spielen könnten.

Mittlerweile geht man davon aus, dass nicht jede atherosklerotische Läsion mit gleicher Wahrscheinlichkeit zur Plaqueruptur und Herzinfarkt bzw. Schlaganfall führt. Das Konzept von der vulnerablen Plaque als Ursache des akuten koronaren Syndroms wurde Mitte der 1990er Jahre durch Beobachtungen an histologischen Präparaten geprägt. Den Pathologen fiel auf, dass sich die Plaque am Ort der Ruptur bzw. des Thrombus von den anderen unbeschädigten Läsionen im selben Gefäß unterschied. Eine vulnerable Plaque lässt sich danach durch einen hohen MP- bzw. Schaumzell-Anteil von ca. 25% der Fläche, wenige glatte GMZ, das Vorhandensein meist ausgeprägter nekrotischer Kerne, eine hohe MMP-Aktivität sowie eine besonders dünne, fast vollständig GMZ-freie, fibröse Kappe charakterisieren.^{2, 33, 38, 185} Es sind, wie schon eingangs diskutiert, verschiedene Rezeptor-abhängige und -unabhängige Mechanismen vorgeschlagen worden, wie glatte GMZ LDL-Spezies bzw. Cholesterol aufnehmen können^{88, 142-147} und dadurch in einen schaumzellähnlichen Phänotyp transformiert werden.⁸² Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bieten nun einen Hinweis darauf, wie MP, die eine deutlich höhere Affinität und Phagozytoseaktivität gegenüber verschiedenen LDL-Spezies besitzen, durch den Transport von Lipiden in glatte GMZ zur Ausprägung einer vulnerablen Plaque führen könnten. Der Transport könnte im Rahmen der Plaqueprogression zu hohen intrazellulären Cholesterolkonzentrationen in den glatten GMZ und damit zu den von Rong et al.⁸² beschriebenen phänotypischen Veränderungen in Richtung MP/Schaumzellen führen. Diese phänotypische Veränderung kann sowohl die veränderte zelluläre Zusammensetzung der

vulnerablen Plaque (Verlust glatter GMZ und die Anreicherung von MP/Schaumzellen) erklären, als auch die Beschreibung von Zellen, die sowohl Markerproteine glatter GMZ als auch von MP koexprimieren.¹³⁰ Auch das starke Wachstum des nekrotischen Kerns bei vulnerablen Läsionen kann sich durch eine erhöhte Beteiligung glatter GMZ erklären lassen. Eigene, hier nicht gezeigte Daten, weisen darauf hin, dass *in-vitro* mittels wasserlöslichem Methyl- β -Cyclodextrin komplexiertem Cholesterol stimulierte glatte GMZ deutlich empfindlicher, also mit höherer Zellzahl und bereits bei geringeren Konzentrationen, mit Apoptose bzw. Nekrose reagieren als MP. Daher könnte die Beteiligung von GMZ an der Schaumzellbildung trotz ihres geringeren Anteils an der Gesamtzahl aller Schaumzellen in der atherosklerotischen Plaque ernstere Konsequenzen haben, da die Transformation in einen schaumzellähnlichen Phänotyp nicht nur zum Wachsen des nekrotischen Kerns, sondern auch zur Destabilisierung der fibrösen Kappe beitragen könnte.

8 Zusammenfassung

Die Atherosklerose ist eine chronische inflammatorische Erkrankung der Blutgefäße und ist verantwortlich für fast 50% aller Todesfälle in der westlichen Welt. Während der Entstehung und Progression der atherosklerotischen Plaque kommen glatte Gefäßmuskelzellen (GMZ) und in die Plaque eingewanderte Makrophagen (MP) in engen räumlichen Kontakt und interagieren. Während den glatten GMZ eine eher Plaque-stabilisierende Wirkung nachgesagt wird, korreliert das Risiko einer Plaqueruptur und dem folgenden Herzinfarkt mit der Anzahl der MP bzw. der hauptsächlich aus MP entstehenden Schaumzellen in der Läsion. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Teilaspekten dieser Interaktion im Hinblick auf eine mögliche Transdifferenzierung von MP in glatte GMZ sowie dem interzellulären Austausch von Lipid-geladenen Lysosomen aus den MP in die glatten GMZ und den Konsequenzen, die sich daraus für die glatten GMZ ergeben.

Durch die Entdeckung von im Blut zirkulierenden Progenitorzellen für Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen entstand innerhalb der vaskulären Biologie die Diskussion, welche Rolle diese Progenitoren innerhalb der Atherosklerose spielen. Fast alle Studien, die einen signifikanten Beitrag dieser zirkulierenden Progenitorzellen innerhalb der atherosklerotischen Plaque belegten, wurden in Mäusen durchgeführt, die durch Bestrahlung und Knochenmarktransplantation über ein chimäres GFP-positives Knochenmark verfügten. Die Relevanz von Progenitorzellen für die Entwicklung der Atherosklerose beim Menschen konnte bis heute nicht zweifelsfrei erbracht werden.

So finden sich z.B. histologische Studien an atherosklerotischen Plaques, welche Zellen beschreiben, die eine Koexpression von Markern für MP und GMZ aufweisen. Zudem zeigen *in-vitro* Versuche an humanen Zellen, dass MP auch Endothelzell-Marker exprimieren können. Deshalb wurde die Hypothese untersucht, ob es sich bei den transdifferenzierenden Zellen um Makrophagen handeln könnte.

