

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin III – Schwerpunkt
Kardiologie und Kreislauferkrankungen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz**

**Charakterisierung von CXCL16/SR-PSOX als neuer
Scavenger-Rezeptor auf Thrombozyten**

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

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

vorgelegt von

Gerhard Erich Maximilian Selhorst

aus

Regensburg

2013

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. A. E. May

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. T. Walker

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1. EINLEITUNG	7
1.1 Definition der Atherosklerose	7
1.2 Ätiologie	8
1.3 Atherogenese	8
1.3.1 „Response to injury“- Hypothese	8
1.3.2 „Lipoprotein-induced-atherosclerosis“- Hypothese	9
1.3.3 Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung	10
1.3.3.1 Entstehung von oxidiertem LDL und dessen Folgen	10
1.3.3.2 Bildung atheromatöser Plaques	11
1.3.4 Thrombozyten als Induktoren der Atherosklerose	12
1.3.4.1 Beteiligung von Thrombozyten im Früh- und Spätstadium der Atherosklerose	12
1.3.4.2 Bindung an Endothelzellen über Membranrezeptoren.....	12
1.3.4.3 Freisetzung von proatherogenen Mediatoren durch Thrombozyten	14
1.3.4.4 Rekrutierung von Monozyten initiiert Formation atherosklerotischer Läsionen	14
1.3.4.5 Wechselwirkung von Thrombozyten und Lipoproteinen	15
1.3.5 Scavenger-Rezeptoren	17
1.3.5.1 Einteilung	17
1.3.5.2 LOX-1	18
1.3.5.2.1 Struktur.....	18
1.3.5.2.2 Funktion	19
1.3.5.3 CD36	20
1.3.5.3.1 Struktur.....	20
1.3.5.3.2 Funktion	21
1.3.5.4 CXCL16/SR-PSOX	22
1.3.5.4.1 Struktur.....	23
1.3.5.4.2 Funktion	23
1.4 Fragestellung	26
2. MATERIAL UND METHODEN	28
2.1 Material	28
2.1.1 Verbrauchsmaterial	28
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	29
2.1.3 Pufferlösungen.....	30
2.1.4 Verwendete Antikörper und Fluorochrome	31
2.1.5 Geräte.....	32
2.2 Isolation humaner Thrombozyten.....	33
2.2.1 Probengewinnung	33
2.2.2 Bestimmung der Thrombozytenzahl	33

2.3 Konfokale Immunofluoreszenzmikroskopie	34
2.3.1 Funktionsprinzip	34
2.3.2 Mikroskopie immunofluoreszenzmarkierter Thrombozyten	35
2.4 Durchflusszytometrische Messungen (FACS)	36
2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie	36
2.4.2 Analyse und Darstellung	37
2.4.3 FACS-Analyse immunofluoreszenzmarkierter Thrombozyten	38
2.4.3.1 Erstellung eines Expressionsprofils thrombozytärer Oberflächenrezeptoren	38
2.4.3.2 Analyse der thrombozytären Dil-oxLDL Oberflächenbindung	39
2.4.3.3 Messung des thrombozytären Aktivierungszustandes	40
2.5 Flusskammeruntersuchungen	41
2.5.1 Versuchsaufbau und Funktionsprinzip	41
2.5.2 Analyse des Verhaltens von Thrombozyten an Proteinbeschichtungen in der Flusskammer	41
2.6 Statistische Verfahren	43
3. ERGEBNISSE	44
3.1. Thrombozyten exprimieren CXCL16/SR-PSOX	44
3.1.1 Detektion durch konfokale Lasermikroskopie	44
3.1.2 Aktivierungsabhängige Expression auf der Thrombozytenoberfläche	46
3.2 Thrombozyten binden oxidierte Lipoproteine über CXCL16/SR-PSOX	49
3.2.1 Oberflächenbindung von oxidiertem LDL auf aktivierten Thrombozyten	49
3.2.2 Aktivierte Thrombozyten binden oxidiertes LDL über CXCL16/SR-PSOX	50
3.2.3 Aktivierte Thrombozyten zeigen unter Flussbedingungen erhöhte Interaktion mit einer oxLDL/Kollagen-Matrix via CXCL16/SR-PSOX	52
3.3 Beeinflussung der thrombozytären P-Selektin-Expression durch oxLDL- Bindung an CXCL16/SR-PSOX	55
4. DISKUSSION	57
4.1 Expression von CXCL16/SR-PSOX auf Thrombozyten	57
4.2 Bindung von oxLDL auf Thrombozyten via CXCL16/SR-PSOX	59
4.3 Interaktion mit Kollagen-/oxLDLhaltigen Oberflächen via CXCL16/SR-PSOX	60
4.4 Einfluss von CXCL16/SR-PSOX auf die oxLDL-induzierte P-Selektin- Expression auf Thrombozyten	62
4.5 Schlussfolgerung	63
4.5.1 Stellenwert von CXCL16/SR-PSOX in der Atherogenese	63
4.5.2 CXCL16/SR-PSOX als Biomarker im akuten Koronarsyndrom	66
4.5.3 CXCL16/SR-PSOX als therapeutisches Angriffsziel	67

5. ZUSAMMENFASSUNG.....	69
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	71
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	86
8. VERÖFFENTLICHUNGEN	87
9. DANKSAGUNG.....	88
10. CURRICULUM VITAE	89

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ACD	Acid-citrate-dextrose
acLDL	acetylated low density lipoprotein
ACS	acute coronary syndrom
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zellen
ApoE-R2	Apolipoprotein E Receptor 2 (Low density lipoprotein receptor-related protein 8)
BPMCs	peripheral blood mononuclear cells
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCR	Chemokinrezeptor
CD	cluster of differentiation
CD40L	CD40 ligand (CD154)
CD62P	P-Selektin
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CXCL	CXC ligand
CXCR	CXC receptor
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyaninperchlorat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	epidermal growth factor
et al.	et altera
FACS	fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluoroisothiocyanat
FL	Fluoreszenzkanal
g	Gramm
GP	Glykoprotein
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
HDL	high-density lipoprotein
HIV	human immunodeficiency virus
hpf	high powerfield
hsCRP	high sensitivity c-reactive protein
HUVECs	human umbilical vein endothelial cells
ICAM	inter-cellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JAM	Junktionales Adhäsionsmolekül

Kat-Nr.	Katalognummer
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KO	knock-out
LDL	low-density lipoprotein
LDLR	low-density lipoprotein receptor
LOX-1	lectin-like oxidized LDL receptor-1
u.a.	unter anderem
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
M	Molar
mAk / mAb	monoklonaler Antikörper (antibody)
MAP	Mitogen aktiviertes Protein
MCP	monocyte chemoattractive protein
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minute(n)
mm	Millimeter
mmLDL	minimally modified low density lipoprotein
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	nucleic factor κB
NKT	Natürliche Killer-T-Zellen
oxLDL	oxidized low-density lipoprotein
p38 ^{MAPK}	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PBS	phosphate buffered saline
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PE	R-Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PPARγ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ
PRP	plättchenreiches Plasma
PSGL-1	p-selectin glycoprotein ligand-1
pH	potentia hydrogenii
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted (CCL5)
RT	Raumtemperatur
sCXCL16	soluble CXC-ligand 16
SD	Standardabweichung
SDF-1	stromal cell-derived factor
sLOX-1	soluble lectin-like oxidized LDL receptor-1
SMCs	smooth muscle cells

SR	Scavenger-Rezeptor
SR-A	Scavenger-Rezeptor Klasse A
SR-BI	Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ 1
Src	Src-Tyrosinkinasefamilie (sarcoma)
SR-PSOX	scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein (CXCL16)
SR-D/E/I	Scavenger-Rezeptor Klasse D/E/I
sek	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TGF- β	transforming growth factor beta
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TnT	Troponin T
TRAP	Thrombin Receptor Activator Peptide
Tz	Thrombozyten
U/min	Umdrehungen pro Minute
v.a.	vor allem
VLDL	very low density lipoprotein
vs.	versus
VCAM	vascular cell adhesion molecule
WHO	world health organization
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Definition der Atherosklerose

Arteriosklerose bezeichnet allgemein die bindegewebige Verhärtung von arteriellen Blutgefäßen durch Degeneration und Kalzifikation, unterscheidet dabei jedoch nicht zwischen Genese und Lokalisation der Läsionen in den Gefäßwandschichten. Atherosklerose im engeren Sinne beschreibt die histologischen Modifikationen an der innersten Gefäßhaut (Intima) und lässt sich so von anderen Gefäßerkrankungen, wie z.B. der Mediasklerose Typ Mönckeberg, abgrenzen. Die WHO definiert die Atherosklerose daher als eine „variable Kombination von Intimaveränderungen der Arterien (nicht Arteriolen), die aus einer fokalen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, sowie Kalkablagerungen bestehen, begleitet von Mediaveränderungen“ [31]. Im klinischen Alltag werden beide Begriffe häufig synonym verwendet. Die Erkrankung beginnt bereits im jugendlichen Alter und schreitet im Verlauf des Alterns fort. Es kommt zu einer kontinuierlichen Intima- und Mediaverdickung, einhergehend mit lokal entzündlichen Prozessen und Formation atheromatöser Plaques, die in das Gefäßlumen hineinragen. Folge kann eine Stenosierung mit arterieller Minderperfusion oder ein vollständiger Gefäßverschluss durch Thrombosierung, und konsekutiv die Infarzierung betroffener Gewebsareale in Herz, Gehirn oder anderen Organen sein. Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören in Deutschland und anderen Industrienationen zu den führenden Todesursachen. 2010 waren 41% der Sterbefälle in Deutschland auf Krankheiten des Kreislaufsystems zurückzuführen, mindestens 22% waren durch die Folgen einer ischämischen Herzerkrankung bedingt [171]. Eine wesentliche Komponente in der Pathogenese von koronarer Herzerkrankung, Apoplex und anderen Gefäßerkrankungen stellt somit die Atherosklerose dar.