Zunächst wurde in der vorliegenden Arbeit eine große Anzahl von Kombinationen löslicher Faktoren und Oberflächenbeschichtungen untersucht, um Kulturbedingungen zu finden, die zu einer Transdifferenzierung von MP in glatte GMZ führen. Da für keine der Bedingungen eine Transdifferenzierung festgestellt werden konnte, wurde ein Kokultur-Modell etabliert. Hierzu wurde mit Fluoreszenz markiertes acetyliertes *low density lipoprotein* (FL-acLDL) den MP in der vorbereitenden Einzelkultur zur Phagozytose angeboten, um diese später in der Kokultur zu identifizieren und die so markierten MP mit glatten GMZ kokultiviert. Die

immunozytochemische Analyse zeigte, dass nach vier Wochen Kokultur über 20% der glatten GMZ ebenfalls FL-acLDL positiv waren. Mittels xenogener Kokultur-Komposition (Ratten GMZ und humane MP) und Spezies-spezifischen Primern zum Nachweis humaner GMZ-Marker konnte allerdings eine Transdifferenzierung mittels *real-time* PCR ausgeschlossen werden. Stattdessen konnte durch den Einsatz der *time-lapse* Mikroskopie gezeigt werden, dass es sich bei dem Auftauchen doppelt positiver GMZ nicht um einen Transdifferenzierungsprozess von MP in glatte GMZ handelt, sondern dass das für glatte Gefäßmuskelzellen normalerweise nicht phagozytierbare FL-acLDL von den MP über Zell-Zell-Kontakte in die GMZ transportiert wurde. Außerdem zeigten die aufgenommenen *time-lapse* Serien, dass eine Phagozytose von an Apoptose oder Nekrose zugrunde gegangener MP als der zugrunde liegende Mechanismus ebenfalls ausgeschlossen werden kann. Zusätzlich konnte durch die räumliche Trennung mit sog. *trans-well*-Einsätzen die Abhängigkeit von Zell-Zell-Kontakten für diesen Transport bewiesen werden.

Die Entdeckung eines Transportes von Lipiden von MP in glatte GMZ ist von hoher klinischer Relevanz, da die Frage, wie die Plaque-stabilisierenden glatten GMZ zu Plaque-destabilisierenden Schaumzellen werden können, bis heute nicht abschließend geklärt ist. Deshalb wurde in der Folge in der vorliegenden Arbeit auf diesen Transport fokussiert.

Durch das Beladen der MP mit Komplexen aus fluoreszenzmarkiertem Cholesterol (FL-Cholesterol) im Komplex mit FL-acLDL konnte gezeigt werden, dass es neben dem Transport des FL-acLDL in die glatten GMZ auch zu einem Kotransport des FL-Cholesterol kommt. Die FL-Cholesterol/FL-acLDL positiven GMZ zeigten zudem die für Schaumzellen typische Einlagerung des FL-Cholesterols in Lipidtröpfchen. Dies konnte mittels Oil-Red-O-Färbung und der Verwendung eines für neutrale Lipide spezifischen Farbstoffes visualisiert und quantifiziert werden.

Die erneute Verwendung xenogen zusammengesetzter Kokulturen und die anschließende Spezies-spezifische *real-time* PCR, dieses Mal unter Verwendung von Primern zum Nachweis der Transkripte der glatten GMZ, erlaubte die Charakterisierung der Änderung deren Phänotyps unter Lipid-Beladung. Sie zeigte, dass Cholesterol-abhängige Gene wie die HMG-CoA-Reduktase in den GMZ herabreguliert, Makrophagen-typische Transkripte jedoch hochreguliert wurden. Dies könnte der Grund dafür sein, dass in der atherosklerotischen Plaque Zellen gefunden werden, die Marker sowohl für GMZ als auch MP koexprimieren.

Zusätzlich erhöhte sich durch den Transfer des FL-acLDL in die glatten GMZ deren Phagozytoseaktivität im Vergleich zu nicht betroffenen GMZ derselben Kokultur.

Mittels dreidimensionaler Lebendzell-Mikroskopie-Techniken wurde die subzelluläre Lokalisation des FL-acLDL innerhalb der lebenden GMZ weiter untersucht. Durch die Verwendung acidotroper Fluoreszenzfarbstoffe konnte gezeigt werden, dass nur ein Teil des FL-acLDL innerhalb der aciden Lysosomen lokalisiert ist. Eine gute Kolokalisation innerhalb der Lysosomen konnte jedoch festgestellt werden, wenn man nicht nur die aciden Lysosomen, sondern mittels Expression eines Fusionsproteins (des lysosomalen Markers LAMP-1) und eines fluoreszierenden Proteins, alle Lysosomen darstellte. Eine fehlende Kolokalisation mit einem frühen-Endosomen-Marker schloss die Phagozytose des FL-acLDL aus, und bestätigt den in den *time-lapse* Serien gewonnenen Eindruck, dass es sich nicht um einen Phagozytose-getriebenen Prozess handelt.

Die Markierung der MP-Membran vor der Phagozytose des FL-acLDL durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, die mit lipophilen Seitenketten versehen waren, ermöglichte es, zu zeigen, dass nicht nur FL-acLDL, sondern auch Membranbestandteile der MP in die glatten GMZ transportiert wurden. Dies wurde als Hinweis gewertet, dass ganze Lysosomen von den MP auf die GMZ übertragen wurden, wie dies u.a. für sog. *tunneling nanotubes* in der Literatur für Krebszelllinien bereits beschrieben wurde. Um diese Hypothese zu testen wurde ein Adenovirus zur Infektion der MP hergestellt, das für ein Fusionsprotein aus LAMP-1 und dem rot fluoreszierenden mKate2 kodierte. So infizierte MP wurden in der Einzelkultur mit FL-acLDL beladen und mit gegengefärbten GMZ kokultiviert. Die so markierten, in den MP entstandenen Lysosomen fanden sich tatsächlich schon nach kurzer Kokulturzeit in den glatten GMZ, und führten zu den obengenannten Konsequenzen.

Zusammenfassend zeigen die hier erhobenen Daten, dass es zumindest *in-vitro* zu einem interzellulären Transfer Lipid-geladener Lysosomen aus MP in glatte GMZ kommt. Dabei verändern die glatten GMZ ihren Phänotyp und weisen nach erfolgtem FL-acLDL-Transport einen eher MP-ähnlichen oder sogar schaumzellartigen Phänotyp auf. Dieser Prozess könnte zur Bildung von Schaumzellen aus GMZ innerhalb der atherosklerotischen Plaque und damit zu deren Instabilisierung beitragen.