1.2 Ätiologie

Epidemiologische Studien, wie z.B. die Framingham-Studie, haben maßgeblich dazu beigetragen, eindeutige vaskuläre Risikofaktoren für Entstehung und Begünstigung der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität und damit auch der zugrunde liegenden atherosklerotischen Gefäßveränderungen zu identifizieren [78]. Als Faktoren der ersten Ordnung gelten seither die Dyslipoproteinämie, gekennzeichnet durch eine Erhöhung des an Low-Density-Lipoproteine (LDL) gebundenen Cholesterins bei erniedrigten High-Density-Lipoproteinen (HDL), sowie Hypertonie, Diabetes mellitus und Nikotinabusus. Sogenannte Risikofaktoren zweiter Ordnung beinhalten vor allem Lifestyle-Faktoren wie Bewegungsarmut, Adipositas und physischer bzw. psychischer Stress. Neben diesen potentiell reversiblen Faktoren existieren noch unbeeinflussbare Bedingungen wie ein erreichtes Alter von über 40 Jahren, männliches Geschlecht oder genetische Prädisposition (z.B. familiäre Hyperlipoproteinämien) [5, 85].

1.3 Atherogenese

Für die Prozesse, die zum fortschreitenden Umbau der Gefäßinnenwände und -wände führen, sind in der Vergangenheit viele unterschiedliche Mechanismen postuliert worden. Als Meilensteine und Basis für die heutige Atheroskleroseforschung gelten jedoch insbesondere die Veröffentlichungen von Ross et al. 1976 sowie Goldstein et al. 1979.

1.3.1 „Response to injury“- Hypothese

Gemäß der „response to injury“ Theorie [145-147] sind Läsionen des arteriellen Endothels, verursacht durch mechanische, toxische und andere biophysikalische Einflüsse, als initialer Schritt der Atherogenese zu sehen. So entstandene fokale Läsionen ermöglichen durch die Freilegung subendothelialer, kollagener Fasern das Anheften von Thrombozyten mit nachfolgender Degranulation und Bildung von Aggregaten. Ross identifizierte dabei eine von Blutplättchen freigesetzte mitogene Substanz, die zu einer Proliferation glatter Muskelzellen in der Intima und Media führt: den „platelet

derived growth factor“ (PDGF) [143]. In der Läsion werden dadurch zusätzliche Mediatoren produziert, die den Einbau weiterer Matrixproteine und Lipide und so letztendlich die Plaquebildung stimulieren [144].

1.3.2 „Lipoprotein-induced-atherosclerosis“- Hypothese

Von Goldstein et al. stammt die Erkenntnis, dass endotheliale Läsionen nur als Teilschritt viel komplexerer Vorgänge in der Atherogenese eine Rolle spielen. Goldsteins Arbeitsgruppe gelang es, eine hochaffine Bindungsstelle für acetylierte, nicht jedoch für native LDL, auf Makrophagen nachzuweisen [54]. Anders als die zuvor aufgedeckte physiologische Metabolisierung von nativen LDL über den LDL-Rezeptor, unterliegt dieser neue Mechanismus keiner negativen Rückkopplung, so dass er eine massive Überladung der Makrophagen mit Cholesterinestern zur Folge hat [53]. Da eine Acetylierung von LDL in vivo nicht bekannt war, gingen Goldstein und Brown von einer noch unbekanntem chemischen Veränderung der nativen Low-Density-Lipoproteine aus, die eine spezifische Bindung und rasche Endozytose über die neuartige Rezeptorklasse ermöglichen. Diesem Rezeptor wurde die Aufgabe eines „scavenger-pathway“ zugeschrieben, weil er durch die Aufnahme von LDL eine Art „Straßenkehrerfunktion“ im Blutgefäßsystem erfüllt [17, 54]. Als bei genauerer Untersuchung dieser Mechanismen die Inkubation von acetyliertem LDL (acLDL) mit Endothelzellen eine signifikant beschleunigte Aufnahme und Degradierung in Makrophagen erbrachte [65], wurden kurz darauf von Morel et al. die dafür notwendigen Modifikationen der nativen LDL als Oxidation beschrieben [118]. Neben Endothelzellen konnten auch glatte Muskelzellen und Monozyten als Katalysatoren dieser Reaktion identifiziert werden [77]. Erst nach der oxidativen Veränderung ist eine spezifische Bindung des LDL an monozytäre Scavenger-Rezeptoren mit Endozytose möglich [133]. Gerrity et al. gelang der Nachweis von Lipid-beladenen Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen, die seinen Vermutungen zu Folge aus der Blutbahn eingewandert waren und sich dort in sogenannte Schaumzellen transformiert hatten [52].

1.3.3 Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung

Aktuelle Forschungsarbeiten legen der Atherogenese auch eine durch multifaktorielle Einflüsse hervorgerufene endotheliale Dysfunktion zugrunde [119, 139]. Durch diese Schädigung exprimieren Endothelzellen verstärkt Adhäsionsmoleküle (u.a. ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin) [43, 136, 180] auf ihrer Oberfläche, die im Blutstrom zirkulierenden Monozyten und Lymphozyten eine Emigration in die Intima der Arterienwände erlauben [184]. Dort erfolgt unter Einwirkung des von endothelialen Zellen freigesetzten Mediators M-CSF die Differenzierung zu Makrophagen [137]. Das geschädigte Endothel kann seine Barrierefunktion nur noch eingeschränkt erfüllen, so dass sich insbesondere bei Hyperlipidämie zunehmend LDL-Partikel im subendothelialen Raum einlagern können [139].

1.3.3.1 Entstehung von oxidiertem LDL und dessen Folgen

In der Intima der Arterienwand spielt sich nun unter Einwirkung von Enzymen wie Lipoxygenase und Myeloperoxidase die oxidative Modifikation des nativen LDL ab [19, 64, 192]. Über Zwischenstufen entsteht die oxidierte Form (oxLDL), die sich in ihren Eigenschaften erheblich von nativem LDL unterscheidet. Es ist zytotoxisch [172], wirkt chemotaktisch auf Monozyten und Lymphozyten und löst die Freisetzung inflammatorischer Zytokine aus [44, 107, 137]. Aktivierte Endothelzellen fördern mittels Ausschüttung von Mediatoren wie MCP-1 und Expression weiterer Adhäsionsproteine die Einwanderung zusätzlicher Monozyten [96, 111, 191]. Als Makrophagen erkennen sie über Scavenger-Rezeptoren spezifisch das oxidierte LDL und nehmen es auf. Nach lysosomaler Degradation akkumuliert dieses in großen Lipidtropfen und bewirkt die morphologische Transformation der Makrophagen in Schaumzellen [9, 52, 73, 172]. Die Ansammlung von Schaumzellen im subendothelialen Raum zieht weitere inflammatorische Reaktionen nach sich. Mediatoren wie Interleukin-6 oder TNF-alpha schädigen das Endothel, während thrombozytäres PDGF die Einwanderung und Proliferation glatter Muskelzellen stimuliert [72, 139].

1.3.3.2 Bildung atheromatöser Plaques

Verknüpft mit der Einlagerung weiterer Matrixproteine wie Kollagen, Elastin und Proteoglykanen transformieren sich die so entstandenen Läsionen zu atheromatösen Plaques, bedeckt mit einer stabilen fibromuskulären Kappe. Der scharf abgegrenzte Kern aus intakten und apoptotischen Schaumzellen mit freigesetzten Enzymen wie Elastase und Kollagenase wird in dieser Form auch Atherom genannt [96]. Eingewanderte T-Lymphozyten stimulieren mittels γ -Interferon (IFN- γ) Makrophagen, die wiederum mit der Produktion von Matrix-Metalloproteinasen die bindegewebige Struktur der Plaques vor allem in den „Schulterregionen“ angreifen [126, 139, 155]. Der fortschreitende Verlauf endet häufig in einer Instabilität der Plaque mit Ruptur der fibrösen Deckschicht und Freilegung einer thrombogenen Oberfläche aus Lipiden, Zelldetritus und Gewebsproteinen wie Kollagen, Fibronektin und von-Willebrand-Faktor [148]. Subendotheliale Adhäsionsrezeptoren ermöglichen perfundierenden Thrombozyten die Anheftung und Bildung mit Fibrin vernetzter Aggregate, die als akute Komplikation einen Verschluss des betroffenen arteriellen Gefäßes herbeiführen können [148].