9 Literaturverzeichnis

- (1) Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006 April;86(2):515-81.
- (2) Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 October;17(10):1859-67.
- (3) Ross R. George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1981 September;1(5):293-311.
- (4) National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel. Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). *JAMA* 1993 June 16;269(23):3015-23.
- (5) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999 January 14;340(2):115-26.
- (6) McMillan DE. Blood flow and the localization of atherosclerotic plaques. *Stroke* 1985 July;16(4):582-7.
- (7) Nesbitt WS, Mangin P, Salem HH, Jackson SP. The impact of blood rheology on the molecular and cellular events underlying arterial thrombosis. *J Mol Med (Berl)* 2006 December;84(12):989-95.
- (8) Tarbell JM. Shear stress and the endothelial transport barrier. *Cardiovasc Res* 2010 July 15;87(2):320-30.
- (9) Tabas I. Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis. *Annu Rev Nutr* 1999;19:123-39.
- (10) Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S et al. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 February;86(4):1372-6.
- (11) Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1994 August;94(2):885-91.
- (12) Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991 February 15;251(4995):788-91.
- (13) Gimbrone MA, Jr., Cybulsky MI, Kume N, Collins T, Resnick N. Vascular endothelium. An integrator of pathophysiological stimuli in atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1995 January 17;748:122-31.
- (14) Lin MC, Mus-Jacobs F, Chen HH et al. Shear stress induction of the tissue factor gene. *J Clin Invest* 1997 February 15;99(4):737-44.

- (15) Resnick N, Collins T, Atkinson W, Bonthron DT, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 May 15;90(10):4591-5.
- (16) Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994 January;14(1):133-40.
- (17) Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 May;18(5):842-51.
- (18) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993 April 29;362(6423):801-9.
- (19) Lanzavecchia A. Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr Opin Immunol* 1996 June;8(3):348-54.
- (20) Stary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 1989 January;9(1 Suppl):I19-I32.
- (21) McGill HC, Jr. George Lyman Duff memorial lecture. Persistent problems in the pathogenesis of atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1984 September;4(5):443-51.
- (22) Faggiotto A, Ross R, Harker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis* 1984 July;4(4):323-40.
- (23) Faggiotto A, Ross R. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* 1984 July;4(4):341-56.
- (24) Masuda J, Ross R. Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Fatty streak formation. *Arteriosclerosis* 1990 March;10(2):164-77.
- (25) Masuda J, Ross R. Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* 1990 March;10(2):178-87.
- (26) Rosenfeld ME, Tsukada T, Gown AM, Ross R. Fatty streak initiation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 1987 January;7(1):9-23.
- (27) Rosenfeld ME, Tsukada T, Chait A, Bierman EL, Gown AM, Ross R. Fatty streak expansion and maturation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 1987 January;7(1):24-34.
- (28) Lindner V, Reidy MA. Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 May 1;88(9):3739-43.

- (29) Reidy MA, Irvin C, Lindner V. Migration of arterial wall cells. Expression of plasminogen activators and inhibitors in injured rat arteries. *Circ Res* 1996 March;78(3):405-14.
- (30) Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* 2006 April 18;47(8 Suppl):C13-C18.
- (31) Worth NF, Rolfe BE, Song J, Campbell GR. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 2001 July;49(3):130-45.
- (32) Ang AH, Tachas G, Campbell JH, Bateman JF, Campbell GR. Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth-muscle cells. Alteration with phenotype. *Biochem J* 1990 January 15;265(2):461-9.
- (33) Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 May;20(5):1262-75.
- (34) Watanabe M, Sangawa A, Sasaki Y et al. Distribution of inflammatory cells in adventitia changed with advancing atherosclerosis of human coronary artery. *J Atheroscler Thromb* 2007 December;14(6):325-31.
- (35) Goldstein JL, Anderson RG, Buja LM, Basu SK, Brown MS. Overloading human aortic smooth muscle cells with low density lipoprotein-cholesteryl esters reproduces features of atherosclerosis in vitro. *J Clin Invest* 1977 June;59(6):1196-202.
- (36) Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983;52:223-61.
- (37) Virmani R, Burke AP, Kolodgie FD, Farb A. Pathology of the thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque. *J Interv Cardiol* 2003 June;16(3):267-72.
- (38) Virmani R, Burke AP, Kolodgie FD, Farb A. Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol* 2002 December;15(6):439-46.
- (39) Diletti R, Garcia-Garcia HM, Gomez-Lara J et al. Assessment of coronary atherosclerosis progression and regression at bifurcations using combined IVUS and OCT. *JACC Cardiovasc Imaging* 2011 July;4(7):774-80.
- (40) Gogas BD, Farooq V, Serruys PW, Garcia-Garcia HM. Assessment of coronary atherosclerosis by IVUS and IVUS-based imaging modalities: progression and regression studies, tissue composition and beyond. *Int J Cardiovasc Imaging* 2011 February;27(2):225-37.
- (41) Libby P. Atherosclerosis: the new view. *Sci Am* 2002 May;286(5):46-55.
- (42) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997 February 14;275(5302):964-7.

- (43) Dzau VJ, Gneccchi M, Pachori AS, Morello F, Melo LG. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *Hypertension* 2005 July;46(1):7-18.
- (44) Eggermann J, Kliche S, Jarmy G et al. Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res* 2003 May 1;58(2):478-86.
- (45) Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003 March 4;107(8):1164-9.
- (46) Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004 August 20;95(4):343-53.
- (47) Schmeisser A, Garlichs CD, Zhang H et al. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* 2001 February 16;49(3):671-80.
- (48) Schmeisser A, Graffy C, Daniel WG, Strasser RH. Phenotypic overlap between monocytes and vascular endothelial cells. *Adv Exp Med Biol* 2003;522:59-74.
- (49) Hagensen MK, Raarup MK, Mortensen MB et al. Circulating endothelial progenitor cells do not contribute to regeneration of endothelium after murine arterial injury. *Cardiovasc Res* 2012 February 1;93(2):223-31.
- (50) Hagensen MK, Shim J, Thim T, Falk E, Bentzon JF. Circulating endothelial progenitor cells do not contribute to plaque endothelium in murine atherosclerosis. *Circulation* 2010 February 23;121(7):898-905.
- (51) Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* 2002 September 3;106(10):1199-204.
- (52) Caplice NM, Bunch TJ, Stalboerger PG et al. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 April 15;100(8):4754-9.
- (53) Lambros MB, Simpson PT, Jones C et al. Unlocking pathology archives for molecular genetic studies: a reliable method to generate probes for chromogenic and fluorescent in situ hybridization. *Lab Invest* 2006 April;86(4):398-408.
- (54) Lambros MB, Natrajan R, Reis-Filho JS. Chromogenic and fluorescent in situ hybridization in breast cancer. *Hum Pathol* 2007 August;38(8):1105-22.
- (55) Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004 July;84(3):767-801.
- (56) Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995 July;75(3):487-517.