1.3.4 Thrombozyten als Induktoren der Atherosklerose

1.3.4.1 Beteiligung von Thrombozyten im Früh- und Spätstadium der Atherosklerose

Neben ihrer kausalen Rolle bei der finalen Komplikation der Atherosklerose, einer Atherothrombose, ist in den letzten Jahren auch eine Mitbeteiligung von Thrombozyten bei Initiierung und Progression atherosklerotischer Läsionen gezeigt worden. Normalerweise dienen gesunde, nicht aktivierte Endothelzellen, als Barriere, die ein Anhaften von Plättchen und anderen Zellen an die Gefäßwände verhindert. In-vitro-Studien deckten auf, dass aktivierte Thrombozyten abgesehen von der Interaktion mit subendothelialen Matrixproteinen [110, 145, 148] auch in der Lage sind, mit intaktem oder leicht geschädigtem Endothel eine Bindung einzugehen [14, 48, 102].

1.3.4.2 Bindung an Endothelzellen über Membranrezeptoren

Darüber hinaus hat der Einsatz von intravitaler Mikroskopie bestätigt, dass auch in vivo ein koordinierter, mehrschrittiger Prozess stattfindet, der den Kontakt von Plättchen und Endothel einleitet [6, 41, 42, 101]. Dieser als „Rollen“ bezeichnete Vorgang setzt die Expression verschiedener Proteine auf der Zellmembran von Thrombozyten und Endothelzellen voraus. Um seine physiologischen Funktionen im Organismus adäquat zu erfüllen, ist jeder Thrombozyt mit einer Reihe von Rezeptoren ausgestattet. Die Komponenten dieses komplexen Systems sind überwiegend auf der Oberfläche lokalisiert oder werden bei Aktivierung aus intrazellulären Speichern exponiert.

Thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren können gemäß ihrer Molekülstruktur in fünf Gruppen eingeteilt werden: Integrine, Leuzin-reiche Glykoproteine, Selektine, Immunglobulin-ähnliche Adhäsionsrezeptoren und lysosomale Proteine (siehe Tabelle 1.1).

Tab. 1 Thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren. Modifiziert nach Gawaz [50]

Strukturelle Klassifizierung	Elektrophoretische Klassifizierung	CD Nomenklatur
Integrine		
$\alpha 2\beta 1$	GPIa-IIa	CD49b
$\alpha 5\beta 1$	GPIc-IIa	CD49c
$\alpha 6\beta 1$	GPIc'-IIa	CD49f
$\alpha II\beta 3$	GPIIb-IIIa	CD41-CD61
$\alpha v\beta 3$	GPav-IIIa	CD51-CD61
Leuzinreiche Glykoproteine		
-	GP-Ib-V-IX	CD42a-b-c
-	GPIV (GPIIIb)	CD36
Selektine		
-	P-Selektin	CD62P
Immunglobulinähnliche R.		
	GPVI	
-	ICAM-2	CD102
-	PCAM-1	CD31
	EMMPRIN/Basigin	CD147
Lysosomale Proteine		
-	GP53	CD63

Selektine sind Zelladhäsionsmoleküle (CAM), welche auf Endothelzellen, Leukozyten oder Plättchen exprimiert werden und daher als E-, L- oder P-Selektin bezeichnet werden. P-Selektine (CD62P) werden in Weibel-Palade-Körperchen unstimulierter Endothelzellen sowie in α -Granula unstimulierter Thrombozyten gespeichert und bei Aktivierung in die Zelloberfläche überführt [47]. Beim Rollvorgang binden nun P-Selektine locker an ihre Liganden, z.B. Glykoprotein-Ib α [142] oder PSGL-1 [41, 106, 110]. Durch wechselseitige Stimulation nimmt die Expression von CD62P weiter zu und erlaubt schließlich, vermittelt über $\beta 3$ -Integrine, die feste Adhäsion der Plättchen auf der Endotheloberfläche [47, 165]. In vivo eingesetzte Antikörper gegen GP IIb/IIIa

sowie ein Mangel an GP-IIb/IIIa bei Erkrankungen wie der Glanzman-Thrombasthenie reduzieren die feste Adhärenz aktivierter Thrombozyten an Endothelzellen [98]. Folglich wird dem GP IIb/IIIa Rezeptor die Fähigkeit zugeschrieben, unter Einbezug von freiem Fibrinogen, Fibronektin und von-Willebrand-Faktor, Plättchen an endotheliale Zellen binden zu lassen [14, 98].

1.3.4.3 Freisetzung von proatherogenen Mediatoren durch Thrombozyten

Feste Adhärenz von Thrombozyten bewirkt deren maximale Stimulation mit daraus folgender Umorganisation des Zytoskeletts, Formänderung und Degranulierung [98]. Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- β , EGF), Chemokinen (u.a. RANTES, CXC chemokine ligand 4, CXC chemokine ligand 5) und Zytokinen (z.B. Interleukin-1 β , CD40L, β -Thromboglobulin) aus Granula, Zytosol und kanalikulärem System trägt zu einer lokalen Gewebsreaktion und Entzündung endothelialer Zellen bei [47, 108]. Insbesondere thrombozytäres CD40L (CD154) und IL-1 β sind als Stimulantien für die Inflammation von Endothelzellen, einhergehend mit Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen (ICAM-1) und Ausschüttung von Botenstoffen wie MCP-1, identifiziert worden [46, 62, 75, 105]. Von den über 300 Substanzen, die von aktivierten Thrombozyten synthetisiert und sezerniert werden können, stehen einige weitere unter dem Verdacht, proatherogene Wirkungen zu vermitteln (z.B. Secretogalin III, Calumenin, Cyclophilin A) [29, 113].

1.3.4.4 Rekrutierung von Monozyten initiiert Formation atherosklerotischer Läsionen

Eine ideale Matrix zur lokalisierten Extravasation zirkulierender Monozyten und anderer inflammatorischer Zellen bieten aktivierte, an Gefäßwänden adhärenente Plättchen [47, 101, 108]. Verschiedene Rezeptormoleküle wie P-Selektin, GPIIb α , JAM-3, JAM-C, ICAM-3 usw. sind an diesen Bindungsvorgängen beteiligt [36, 92, 149]. In Anwesenheit der zahlreichen Chemokine, Zytokine, Gewebefaktoren und Proteasen differenzieren sich eingewanderte Monozyten in Makrophagen, was bereits als progressiver Schritt in Richtung Plaqueformation gesehen werden kann. Makrophagen internalisieren

zunehmend Plättchen verändertes LDL [40] sowie LDL beladene Thrombozyten und transformieren zu Schaumzellen [30, 164]. Gleichzeitig treten adhärenente Thrombozyten auch mit anderen Zelltypen wie z.B. dendritischen Zellen [92] in Kontakt.

1.3.4.5 Wechselwirkung von Thrombozyten und Lipoproteinen

Bisher wurde vermutet, dass Bindung und Aufnahme von modifizierten Lipoproteinen (z.B. mmLDL oder oxLDL) in Makrophagen die Schlüsselrolle in der Atherogenese einnehmen [157]. Es wird jedoch deutlicher, dass auch die Interaktion von Blutplättchen und Lipoproteinen Einfluss auf atherogene Prozesse wie z.B. die Schaumzellbildung hat.

Im Blutstrom stehen Plättchen in ständigem Kontakt zu den zirkulierenden Lipoproteinen LDL, VLDL und HDL. Bereits 1982 konnten Koller et al. nachweisen, dass Thrombozyten natives LDL bis zum Erreichen eines Sättigungswerts spezifisch binden können, während VLDL unspezifisch und ohne Sättigungskinetik an die Plasmamembran gebunden werden [84]. In vitro Studien deckten auf, dass Thrombozyten im Unterschied zu Hepatozyten den LDL-Rezeptor ApoE-R2' besitzen, der ebenfalls Apolipoprotein B 100 erkennt und nach Bindung u.a. eine p38^{MAPK} abhängige Signalkaskade auslöst, die Thrombozyten für Agonisten sensibilisiert und damit die Schwelle für Degranulierung, Aggregation und Adhäsion senkt [4, 9, 140]. Einen umgekehrten Effekt erzielt der Kontakt zu HDL, die Apolipoproteine der Klasse A I und II enthalten. Wahrscheinlich wird die Funktion von Plättchen, vermittelt über ABCA1, so beeinflusst, dass die Aktivierungsschwelle gesteigert wird und damit eine Desensibilisierung stattfindet [11]. Außerdem hat HDL eine antioxidative und anti-inflammatorische Wirkung [153].