- (57) Gabbiani G, Schmid E, Winter S et al. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 January;78(1):298-302.
- (58) Hungerford JE, Owens GK, Argraves WS, Little CD. Development of the aortic vessel wall as defined by vascular smooth muscle and extracellular matrix markers. *Dev Biol* 1996 September 15;178(2):375-92.
- (59) Mack CP, Owens GK. Regulation of smooth muscle alpha-actin expression in vivo is dependent on CArG elements within the 5' and first intron promoter regions. *Circ Res* 1999 April 16;84(7):852-61.
- (60) Arimura C, Suzuki T, Yanagisawa M, Imamura M, Hamada Y, Masaki T. Primary structure of chicken skeletal muscle and fibroblast alpha-actinins deduced from cDNA sequences. *Eur J Biochem* 1988 November 15;177(3):649-55.
- (61) Babij P, Kelly C, Periasamy M. Characterization of a mammalian smooth muscle myosin heavy-chain gene: complete nucleotide and protein coding sequence and analysis of the 5' end of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 December 1;88(23):10676-80.
- (62) Madsen CS, Regan CP, Hungerford JE, White SL, Manabe I, Owens GK. Smooth muscle-specific expression of the smooth muscle myosin heavy chain gene in transgenic mice requires 5'-flanking and first intronic DNA sequence. *Circ Res* 1998 May 4;82(8):908-17.
- (63) Miano JM, Cserjesi P, Ligon KL, Periasamy M, Olson EN. Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis. *Circ Res* 1994 November;75(5):803-12.
- (64) Duband JL, Gimona M, Scatena M, Sartore S, Small JV. Calponin and SM 22 as differentiation markers of smooth muscle: spatiotemporal distribution during avian embryonic development. *Differentiation* 1993 December;55(1):1-11.
- (65) Miano JM, Carlson MJ, Spencer JA, Misra RP. Serum response factor-dependent regulation of the smooth muscle calponin gene. *J Biol Chem* 2000 March 31;275(13):9814-22.
- (66) Humphrey MB, Herrera-Sosa H, Gonzalez G, Lee R, Bryan J. Cloning of cDNAs encoding human caldesmons. *Gene* 1992 March 15;112(2):197-204.
- (67) Kim S, Ip HS, Lu MM, Clendenin C, Parmacek MS. A serum response factor-dependent transcriptional regulatory program identifies distinct smooth muscle cell sublineages. *Mol Cell Biol* 1997 April;17(4):2266-78.
- (68) Solway J, Seltzer J, Samaha FF et al. Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha. *J Biol Chem* 1995 June 2;270(22):13460-9.
- (69) Li L, Miano JM, Cserjesi P, Olson EN. SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ Res* 1996 February;78(2):188-95.

- (70) Sata M, Saiura A, Kunisato A et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002 April;8(4):403-9.
- (71) Bentzon JF, Weile C, Sondergaard CS, Hindkjaer J, Kassem M, Falk E. Smooth muscle cells in atherosclerosis originate from the local vessel wall and not circulating progenitor cells in ApoE knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 December;26(12):2696-702.
- (72) Bentzon JF, Sondergaard CS, Kassem M, Falk E. Smooth muscle cells healing atherosclerotic plaque disruptions are of local, not blood, origin in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 2007 October 30;116(18):2053-61.
- (73) Daniel JM, Bielenberg W, Stieger P, Weinert S, Tillmanns H, Sedding DG. Time-course analysis on the differentiation of bone marrow-derived progenitor cells into smooth muscle cells during neointima formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 October;30(10):1890-6.
- (74) Iwata H, Manabe I, Fujiu K et al. Bone marrow-derived cells contribute to vascular inflammation but do not differentiate into smooth muscle cell lineages. *Circulation* 2010 November 16;122(20):2048-57.
- (75) Martin K, Weiss S, Metharom P et al. Thrombin stimulates smooth muscle cell differentiation from peripheral blood mononuclear cells via protease-activated receptor-1, RhoA, and myocardin. *Circ Res* 2009 July 31;105(3):214-8.
- (76) Stewart HJ, Guildford AL, Lawrence-Watt DJ, Santin M. Substrate-induced phenotypical change of monocytes/macrophages into myofibroblast-like cells: a new insight into the mechanism of in-stent restenosis. *J Biomed Mater Res A* 2009 August;90(2):465-71.
- (77) Kawai-Kowase K, Owens GK. Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007 January;292(1):C59-C69.
- (78) Regan CP, Adam PJ, Madsen CS, Owens GK. Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury. *J Clin Invest* 2000 November;106(9):1139-47.
- (79) Wamhoff BR, Hoofnagle MH, Burns A, Sinha S, McDonald OG, Owens GK. A G/C element mediates repression of the SM22alpha promoter within phenotypically modulated smooth muscle cells in experimental atherosclerosis. *Circ Res* 2004 November 12;95(10):981-8.
- (80) Thomas WA, Florentin RA, Reiner JM, Lee WM, Lee KT. Alterations in population dynamics of arterial smooth muscle cells during atherogenesis. IV. Evidence for a polyclonal origin of hypercholesterolemic diet-induced atherosclerotic lesions in young swine. *Exp Mol Pathol* 1976 April;24(2):244-60.
- (81) Grunwald J, Chobanian AV, Haudenschild CC. Smooth muscle cell migration and proliferation: atherogenic mechanisms in hypertension. *Atherosclerosis* 1987 October;67(2-3):215-21.

- (82) Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 November 11;100(23):13531-6.
- (83) Allahverdian S, Pannu PS, Francis GA. Contribution of monocyte-derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation. *Cardiovasc Res* 2012 July 15;95(2):165-72.
- (84) Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN, Sueishi K. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 May;27(5):1159-65.
- (85) Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 May;28(5):812-9.
- (86) Bauriedel G, Hutter R, Welsch U, Bach R, Sievert H, Luderitz B. Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. *Cardiovasc Res* 1999 February;41(2):480-8.
- (87) Ismail NA, Alavi MZ, Moore S. Lipoprotein-proteoglycan complexes from injured rabbit aortas accelerate lipoprotein uptake by arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1994 January;105(1):79-87.
- (88) Wang Y, Lindstedt KA, Kovanen PT. Mast cell granule remnants carry LDL into smooth muscle cells of the synthetic phenotype and induce their conversion into foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 June;15(6):801-10.
- (89) Klouche M, Rose-John S, Schmiedt W, Bhakdi S. Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. *Circulation* 2000 April 18;101(15):1799-805.
- (90) Zhou YF, Guetta E, Yu ZX, Finkel T, Epstein SE. Human cytomegalovirus increases modified low density lipoprotein uptake and scavenger receptor mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1996 November 1;98(9):2129-38.
- (91) Zhou YF, Shou M, Guetta E et al. Cytomegalovirus infection of rats increases the neointimal response to vascular injury without consistent evidence of direct infection of the vascular wall. *Circulation* 1999 October 5;100(14):1569-75.
- (92) Lim HJ, Lee S, Lee KS et al. PPARgamma activation induces CD36 expression and stimulates foam cell like changes in rVSMCs. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2006 September;80(3-4):165-74.
- (93) Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2012 July 15;95(2):156-64.
- (94) Yamada T, Press M, Vesselinovitch D, Wissler RW. Quantitative ultrastructural analysis of coronary atherosclerotic involvement in two macaque species. *Exp Mol Pathol* 1988 February;48(1):1-23.

- (95) Munoz NM, Leff AR. Highly purified selective isolation of eosinophils from human peripheral blood by negative immunomagnetic selection. *Nat Protoc* 2006;1(6):2613-20.
- (96) McKenna D, Sheth J. Umbilical cord blood: current status & promise for the future. *Indian J Med Res* 2011 September;134(3):261-9.
- (97) Rao M, hrlund-Richter L, Kaufman DS. Cord Blood Banking, Transplantation and iPSC: Success and Opportunities. *Stem Cells* 2011 November 8.
- (98) Ross R. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol* 1971 July;50(1):172-86.
- (99) Campbell JH, Campbell GR. Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle. *Clin Sci (Lond)* 1993 November;85(5):501-13.
- (100) Grenier G, Remy-Zolghadri M, Guignard R et al. Isolation and culture of the three vascular cell types from a small vein biopsy sample. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2003 March;39(3-4):131-9.
- (101) Loiola RA, Torres TC, Aburaya CM et al. Generation and characterization of a spontaneously immortalized endothelial cell line from mice microcirculation. *Exp Cell Res* 2013 February 14.
- (102) Honig MG, Hume RI. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J Cell Biol* 1986 July;103(1):171-87.
- (103) Li LH, Hensen ML, Zhao YL, Hui SW. Electrofusion between heterogeneous-sized mammalian cells in a pellet: potential applications in drug delivery and hybridoma formation. *Biophys J* 1996 July;71(1):479-86.
- (104) Spötl L, Sarti A, Dierich MP, Most J. Cell membrane labeling with fluorescent dyes for the demonstration of cytokine-induced fusion between monocytes and tumor cells. *Cytometry* 1995 October 1;21(2):160-9.
- (105) Blumenthal R, Sarkar DP, Durell S, Howard DE, Morris SJ. Dilation of the influenza hemagglutinin fusion pore revealed by the kinetics of individual cell-cell fusion events. *J Cell Biol* 1996 October;135(1):63-71.
- (106) Foxwell B, Browne K, Bondeson J et al. Efficient adenoviral infection with IkappaB alpha reveals that macrophage tumor necrosis factor alpha production in rheumatoid arthritis is NF-kappaB dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 July 7;95(14):8211-5.
- (107) Brighouse A, Dacks JB, Field MC. Rab protein evolution and the history of the eukaryotic endomembrane system. *Cell Mol Life Sci* 2010 October;67(20):3449-65.
- (108) Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev* 2011 January;91(1):119-49.
- (109) Humphries WH, Szymanski CJ, Payne CK. Endo-lysosomal vesicles positive for Rab7 and LAMP1 are terminal vesicles for the transport of dextran. *PLoS One* 2011;6(10):e26626.