Entgegen früherer Annahmen ist heute bekannt, dass oxidiertes LDL nicht nur an Gefäßwänden entsteht, sondern an jeglichen Orten im Blutkreislauf, die oxidativem Stress ausgesetzt sind, gebildet und anschließend mit dem Blutstrom verdriftet wird [4]. Sogar Thrombozyten selbst sind befähigt, mit Hilfe eines NADPH-Oxidase abhängigen Mechanismus, modifiziertes LDL zu

erzeugen [10, 18]. In-vitro-Untersuchungen verschiedener Autoren zeigten, dass Plättchen oxLDL binden und abhängig vom Grad der Oxidation (>15%) eine mehrfach höhere p38^{MAPK} gesteuerte Aktivierung erfahren als durch native Lipoproteine [4, 86, 194]. Dies lässt den Schluss zu, dass neben dem ApoE-R2' LDL-Rezeptor eine weitere Rezeptorklasse beteiligt sein muss. Aus Versuchen von Goldstein et al. mit Makrophagen war seit 1979 die Existenz von Scavenger-Rezeptoren bekannt [54], so dass deren Beteiligung auch bei der Thrombozyten - oxLDL Interaktion vermutet und aufgedeckt werden konnte [27, 87].

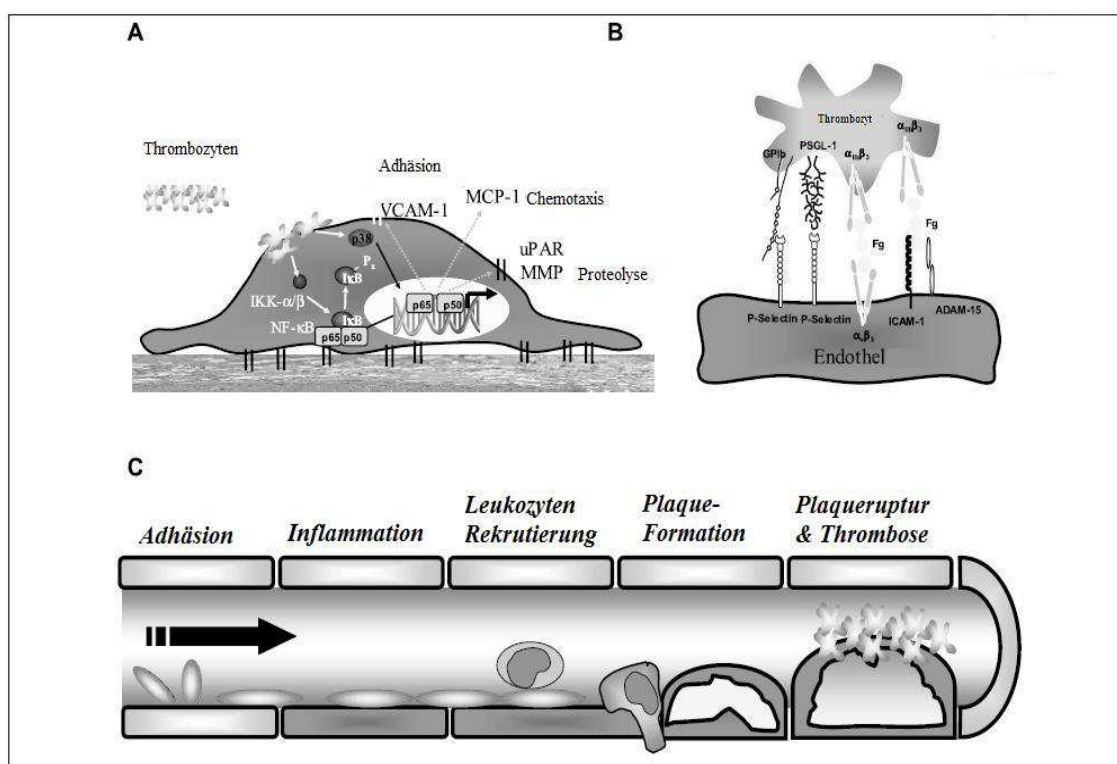


Abb. 1: Thrombozyten als Induktor der Atherosklerose. Modifiziert nach Langer/Gawaz [93].

Durch Adhäsion von Thrombozyten an Endothelzellen (**A**) werden via I κ B und NF- κ B Signalkaskaden ausgelöst, die zur Aktivierung von Zelladäsionsmolekülen sowie Freisetzung von Botenstoffen und Metalloproteinasen führen (**B**). Konsekutive inflammatorische Prozesse begünstigen die Rekrutierung von Leukozyten mit Formation atherosklerotischer Läsion. Auch im Endstadium der Atherosklerose, einer Plaqueruptur mit Atherothrombose (**C**), sind Thrombozyten durch interzelluläre Aggregation beteiligt.

1.3.5 Scavenger-Rezeptoren

1.3.5.1 Einteilung

Scavenger-Rezeptoren sind transmembranäre Glykoproteine, die für die spezifische Bindung und Internalisierung von modifiziertem LDL verantwortlich sind. Insgesamt sind mindestens 8 verschiedene Subtypen bekannt, die sich im Aufbau, im Vorkommen und im Spektrum der Liganden teils beträchtlich unterscheiden. Auf Thrombozyten sind bislang SR-A, SR-BI, CD36, CD68 und LOX-1 beschrieben worden. Eine gängige Klassifizierung kann Tabelle 1.2 entnommen werden.

Tab. 2 SR-Expression auf Thrombozyten. Modifiziert nach Siegel-Axel [164]

SR-Klasse	SR-Name	Expression alio loco	Autor
SR-A	SR-AI SR-AII (CD 204)	Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen	Krieger et al.
SR-B	<u>SR-BI</u> SR-BII CLA-1	Monozyten/Makrophagen, Dendritische Zellen, Hepatozyten,	Imachi et al.
SR-B	<u>CD36</u>	Monozyten/Makrophagen, Dendritische Zellen, Adipozyten, Endotheliale und epitheliale Zellen	Tandon et al.
SR-D	<u>CD68</u> (Makro- sialin)	Makrophagen, Dendritische Zellen, Osteoklasten	Nover et al.
SR-E	<u>LOX-1</u>	Monozyten/Makrophagen, vaskuläre Endothelzellen und glatte Muskelzellen	Endemann et al.
SR-G	<u>SR-PSOX/</u> <u>CXCL16</u>	Makrophagen, Dendritische Zellen, Endothelzellen, B-Zellen, T-Zellen, glatte Muskelzellen, Podozyten	

Im Folgenden werden die in dieser Dissertation untersuchten Vertreter LOX-1, CD36 und CXCL16/SR-PSOX näher vorgestellt.

1.3.5.2 LOX-1

Der „lectin-like oxidized LDL receptor-1“ ist bislang der einzige bekannte Scavenger-Rezeptor der Klasse E. Der zugehörige Genort befindet sich auf Chromosom 12. Sawamura et al. entdeckten 1997 LOX-1 als neuartigen Scavenger-Rezeptor auf Endothelzellen, der ihrer damaligen Ansicht nach vor allem die lokale Bindung von oxLDL und das Fortschreiten der endothelialen Dysfunktion unterstützt [152]. Inzwischen wurde LOX-1 jedoch als Multi-Ligand-Rezeptor mit Vorkommen auf Monozyten bzw. Makrophagen, Thrombozyten und glatten Muskelzellen beschrieben, der in allen Stadien der Atherogenese eine aktive Rolle spielt [22, 80, 193]. Er gilt als der wichtigste Mediator der zellulären oxLDL-Toxizität mit einer hohen Expressionsrate an den Prädilektionsstellen der Atherosklerose (z.B. Aorta, Karotiden, Koronararterien) [24]. Die Expression von LOX-1 kann in vitro sowohl durch proinflammatorische Stimuli als auch mechanischen oder oxidativen Stress gesteigert werden, darüber hinaus zeigte sich auch in vivo eine Hochregulation, insbesondere bei Patienten mit Hypertonie, Diabetes mellitus oder Hyperlipidämie [90, 121, 122, 130].

1.3.5.2.1 Struktur

Humanes LOX-1 ist ein 50 kDa Glykoprotein des Typs II, bestehend aus einem kurzen zytoplasmatischen Anker, einer einzelnen transmembranären Domäne und einer extrazellulären C-Typ-Lektin Domäne. In diesem Abschnitt befinden sich bestimmte Protein- und Kohlenhydratsequenzen, die zur Erkennung der unterschiedlichen Liganden dienen. Durch eine bisher unbekannte Protease kann LOX-1 gespalten und in eine lösliche Form überführt werden (sLOX-1) [6, 23, 24].

1.3.5.2.2 Funktion

In der Atherogenese vermittelt LOX-1 die hochaffine Bindung und Internalisierung von oxLDL in Endothelzellen, Makrophagen und Thrombozyten. Es wurde gezeigt, dass LOX-1 in Zellen atherosklerotischer Plaques vermehrt exprimiert wird und an der oxLDL-vermittelten Transformation von Makrophagen in Schaumzellen beteiligt ist [33]. An Endothelzellen verursacht die Bindung von oxLDL via LOX-1 eine Aktivitätsreduktion der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und eine Induktion der NADPH-Oxidase, die in einem Ungleichgewicht mit Freisetzung schädlicher reaktiver Sauerstoffspezies und Progression der endothelialen Dysfunktion resultiert. Über verschiedene Signaltransduktionswege (u.a. p38-MAPK, NF- κ B) wird zum einen die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen (E-, P-Selektine, ICAM-1, VCAM-1 etc.) gesteigert, zum anderen auch Zellapoptose eingeleitet [130].