- (110) Seachrist JL, Ferguson SS. Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sci* 2003 December 5;74(2-3):225-35.
- (111) Hook GR, Odeyale CO. Confocal scanning fluorescence microscopy: a new method for phagocytosis research. *J Leukoc Biol* 1989 April;45(4):277-82.
- (112) Odeyale CO, Hook GR. Computer image analysis method for rapid quantitation of macrophage phagocytosis. *J Leukoc Biol* 1990 November;48(5):403-11.
- (113) Stephens DJ, Allan VJ. Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science* 2003 April 4;300(5616):82-6.
- (114) Khodjakov A, Rieder CL. Imaging the division process in living tissue culture cells. *Methods* 2006 January;38(1):2-16.
- (115) McNally JG, Karpova T, Cooper J, Conchello JA. Three-dimensional imaging by deconvolution microscopy. *Methods* 1999 November;19(3):373-85.
- (116) Murray JM, Appleton PL, Swedlow JR, Waters JC. Evaluating performance in three-dimensional fluorescence microscopy. *J Microsc* 2007 December;228(Pt 3):390-405.
- (117) Rizzuto R, Carrington W, Tuft RA. Digital imaging microscopy of living cells. *Trends Cell Biol* 1998 July;8(7):288-92.
- (118) Ronneberger O, Baddeley D, Scheipl F et al. Spatial quantitative analysis of fluorescently labeled nuclear structures: problems, methods, pitfalls. *Chromosome Res* 2008;16(3):523-62.
- (119) Wallace W, Schaefer LH, Swedlow JR. A workingperson's guide to deconvolution in light microscopy. *Biotechniques* 2001 November;31(5):1076-8, 1080, 1082.
- (120) Swedlow JR. Quantitative fluorescence microscopy and image deconvolution. *Methods Cell Biol* 2007;81:447-65.
- (121) Sarder P, Nehorai A. Deconvolution methods for 3-D fluorescence microscopy images. *Ieee Signal Processing Magazine* 2006 May;23(3):32-45.
- (122) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001 December;25(4):402-8.
- (123) Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001 May 1;29(9):e45.
- (124) Ausubel F, Brent R, Kingston RE et al. Current protocols in molecular biology. 1997. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- (125) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 1989. Cold Spring Harbor: New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- (126) Manders E.M.M., Verbeek F.J., Aten J.A. Measurement of co-localization of objects in dual-colour images. *Journal of Microscopy* 1993 March;196(3):375-82.
- (127) Iijima M, Yamamoto J, Takada N, Ohata H, Momose K. Changes in Ca²⁺ signaling and contractile protein isoforms in smooth muscle cells from guinea pig ileum during culture. *J Smooth Muscle Res* 2001 April;37(2):53-66.
- (128) Vernon SM, Campos MJ, Haystead T, Thompson MM, DiCorleto PE, Owens GK. Endothelial cell-conditioned medium downregulates smooth muscle contractile protein expression. *Am J Physiol* 1997 February;272(2 Pt 1):C582-C591.
- (129) Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2012 May 7.
- (130) Andreeva ER, Pugach IM, Orekhov AN. Subendothelial smooth muscle cells of human aorta express macrophage antigen in situ and in vitro. *Atherosclerosis* 1997 November;135(1):19-27.
- (131) Finn AV, Nakano M, Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 July;30(7):1282-92.
- (132) Fujii K, Hao H, Ohyanagi M, Masuyama T. Intracoronary Imaging for Detecting Vulnerable Plaque. *Circ J* 2013 February 1.
- (133) Gallino A, Stuber M, Crea F et al. "In vivo" imaging of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2012 September;224(1):25-36.
- (134) Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 2002 November;8(11):1249-56.
- (135) Ikeda U, Shimada K. Matrix metalloproteinases and coronary artery diseases. *Clin Cardiol* 2003 February;26(2):55-9.
- (136) Li HX, Kong FJ, Bai SZ et al. Involvement of calcium-sensing receptor in oxLDL-induced MMP-2 production in vascular smooth muscle cells via PI3K/Akt pathway. *Mol Cell Biochem* 2012 March;362(1-2):115-22.
- (137) Lee E, Grodzinsky AJ, Libby P, Clinton SK, Lark MW, Lee RT. Human vascular smooth muscle cell-monocyte interactions and metalloproteinase secretion in culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 December;15(12):2284-9.
- (138) Risinger GM, Jr., Updike DL, Bullen EC, Tomasek JJ, Howard EW. TGF-beta suppresses the upregulation of MMP-2 by vascular smooth muscle cells in response to PDGF-BB. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010 January;298(1):C191-C201.
- (139) Risinger GM, Jr., Hunt TS, Updike DL, Bullen EC, Howard EW. Matrix metalloproteinase-2 expression by vascular smooth muscle cells is mediated by both stimulatory and inhibitory signals in response to growth factors. *J Biol Chem* 2006 September 8;281(36):25915-25.

- (140) Ruan XZ, Moorhead JF, Tao JL et al. Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in vascular smooth muscle cells by inflammatory cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 May;26(5):1150-5.
- (141) Matsumoto K, Hirano K, Nozaki S et al. Expression of macrophage (Mphi) scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma, which regulates gain of Mphi-like phenotype in vitro, and its implication in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 April;20(4):1027-32.
- (142) Bickel PE, Freeman MW. Rabbit aortic smooth muscle cells express inducible macrophage scavenger receptor messenger RNA that is absent from endothelial cells. *J Clin Invest* 1992 October;90(4):1450-7.
- (143) Wada Y, Sugiyama A, Yamamoto T et al. Lipid accumulation in smooth muscle cells under LDL loading is independent of LDL receptor pathway and enhanced by hypoxic conditions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 October 1;22(10):1712-9.
- (144) Pitas RE. Expression of the acetyl low density lipoprotein receptor by rabbit fibroblasts and smooth muscle cells. Up-regulation by phorbol esters. *J Biol Chem* 1990 July 25;265(21):12722-7.
- (145) Llorente-Cortes V, Otero-Vinas M, Camino-Lopez S, Costales P, Badimon L. Cholesteryl esters of aggregated LDL are internalized by selective uptake in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 January;26(1):117-23.
- (146) Orekhov AN, Tertov VV, Mukhin DN et al. Insolubilization of low density lipoprotein induces cholesterol accumulation in cultured subendothelial cells of human aorta. *Atherosclerosis* 1989 September;79(1):59-70.
- (147) Weaver AM, Lysiak JJ, Gonias SL. LDL receptor family-dependent and -independent pathways for the internalization and digestion of lipoprotein lipase-associated beta-VLDL by rat vascular smooth muscle cells. *J Lipid Res* 1997 September;38(9):1841-50.
- (148) Beyea MM, Reaume S, Sawyez CG et al. The oxysterol 24(s),25-epoxycholesterol attenuates human smooth muscle-derived foam cell formation via reduced low-density lipoprotein uptake and enhanced cholesterol efflux. *J Am Heart Assoc* 2012 June;1(3):e000810.
- (149) Chi JT, Rodriguez EH, Wang Z et al. Gene expression programs of human smooth muscle cells: tissue-specific differentiation and prognostic significance in breast cancers. *PLoS Genet* 2007 September;3(9):1770-84.
- (150) Martinez-Gonzalez J, Berrozpe M, Varela O, Badimon L. Heterogeneity of smooth muscle cells in advanced human atherosclerotic plaques: intimal smooth muscle cells expressing a fibroblast surface protein are highly activated by platelet-released products. *Eur J Clin Invest* 2001 November;31(11):939-49.

- (151) Babaev VR, Bobryshev YV, Stenina OV, Tararak EM, Gabbiani G. Heterogeneity of smooth muscle cells in atheromatous plaque of human aorta. *Am J Pathol* 1990 May;136(5):1031-42.
- (152) Shanahan CM, Weissberg PL. Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 March;18(3):333-8.
- (153) Mironov AA, Rekhter MD, Kolpakov VA et al. Heterogeneity of smooth muscle cells in embryonic human aorta. *Tissue Cell* 1995 February;27(1):31-8.
- (154) Schmitz G, Grandl M. Endolysosomal phospholipidosis and cytosolic lipid droplet storage and release in macrophages. *Biochim Biophys Acta* 2009 June;1791(6):524-39.
- (155) Botham KM, Moore EH, De PC, Bejta F. The induction of macrophage foam cell formation by chylomicron remnants. *Biochem Soc Trans* 2007 June;35(Pt 3):454-8.
- (156) Du H, Grabowski GA. Lysosomal acid lipase and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2004 October;15(5):539-44.
- (157) Jessup W, Kritharides L. Metabolism of oxidized LDL by macrophages. *Curr Opin Lipidol* 2000 October;11(5):473-81.
- (158) Toth IE, Szabo D, Bruckner GG. Lipoproteins, lipid droplets, lysosomes, and adrenocortical steroid hormone synthesis: morphological studies. *Microsc Res Tech* 1997 March 15;36(6):480-92.
- (159) Falcone DJ, Mated N, Shio H, Minick CR, Fowler SD. Lipoprotein-heparin-fibronectin-denatured collagen complexes enhance cholesteryl ester accumulation in macrophages. *J Cell Biol* 1984 October;99(4 Pt 1):1266-74.
- (160) Frontini MJ, O'Neil C, Sawyez C, Chan BM, Huff MW, Pickering JG. Lipid incorporation inhibits Src-dependent assembly of fibronectin and type I collagen by vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2009 April 10;104(7):832-41.
- (161) Cox RP, Krauss MR, Balis ME, Dancis J. Studies on cell communication with enucleated human fibroblasts. *J Cell Biol* 1976 December;71(3):693-703.
- (162) Dean MF, Cooper JA, Stahl P. Cell contact and direct transfer between co-cultured macrophages and fibroblasts. *J Leukoc Biol* 1988 June;43(6):539-46.
- (163) Loewenstein WR, Kanno Y, Socolar SJ. The cell-to-cell channel. *Fed Proc* 1978 October;37(12):2645-50.
- (164) Bucana C, Hoyer LC, Hobbs B, Breesman S, McDaniel M, Hanna MG, Jr. Morphological evidence for the translocation of lysosomal organelles from cytotoxic macrophages into the cytoplasm of tumor target cells. *Cancer Res* 1976 December;36(12):4444-58.

- (165) Liu D, Bryceson YT, Meckel T, Vasiliver-Shamis G, Dustin ML, Long EO. Integrin-dependent organization and bidirectional vesicular traffic at cytotoxic immune synapses. *Immunity* 2009 July 17;31(1):99-109.
- (166) Piehl M, Lehmann C, Gumpert A, Denizot JP, Segretain D, Falk MM. Internalization of large double-membrane intercellular vesicles by a clathrin-dependent endocytic process. *Mol Biol Cell* 2007 February;18(2):337-47.
- (167) Hergenreider E, Heydt S, Treguer K et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol* 2012 March;14(3):249-56.
- (168) Vercauteren D, Vandenbroucke RE, Jones AT et al. The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Mol Ther* 2010 March;18(3):561-9.
- (169) Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 2004 February 13;303(5660):1007-10.
- (170) Gerdes HH, Bukoreshtliev NV, Barroso JF. Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett* 2007 May 22;581(11):2194-201.
- (171) Onfelt B, Nedvetzki S, Yanagi K, Davis DM. Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol* 2004 August 1;173(3):1511-3.
- (172) Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 1993 August;92(2):883-93.
- (173) Piedrahita JA, Zhang SH, Hagan JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 May 15;89(10):4471-5.
- (174) Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992 October 16;258(5081):468-71.
- (175) Plump AS, Smith JD, Hayek T et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992 October 16;71(2):343-53.
- (176) Knowles JW, Maeda N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 November;20(11):2336-45.
- (177) Ohashi R, Mu H, Yao Q, Chen C. Cellular and molecular mechanisms of atherosclerosis with mouse models. *Trends Cardiovasc Med* 2004 July;14(5):187-90.
- (178) Wouters K, Shiri-Sverdlov R, Van Gorp PJ, van BM, Hofker MH. Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoE and Ldlr mice. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(5):470-9.

- (179) Sata M, Maejima Y, Adachi F et al. A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. *J Mol Cell Cardiol* 2000 November;32(11):2097-104.
- (180) Li G, Sanders JM, Bevard MH et al. CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury. *Am J Pathol* 2008 April;172(4):1141-52.
- (181) Francke A, Herold J, Weinert S, Strasser RH, Braun-Dullaeus RC. Generation of mature murine monocytes from heterogeneous bone marrow and description of their properties. *J Histochem Cytochem* 2011 September;59(9):813-25.
- (182) Francke A, Weinert S, Strasser RH, Braun-Dullaeus RC, Herold J. Transplantation of bone marrow derived monocytes: a novel approach for augmentation of arteriogenesis in a murine model of femoral artery ligation. *Am J Transl Res* 2013 March 28;5(2):155-69.
- (183) Lou E, Fujisawa S, Morozov A et al. Tunneling nanotubes provide a unique conduit for intercellular transfer of cellular contents in human malignant pleural mesothelioma. *PLoS One* 2012;7(3):e33093.
- (184) Nakashima Y, Wight TN, Sueishi K. Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans. *Cardiovasc Res* 2008 July 1;79(1):14-23.
- (185) Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994 December;94(6):2493-503.