Zu weiteren Liganden von LOX-1 gehören neben oxLDL, acLDL und hypochlorit-modifiziertem HDL auch anionische Phospholipide, grampositive und gramnegative Bakterien und apoptotische Zellen [24, 131]. Auf aktivierten Thrombozyten exponierte Phospholipide können als Epitope für LOX-1 dienen und eine feste interzelluläre Adhäsion ermöglichen. Dies spielt einerseits bei der Thrombusstabilisierung eine Rolle. Andererseits haben in-vitro-Untersuchungen auch gezeigt, dass Endothelzellen über LOX-1 direkten Kontakt mit aktivierten Plättchen eingehen, ein Effekt, der sich durch Zugabe von LOX-1-mAk antagonisieren lässt [79]. Wie unter 1.3.4 ausführlich beschrieben, ist die Plättchen-Endothel-Interaktion in der Atherogenese ein bedeutender Promotor der Endothelzell-Aktivierung und der zellulären Dysfunktion.

Chen et al. identifizierten LOX-1 als wichtigen Vertreter der Scavenger-Rezeptoren auf Thrombozyten. Er wird aktivierungsabhängig durch Fusion von α -Granula mit der Plasmamembran exprimiert und ist neben CD36 für den Großteil der thrombozytären oxLDL-Bindung verantwortlich. Durch Zugabe von LOX-1-mAk konnte nicht nur die aktivierungsabhängige Expression von LOX-1, sondern auch die spezifische Bindung und Internalisierung von oxidierten Lipoproteinen an Thrombozyten signifikant reduziert werden [22].

Neuere Forschungsarbeiten haben außerdem ergeben, dass lösliches LOX-1 (sLOX-1) bei akutem Koronarsyndrom im Serum erhöht messbar ist und daher auch als sensitiver Biomarker verwendet werden kann [63, 120].

1.3.5.3 CD36

CD36 ist ein Scavenger-Rezeptor der Klasse B und wird in der Fachliteratur u.a. synonym als Glykoprotein IV (GPIV), Glykoprotein IIIb (GPIIIb), PAS IV, FAT oder SCARB3 bezeichnet. Das für CD36 codierende Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 7 [39]. Als Ende der 1970er Jahre die Zusammensetzung der Glykokalyx auf der Zelloberfläche humaner Thrombozyten systematisch auf ihre Bestandteile untersucht wurde, gelang die Isolation mehrerer Glykoproteine, darunter auch Glykoprotein IV [132]. Seither zählt es neben GPIb und dem GPIIb/IIIa-Komplex zu den vier Glykoproteinen auf Plättchen, die gemessen am Gehalt von Sialinsäure den größten Anteil an der glykosylierten Zelloberfläche stellen [175]. In der Zwischenzeit wurde gezeigt, dass thrombozytäres GPIV in Aufbau und Struktur identisch zum Monozyten-Marker CD36 [175] und anderen bekannten Rezeptoren ist [57] und eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden aufweist. Außerdem konnte eine Expression auf vielen Zelltypen, wie z.B. Monozyten bzw. Makrophagen [7, 56, 175], Endothelzellen [173] [88], Epithelzellen [57], glatten Muskelzellen [104] und Adipozyten [61] nachgewiesen werden.

1.3.5.3.1 Struktur

Humanes CD36 ist ein integrales Membranprotein mit einem variierenden Molekulargewicht von 78 bis 88 kDA, abhängig von posttranslationaler Glykosylierung und exprimierendem Zelltyp [56]. Als Mitglied der SR-Klasse B besteht es aus zwei transmembranären Domänen, die extrazellulär über eine Schleife verbunden sind („hairpin-like“-Struktur). Zwei α -Helices mit hydrophoben Regionen dienen der ditopen transmembranären Komponente als Verankerung in der Plasmamembran, so dass N- und C-terminales Ende auf der zytoplasmatischen Seite liegen [58, 176]. Der größte Proteinanteil befindet sich extrazellulär und ist stark N-glykosidisch modifiziert, was einen gewissen

Schutz vor Degradation durch freigesetzte Proteinasen in geschädigten oder entzündlichen Gewebsarealen bieten könnte [168].

1.3.5.3.2 Funktion

Aufgrund seiner nahezu ubiquitären Expression auf humanen Zellen und seiner Fülle an potentiellen Liganden kann CD36 als multifunktionaler Rezeptor angesehen werden, der einerseits an vielfältigen physiologischen Prozessen beteiligt ist, zum anderen aber auch in der Pathophysiologie von arterieller Hypertonie, Diabetes [3, 95], Kardiomyopathie [69], Morbus Alzheimer [68, 141], Malaria [12, 13], oder Atherosklerose eine Rolle spielt [37, 51, 89, 168].

In seiner Funktion als Adhäsionsrezeptor kann CD36 Zell-Zell-Interaktionen vermitteln, indem z.B. Kollagen I und IV [56, 91] oder auch Thrombospondin-1, ein multifunktionales Protein, das in der extrazellulären Matrix vorkommt und von stimulierten Blutplättchen aus α -Granula sezerniert wird, als Epitope dienen [56, 169]. Durch Vernetzung mit Thrombospondin kann CD36 regulierend in zelluläre Prozesse der Adhäsion, Migration, Proliferation und Angiogenese [37, 169] sowie Thrombozytenaggregation und Thrombusstabilisierung eingreifen [7, 112]. Weitere Aufgaben sind der Transport von langkettigen Fettsäuren [2, 26], die Erkennung und Phagozytose von apoptotischen Zellen [151] oder von Erythrozyten, die im Rahmen der Malaria-Erkrankung mit Plasmodium falciparum infiziert wurden [111].

In der Atherogenese stellt monozytäres CD36 einen wichtigen Rezeptor für die hochaffine Bindung von oxLDL dar [35], der auf Schaumzellen sowie in atherosklerotischen Arealen verstärkt exprimiert wird [123, 135], und in erheblichem Maße zur Überladung von Monozyten mit Cholesterinestern beiträgt [127]. Im Tierversuch zeigten genetisch veränderte Mäuse, bei denen das CD36 Gen gezielt ausgeschaltet und damit die zelluläre Expression verhindert wurde, eine reduzierte oxLDL-Aufnahme in Monozyten sowie einen Rückgang der Schaumzellbildung und Plaqueformation im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen [38, 128]. Weitere Anhaltspunkte für eine proatherogene Wirkung von CD36 bieten zahlreiche Forschungsarbeiten, die eine oxLDL abhängige Induktion inflammatorischer Transkriptionsfaktoren (NF- κ B), die

subsequente Freisetzung von Zytokinen (u.a. IL-6), reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Zytoadhäsionsrezeptoren zur Monozytenrekrutierung belegen [60, 71, 100, 169]. Sobald CD36-positive Monozyten oxidierten Lipoproteinen ausgesetzt werden, verursacht eine PPAR γ gesteuerte Signalkaskade eine Zunahme der CD36-Transkription, was wiederum im Sinne eines „feed forward“ die oxLDL Aufnahme und die Differenzierung zu Makrophagen fördert [167, 178].

CD36 war bereits zuvor als thrombozytärer Rezeptor bekannt, so dass unlängst auch eine konzentrationsabhängige Bindung von oxLDL an Thrombozyten gezeigt wurde. Da dieses Zusammenspiel durch Zugabe von CD36-mAk fast vollständig aufgehoben werden kann, gilt eine spezifische Interaktion über CD36 als wahrscheinlich [134, 167]. Nach Bindung werden intrazelluläre Signale über Kinasen der Src- und MAP-Familie moduliert und beeinflussen dadurch Aktivierungsgrad [27, 87] und Sensibilität für physiologische Aktivatoren [21, 179]. Eine erhöhte Plättchenreaktivität geht letztendlich mit einem „prothrombotischen Phänotyp“ einher und zählt daher als wichtiger pathogenetischer Faktor der Atherothrombose [167]. Anhand dieser Experimente wurde anschaulich demonstriert, dass thrombozytäres CD36 proatherogene und prothrombotische Effekte unterhält und als wichtiger Angriffspunkt auf der Suche nach therapeutischen Strategien einzustufen ist.

1.3.5.4 CXCL16/SR-PSOX

CXCL16 nimmt im Unterschied zu den oben genannten Scavenger-Rezeptoren eine Sonderstellung ein. Im Jahre 2000 haben Matloubian et al. und parallel Wilbanks et al. mit CXC Chemokin Ligand (CXCL) 16 ein bisher unbekanntes α -Chemokin beschrieben, das sowohl membrangebunden als auch in löslicher Form existiert und Ligand des Rezeptors CXCR6 ist [103, 185]. Zur selben Zeit spürten Shimaoka et al. durch Klonen von mRNA aus humanen Makrophagen einen neuartigen Rezeptor für Phosphatidylserin und oxidiertes Lipoprotein auf, abgekürzt SR-PSOX [161]. Überraschenderweise stimmten beide Proteine in Aminosäuresequenz und Struktur überein, so dass mit CXCL16/SR-PSOX ein Molekül vorgestellt werden konnte, das eine einzigartige duale Funktion im

menschlichen Organismus einnimmt. Durch weiterführende Untersuchungen wurde sein Genort auf Chromosom 17p13 lokalisiert [103] und eine Expression auf dendritischen Zellen [103], B-Zellen [185], T-Zellen [158], glatten Muskelzellen [67, 183], Endothelzellen [67] und Podozyten [59] detektiert. Der zugehörige Chemokinrezeptor CXCR6, der gleichermaßen als HIV-Korezeptor BONZO, STRL33, TYMSTR oder CD186 bezeichnet wird, gehört zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren und wird auf Makrophagen [45], dendritischen Zellen [70], B-Zellen [156], CD4+/CD8+-T-Zellen [150, 174], NKT [81, 82] und glatten Muskelzellen [20] exprimiert.

1.3.5.4.1 Struktur

CXCL16 ist ein transmembranäres Glykoprotein der Klasse I und wird zur Scavenger-Rezeptor Klasse G gerechnet. Es setzt sich aus 254 Aminosäuren zusammen und weist in seiner membrangebundenen Form ein MW von 60 kDa auf [161]. CXCL16/SR-PSOX besitzt keinerlei strukturelle Homologien zu anderen Scavenger-Rezeptoren, dafür jedoch zu CX3CL1, das bislang zweite bekannte Chemokin mit transmembranärer Komponente. Nach der Biosynthese als intrazelluläres Prekursorprotein erfolgt rasch die posttranslationale Modifikation, bevor Abtransport und Einbau in die Plasmamembran stattfinden. Die extrazelluläre, N-terminale CXC Chemokin-Domäne ist über einen reichlich glykosylierten Schaft („mucin-like stalk“) mit dem hydrophoben transmembranären Segment verbunden, das C-terminale Ende wird von einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz gebildet [103, 161, 185]. Durch proteolytische Aktivität von Metalloproteinasen, vorrangig ADAM10 und ADAM17, wird konstitutiv und induzierbar ein Teil des membrangebundenen CXCL16 gespalten und in seine lösliche Form von 35 kDa MW überführt [1, 55].

1.3.5.4.2 Funktion

Bisher ist eine Beteiligung von CXCL16 an drei wichtigen biologischen Prozessen im menschlichen Körper belegt: Zelladhäsion, Inflammation und „Scavenging“. CXCL16/SR-PSOX fungiert in membrangebundener Form als Zytoadhäsionsmolekül, das über die CXC Chemokin-Domäne direkte und spezifische Bindungen zu CXCR6 positiven Zellen eingehen kann. Dies zeigten

Shimoaka et al. durch den Einsatz besonderer Assays, in denen immobilisiertes humanes CXCL16 die Rekrutierung und feste Adhärenz CXCR6-positiver Zellen ermöglichte [124, 162]. Dazu zählen Antigen präsentierende Zellen (APC) wie Makrophagen oder dendritische Zellen und T-Zell-Subpopulationen (CD4+/CD8+-T-Zellen, NKT), die ihrerseits eine wichtige Rolle bei der Einleitung und Regulation einer Immunantwort innehaben. Des Weiteren übt CXCL16 auf diese aktivierte T-Zellen eine starke chemoattraktive Wirkung aus, wenn es von Metalloproteinasen degradiert wurde und in gelöster Form vorliegt [76, 103]. Auf diese Weise kann CXCL16 zunächst Chemotaxis und nachfolgend in Kooperation mit weiteren Adhäsionsrezeptoren Rekrutierung und Bindung der angelockten inflammatorischen Zellen bewirken. Interaktionen über die CXCL16/CXCR6 Achse tragen demnach zur bidirektionalen Stimulation, Migration von Entzündungszellen und Aktivierung der antigenspezifischen primären und sekundären T-Zell Antwort bei [162]. Ferner erlaubt die Chemokin-Domäne der transmembranären Variante das spezifische Erkennen und Binden von Membranbestandteilen grampositiver und gramnegativer Bakterien, wodurch CXCL16 die Phagozytose von pathogenen Keimen unterstützen kann [163]. Seine Bedeutung als immunmodulatorisches Chemokin zeigt sich auch in der erhöhten Messbarkeit im Serum und Gewebe von Patienten, die an chronischen inflammatorischen Erkrankungen wie z.B. COPD [34], Sklerodermie [189], systemischem Lupus erythematoses [186], akuter graft-versus-host Krankheit [15] oder entzündlicher valvulärer Kardiomyopathie [188] leiden.

Im Allgemeinen wurde CXCL16/SR-PSOX bereits kurz nach seiner Entdeckung als proatherogen eingestuft, da Minami et al. die Expression von reichlich mRNA und Protein in atherosklerotischen Plaques humaner Koronarien und Karotiden, aber nicht in der gesunden Arterienwand, beschrieben [115]. Zusätzlich war schon zuvor die Funktion als oxLDL-bindender Scavenger-Rezeptor bekannt [161], so dass man von einer überwiegenden Expression auf lipidreichen Plaquemakrophagen ausging. Immunhistochemische Färbungen bestätigten daraufhin die massive Anwesenheit von CXCL16 und CXCR6 in Makrophagen- und T-Zell-reichen Regionen der atherosklerotischen Läsionen

[187]. Auch im Tierversuch wiesen atherosklerotische Läsionen fettreich ernährter Apolipoprotein-E-defizienter Mäuse (ApoE^{-/-}) im Vergleich zu den Gefäßwänden gesunder Wildtypmäuse (C57BL/6) durchwegs erhöhte Expressionsraten von CXCL16/SR-PSOX auf [187]. Als potentielle Stimulatoren und Regulatoren dieser Expression auf Plaque-assoziierten Zellen wie Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen konnten in verschiedenen in vitro Studien atherogene Mediatoren wie IFN- γ , TNF- α [1, 187] oder IL-18 [177] identifiziert werden. Die IFN- γ induzierte Hochregulation von CXCL16 geht gleichzeitig mit einer erhöhten oxLDL-Aufnahme in humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) einher, was eine Beteiligung von CXCL16 bei spezifischer Bindung und Internalisation oxidierten Lipoproteine in diese Zellen wahrscheinlich macht [160, 187]. Tatsächlich blockierte der Einsatz von CXCL16/SR-PSOX-mAk diese Bindung bei PBMCs in vitro wieder [187], im Tierversuch zeigte sich die oxLDL Aufnahme in Makrophagen CXCL16/SR-PSOX-defizienter Mäuse sogar um 30% geringer als in Makrophagen der Wildtypmäuse [8]. Dennoch entwickelten diese CXCL16^{-/-}/LDLR^{-/-} Mäuse im Vergleich zu reinen LDLR^{-/-} Mäusen in allen Stadien und Lokalisationen größere atherosklerotische Läsionen, was gegen die zuvor erhobenen proatherogenen Wirkungen von CXCL16 spricht [8]. Zusammenfassend muss CXCL16/SR-PSOX daher als multifunktionales, noch nicht in seiner Widersprüchlichkeit hinreichend verstandenes Molekül betrachtet werden, das nach Meinung vieler Autoren die fehlende Verbindung zwischen Atherosklerose und Inflammation darstellt. Dies gelingt CXCL16 durch Vorantreiben der spezifischen oxLDL-Aufnahme in Makrophagen und durch die gezielte Chemoattraktion, Adhäsion und Transmigration von CXCR6-positiven Entzündungszellen zum Ort der Schaumzelltransformation (siehe Abb. 2).

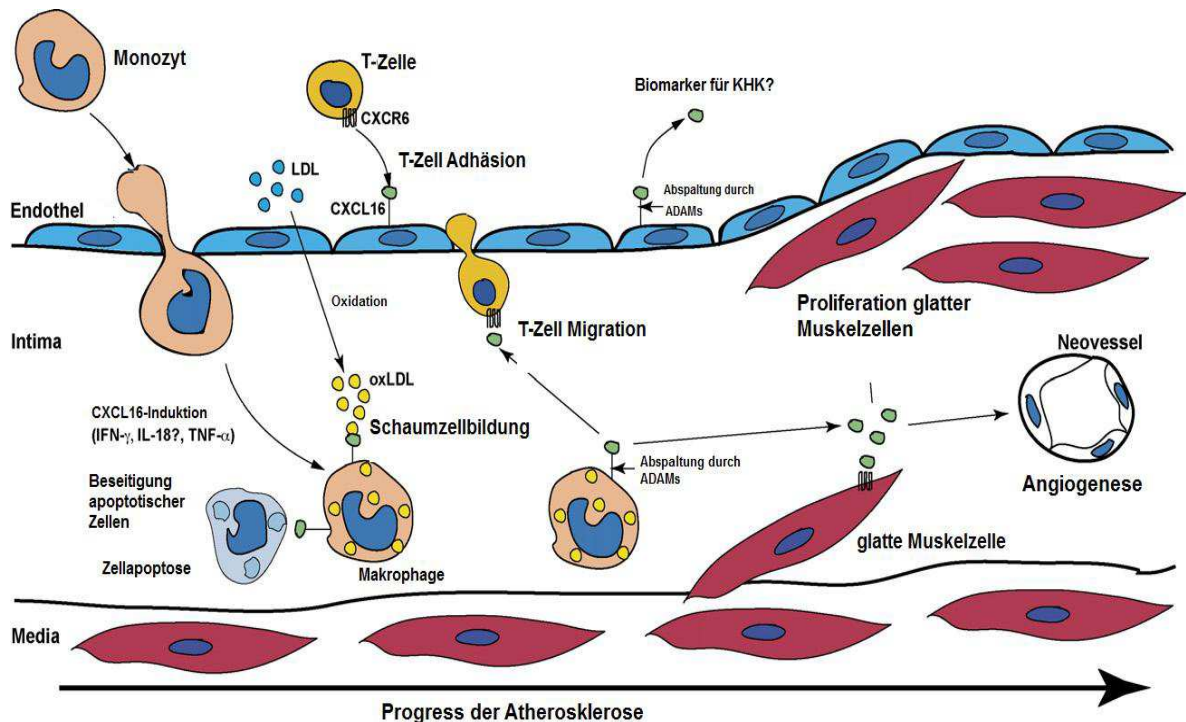


Abb. 2: Rolle von CXCL16/SR-PSOX in der Atherogenese. Modifiziert nach Sheikine/Sirsjö [160]