10 Publikationen

- (1) Daniel JM, Bielenberg W, Stieger P, Weinert S, Tillmanns H, Sedding DG. Time-course analysis on the differentiation of bone marrow-derived progenitor cells into smooth muscle cells during neointima formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 October;30(10):1890-6.
- (2) Francke A, Herold J, Weinert S, Strasser RH, Braun-Dullaeus RC. Generation of mature murine monocytes from heterogeneous bone marrow and description of their properties. *J Histochem Cytochem* 2011 September;59(9):813-25.
- (3) Francke A, Weinert S, Strasser RH, Braun-Dullaeus RC, Herold J. Transplantation of bone marrow derived monocytes: a novel approach for augmentation of arteriogenesis in a murine model of femoral artery ligation. *Am J Transl Res* 2013 March 28;5(2):155-69.
- (4) Goette A, Hammwohner M, Bukowska A, Scalera F, Martens-Lobenhoffer J, Dobrev D, Ravens U, Weinert S, Medunjanin S, Lendeckel U, Bode-Boger SM. The impact of rapid atrial pacing on ADMA and endothelial NOS. *Int J Cardiol* 2010 October 4.
- (5) Jellinghaus S, Poitz DM, Ende G, Augstein A, Weinert S, Stutz B, Braun-Dullaeus RC, Pasquale EB, Strasser RH. Ephrin-A1/EphA4-mediated adhesion of monocytes to endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2013 May 23.
- (6) Lu L, Mende M, Yang X, Korber HF, Schnittler HJ, Weinert S, Heubach J, Werner C, Ravens U. Design and validation of a bioreactor for simulating the cardiac niche: a system incorporating cyclic stretch, electrical stimulation, and constant perfusion. *Tissue Eng Part A* 2013 February;19(3-4):403-14.
- (7) Medunjanin S, Weinert S, Poitz D, Schmeisser A, Strasser RH, Braun-Dullaeus RC. Transcriptional activation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit gene expression by oestrogen receptor-alpha. *EMBO Rep* 2010 March;11(3):208-13.
- (8) Medunjanin S, Weinert S, Schmeisser A, Mayer D, Braun-Dullaeus RC. Interaction of the double-strand break repair kinase DNA-PK and estrogen receptor-alpha. *Mol Biol Cell* 2010 May 1;21(9):1620-8.
- (9) Poitz DM, Augstein A, Weinert S, Braun-Dullaeus RC, Strasser RH, Schmeisser A. OxLDL and macrophage survival: essential and oxygen-independent involvement of the Hif-pathway. *Basic Res Cardiol* 2011 September;106(5):761-72.
- (10) Pretzel D, Pohlens D, Weinert S, Kinne RW. In vitro model for the analysis of synovial fibroblast-mediated degradation of intact cartilage. *Arthritis Res Ther* 2009;11(1):R25.
- (11) Weinert S, Poitz DM, Auffermann-Gretzinger S, Eger L, Herold J, Medunjanin S, Schmeisser A, Strasser RH, Braun-Dullaeus RC. The lysosomal transfer of LDL/cholesterol from macrophages into vascular smooth muscle cells induces their phenotypic alteration. *Cardiovasc Res* 2013 March 1;97(3):544-52.

11 Danksagungen

„We absolutely must leave room for doubt or there is no progress and no learning.

There is no learning without having to pose a question.

And a question requires doubt.“

(Richard Phillips Feynman 1964)

Frau Prof. Dr. med. Ruth H. Strasser möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung dieses interessanten Themas danken, sowie die Möglichkeit als Mitglied ihres Dresdener Teams einen Teil der hier vorgestellten Daten im Labor für experimentelle und molekulare Kardiologie der TU Dresden zu erheben. Gerne erinnere ich mich an die Zeit in Dresden zurück.

Für die Betreuung und Vertretung der Arbeit an der Fakultät Mathematik-Naturwissenschaften der TU Dresden gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. Karl Heinz van Pée.

Besonderen Dank möchte ich Prof. Dr. med. Rüdiger C. Braun-Dullaeus aussprechen. Nicht nur für das mir über die Jahre entgegengebrachte Vertrauen bei der Akquise der Laborausstattung und Planung der Labore im Haus 1, sondern vor allem für die ständige Bereitschaft, eine stets konstruktive, offene und gleichberechtigte wissenschaftliche wie nicht-wissenschaftliche Diskussion zu führen.

Weiterhin möchte ich den Kollegen aus dem Labor für experimentelle und molekulare Kardiologie (TU-Dresden) und dem Labor für Experimentelle Kardiologie (OVGU) danken. Dank Ihrer Kollegialität war es immer möglich, die richtige Unterstützung, Hilfestellung und Denkanstöße zur Lösung aller auftauchenden Probleme zu finden.

Ich danke zudem allen Koautoren und Kollegen die mich über die Jahre bei meiner wissenschaftlichen Tätigkeit begleitet und unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und Kristin. Sie haben es mir nicht nur ermöglicht ein Studium aufzunehmen, immer an mich geglaubt und mir und meiner Forschungsarbeit stets Verständnis entgegengebracht, sondern vor allem haben sie mich zu dem Menschen gemacht, der ich heute bin. Ohne sie wäre nichts so, wie es jetzt ist.

12 Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Dissertation wurde in der Zeit von April 2004 bis Mai 2013 unter der wissenschaftlichen Anleitung von Prof. Dr. med. Ruth H Strasser, Prof. Dr. med. Rüdiger C Braun-Dullaeus und Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz van Pée im Labor für experimentelle und molekulare Kardiologie an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden (4/2004-12/2008) sowie dem Labor der Experimentelle Kardiologie an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg (1/2009-5/2013) angefertigt.