CXCL16/SR-PSOX wird membrangebunden auf Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen exprimiert und kann durch inflammatorische Stimuli induziert werden (z.B. IFN- γ , TNF- α , IL-18). CXCL16 spielt eine Rolle bei der Formation atherosklerotischer Läsionen, der T-Zell-Migration und Beseitigung apoptotischer Zellen. Durch Metalloproteinasen kann CXCL16/SR-PSOX in eine lösliche Form überführt werden.

1.4 Fragestellung

Als einer der kritischen Schritte in der Atherogenese gilt, wie gerade beschrieben, die Bindung und Internalisierung oxidierter Lipoproteine durch Scavenger-Rezeptoren. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den bisher noch nicht auf Thrombozyten beschriebenen oxLDL-bindenden Rezeptor CXCL16/SR-PSOX in vitro erstmals zu charakterisieren, seine Funktion auf Blutplättchen zu untersuchen, sowie Rückschlüsse auf seine Atherogenität und klinische Relevanz zu ziehen. Der Einsatz spezifischer Antikörper gegen CXCL16 könnte therapeutische Ansätze zur Prävention und Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen liefern.

I. Es sollte gezeigt werden, dass CXCL16 auf humanen Thrombozyten exprimiert wird. Thrombozyten bilden Proteine auf ihrer Oberfläche u.a. abhängig von ihrem jeweiligen Aktivierungsgrad aus. Zur Anfertigung eines Expressionsprofils von CXCL16 sollten humane Thrombozyten nach Vorbehandlung mit physiologischen Stimulantien analysiert werden.

II. Scavenger-Rezeptoren binden per definitionem oxidierte Lipoproteine. Es sollte daher untersucht werden, ob Thrombozyten oxLDL binden und inwieweit CXCL16 daran beteiligt ist. Außerdem sollte geprüft werden, ob der Einsatz spezifischer Antikörper gegen CXCL16 dieses Bindungsvermögen herabsetzen kann.

III. Es sollte auch simuliert werden, wie humane Thrombozyten sich unter Flussbedingungen an kollagenhaltigen Oberflächen mit und ohne eingebundenen oxidierten Lipoproteinen verhalten und ob eine mögliche Interaktion durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern gegen CXCL16 reduziert werden kann.

IV. Die Induktion von humanen Thrombozyten hat die Freisetzung und Hochregulation bestimmter Zytoadhäsionsrezeptoren (P-Selektin) zur Folge. Es sollte untersucht werden, ob oxidierte Lipoproteine zu diesem Effekt beitragen und wie spezifische Antikörper gegen CXCL16 diese Prozesse beeinflussen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Kat.Nr</u>	<u>Firma</u>
Cellstar® PP-Test Tubes 15 ml / 50 ml	188271 227261	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläser 18x18 mm		R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Deckgläser (cover slip) 25 mm Ø	3030522	Provitro GmbH, Berlin, Deutschland
Discofix® 3-Wege Hahn	4095111	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße	244908	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon™ FACS Tubes 5 ml	352052	BD Biosciences, San Jose, USA
Falcon™ Multiwell / 6 - Well	353046	BD Biosciences, San Jose, USA
Falcon™ Petrischalen	353003	BD Biosciences, San Jose, USA
Falcon™ Transferpipette 3 ml	357575	BD Biosciences, San Jose, USA
Injekt® Spritze 10 / 20 ml	4606205V 4606105V	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Kanüle Safety-Multifly®	85.1638.23 5	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Liquid Blocker–Super PAP Pen	71310	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
Millex® Sterilfilter 0,22 um	SLGP033R S	Millipore, Cork, Irland
Mounting Medium Fluoreszenz	S3023	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
Objektträger SuperFrost® Plus	04299	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Parafilm® Verschlussfolie	PM-996	Pechiney Plastic, Menasha, USA
Perfusor®-Spritze 50 ml	8728810F	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Pipettenspitzen	2500170 2100600 2500170	Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland
Stangenpipette 5 / 10 / 25 ml	4251, 4101, 4051	Corning Incorporated, Corning, USA

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

<u>Chemikalie / Reagenz</u>	<u>Kat.Nr</u>	<u>Firma</u>
ADP	384	Chrono-Par, Havertown, USA
Aqua Millipore (H ₂ O bidest.)		TKA Wasseraufbereitungssystem GmbH, Niederelbert, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA, Fraktion. 7,5 %)	A9647-100G	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Citronensäure	25.127-5	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
D-Glucose	1.08337.02 50	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FACSClean™	340345	BD Biosciences, San Jose, USA
FACSFlow™	342003	BD Biosciences, San Jose, USA
FACSRinse™	340346	BD Biosciences, San Jose, USA
Formaldehyd Rotipuran® 37 %	4979.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gelatine 2% in Aqua (aus Rinderhaut)	G1393	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Glycin	A3707	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
HCl Rotipuran® ≥ 25 %	6331.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES Pufferan®	HN77.4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
KCl	1.04938.00 50	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kollagen Typ I (bovin) 3 mg/ml	354231	BD Biosciences, Bedford, USA
Trinatriumcitrat (Na ₃ -Citrat)	1.11037.10 00	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl	1.06406.00 50	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaHCO ₃	A1940,0500	AppliChem GmbH, Darmstadt
NaOH 0,1 N	109141	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
oxLDL (oxidiertes Low-Density-Lipoprotein)	770202-7	Kalen Biomedical LLC, Montgomery Village, USA
Paraformaldehyd (PFA)	818715	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

<u>Chemikalie / Reagenz</u>	<u>Kat.Nr</u>	<u>Firma</u>
PBS Gibco™	18912-014	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
TRAP (1mg gelöst in 2,326 ml PBS = 25 µmol / l)	S7152	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Triton® X-100	034K0177	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

2.1.3 Pufferlösungen

Zur Isolation humaner Thrombozyten und Durchführung der Versuche wurden folgende Puffer angesetzt.

<u>Pufferlösungen</u>	<u>Zusammensetzung</u>
ACD-Puffer	12,5 g Na ₃ -Citrat 6,82 g Citronensäure 10 g Glukose ad 500 ml Aqua Milipore mit NaOH auf pH 4,69 einstellen sterilfiltrieren und bei +4°C kühlen
Tyrodes 10x	80 g NaCl 10,15 g NaHCO ₃ 1,95 g KCl ad 1000 ml mit Aqua Milipore sterilfiltrieren und bei +4°C kühlen
Tyrodes pH 6,5 + 0,1% BSA/Glucose	0,2 g BSA 0,2 g Glukose 20 ml Tyr 10x 180 ml Aqua Milipore mit HCl auf pH 6,5 einstellen
Tyrodes pH 7,4 + 0,1% BSA/Glucose	0,2 g BSA 0,2 g Glukose 20 ml Tyr 10x 180 ml Aqua Milipore mit HEPES auf pH 7,4

2.1.4 Verwendete Antikörper und Fluorochrome

Die folgenden Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper wurden für den spezifischen Antigennachweis an humanen Thrombozyten verwendet.

<u>Antikörper</u>	<u>Kat.Nr</u>	<u>Firma</u>
Anti-human CD62P-FITC, mouse IgG ₁ , Monoklonal	555523	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Anti-human CD36, mouse IgG ₁ , Monoklonal, Klon FA6-152	HM2122	Hycult biotechnology, Uden, Niederlande
Anti-human CD36-FITC, mouse IgG ₁ , Monoklonal, Klon FA6-152	HM2122F	Hycult biotechnology, Uden, Niederlande
Anti-human CXCL16, rabbit, Polyklonal	PP1204PI	Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland
Anti-goat to rabbit IgG-FITC Polyklonal	Ab6717	Abcam plc, Cambridge, UK
Anti-human LOX-1, mouse IgG ₁ , Monoklonal, clone 23C11	HM2138	Hycult biotechnology, Uden, Niederlande
Anti-human LOX-1-FITC, mouse IgG ₁ , Monoklonal, clone 23C11	HM2138F	Hycult biotechnology, Uden, Niederlande
Mouse IgG ₁ Isotyp Control LE/AF	0102-14	Southern Biotech, Birmingham, USA
Mouse IgG ₁ Isotyp Control FITC, Monoklonal	555748	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Dil-oxLDL 200 µg/ml	920-1008	Biomedical Technologies Inc., Stoughton, USA
Rabbit anti-mouse-FITC, Immunglobulin F(ab') ₂ , Polyklonal	F0313	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
Rhodamin-Phalloidin (Fluoreszenz-Phallotoxin), gelöst in Methanol	R415	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA

2.1.5 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Kat.Nr</u>	<u>Firma</u>
Accujet® Pipettierhilfe	26303	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim Deutschland
Datavideo® Diskrecorder	-	Datavideo Technologies Europe, Utrecht, Niederlande
Durchflusszytometer FACSCalibur™	-	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Einkanal-Pipetten Typ „Reference“ und „Research“	311100013 0/122/149 311400015	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Feinwaage	TB-4102A	Denver Instrument GmbH, Göttingen, Deutschland
Flusskammer-System	FCS1C / 3030000	Provitro GmbH, Berlin, Deutschland
Heraeus® Herasafe® Sterilbank	HS1815008 490	Thermo Electron Corp., Langenselbold, Deutschland
Heraeus® Multifuge® 1s	3126193	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Leica TCS SP konfokales Mikroskop	-	Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Deutschland
Magnetrührer IkaMag®	-	Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland
Perfusor® fm	8713820	B.Braun GmbH, Melsungen, Deutschland
pH-O-Meter	-	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Rüttler	1291	Lab-Line Instruments Inc., Melrose Park, USA
Sanyo CO2 Inkubator (+37°C)	MCO-18AIC	Sanyo Biomedical Ewan Innovationstechnik, Bad Nenndorf, Deutschland
Sysmex Hematology Analyzer	KX-21N	Sysmex, Norderstedt, Deutschland
Zeiss Axiovert 200 Mikroskop mit AxioCam MrM	-	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland

2.2 Isolation humaner Thrombozyten

Zur Durchführung sämtlicher Versuche wurden Thrombozyten aus frischem humanem Vollblut benötigt.

2.2.1 Probengewinnung

Es wurden freiwillige, gesunde Probanden beiderlei Geschlechts, ohne Medikamenteneinnahme innerhalb der letzten 2 Wochen, ausgewählt und mündlich über den Sinn und Zweck der Blutspende aufgeklärt. Daraufhin wurden in Anwesenheit von ACD-Puffer (Aqua Milipore, 15 mmol / l Trisodiumcitrat, 25 mmol / l D-Glukose, 12 mmol / l Citronensäure) mit einer weitlumigen Kanüle bis zu 60 ml venöses Vollblut aus einer Kubitalvene entnommen. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 1000 U/min wurde das gewonnene plättchenreiche Plasma (PRP) abgesaugt und in sterilem Tyrodes-HEPES-Puffer (Aqua Milipore, HEPES 2.5 mmol / l, NaCl 150 mmol / l, KCl 1 mmol / l, NaHCO₃ 2.5 mmol / l, Glucose 5.5 mmol / l, BSA 1 mg / ml, pH 6,5) gelöst. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 2000 U/min wurde der Überstand dekantiert und das verbleibende Zellpellet in Tyrodes-HEPES-Puffer (pH 7,4) resuspendiert.

2.2.2 Bestimmung der Thrombozytenzahl

Ein Teil der Zellsuspension wurde anschließend zur Messung der Plättchenzahl am Hämatologie-Messsystem SYSMEX (KX-21N, Sysmex, Norderstedt, Deutschland) vorbereitet. Nach Herstellung einer 1:10 Verdünnung mit Tyrodes-HEPES-Puffer (pH 7,4) erfolgte dreimal die Analyse der Zellzahl, woraus schließlich der Mittelwert bestimmt wurde. Je nach Zählergebnis und anschließendem Versuchsaufbau wurde durch weitere Verdünnung eine Einstellung der Thrombozytenzahl auf 1×10^6 / μl bzw. 2×10^8 / ml vorgenommen.

2.3 Konfokale Immunofluoreszenzmikroskopie

2.3.1 Funktionsprinzip

Für immunhistologische Färbungen werden Fluorophor-gekoppelte Antikörper verwendet, die mit hoher Spezifität und Affinität an bestimmte Epitope des zu untersuchenden Objekts binden und unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops mit einer speziellen Lichtquelle sichtbar gemacht werden können. Der Fluoreszenzfarbstoff wird bei einer bestimmten Lichtwellenlänge angeregt und wirft sein emittiertes Licht durch Filter zurück ins Okular bzw. in die Kamera. Dadurch können transmembranäre Proteine, wie z.B. Oberflächenrezeptoren oder auch intrazelluläre Strukturen, wie Aktinfilamente oder DNA, zur Darstellung kommen. Mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie lassen sich fluoreszierende Moleküle im subzellulären Bereich schärfer in einer Ebene fokussieren als mit einem gewöhnlichen Immunofluoreszenzmikroskop. Dies gelingt durch den Einsatz von zwei Lochblenden im Gerät („pinholes“), welche die Ausleuchtung des mikroskopierten Objektes einschränken und das Sichtfeld auf einen kleinen Bereich ($< 1 \mu\text{m}$) reduzieren. Die Anordnung der Blenden im System ist dabei so gewählt, dass beide pinholes und genau ein Punkt des Objekts in der Brennebene der Linsen „konfokal“ sind und dadurch nur diesen Bildpunkt sichtbar machen. Unfokussiertes Licht aus Bereichen außerhalb der Brennebene wird ausgeblendet, so dass keine störenden Lichtüberlagerungen entstehen. Mit Hilfe eines Rechners tastet der Laser die Zellen Punkt für Punkt ab, die Lichtsignale werden vom einem Photomultiplier empfangen, digitalisiert und computerassistent zu einem Gesamtbild rekonstruiert [66].

2.3.2 Mikroskopie immunofluoreszenzmarkierter Thrombozyten

Mit Alkohol gereinigte Objektträger wurden mit 50 µg / ml bovinem Kollagen in PBS dünn beschichtet, 1 h unter sterilen Bedingungen getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei +4°C gelagert. Thrombozyten wurden nach obigem Schema (2.2) aus humanem Vollblut isoliert, in sterilem Tyrodes-HEPES-Puffer (pH 7,4) auf ca. 1×10^6 / µl verdünnt und anschließend durch Zugabe von 10 µmol / l ADP stimuliert (20 min). Die aktivierten Blutplättchen wurden auf die vorbereiteten Kollagen-Objektträger aufgebracht und 1 h zur Adhäsion steril aufbewahrt. Zur Fixierung der Zellen wurde 2%iges Formaldehyd in Aqua Milipore aufgetragen. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Spülen mit 2% Glycin in PBS konnten die fixierten Thrombozyten mit 0,2 % Triton-X in PBS 15 min lang permeabilisiert werden. Nach Auswaschen des Tritons mit PBS wurde der Zell-Kollagenlayer 30 min mit 3% BSA in PBS gegen unspezifische Antikörperbindungen blockiert. Schließlich wurden auf diese Weise vorbereitete Objektträger mit immunofluoreszierenden Farbstoffen oder Antikörpern in einer Konzentration von 20 µg / ml in PBS überschichtet und im Dunkeln markiert. Dies geschah bei drei Objektträgern zunächst mit anti-CD62P-FITC (60 min) und anschließend mit Dil-oxLDL (90 min), bei drei weiteren mit Rhodamin-Phalloidin (30 min) und anti-CXCL16 (60 min). Zur „Anfärbung“ der markierten thrombozytären CXCL16-Antigene musste zusätzlich ein FITC-Sekundärantikörper (anti-goat to rabbit IgG-FITC) in einer Endkonzentration von 20 µg / ml aufgetragen werden. Drei weitere Kollagen-Thrombozyten-Layer 30 min wurden ausschließlich mit Rhodamin-Phalloidin markiert. Nicht-gebundene Fluorochrome, überschüssiges Protein und Zelldetritus wurden in einem abschließenden Waschgang entfernt und Deckgläser mit „Mounting Medium“ luftblasenfrei aufgelegt. Nach Aushärten im Dunkeln wurden die Präparate unter einem konfokalen Leica TCS SP Immunfluoreszenz-Mikroskop (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Deutschland) nacheinander in einer Vergrößerung bis zu 1:630 mikroskopiert und fotografiert (Software Leica TCS NT, Version 1.6.587). Die Fluoreszenz der Farbstoffe wurde durch Einsatz des Argonlasers mit Exzitation bei 488 nm als Multiparameter-Zellanalyse gemessen.

2.4 Durchflusszytometrische Messungen (FACS)

2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder „fluorescence activated cell sorter“ (FACS) ist ein Verfahren, das Zellen und andere Mikropartikel anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und auch ihrer intrazellulären Zusammensetzung (Granularität) unterscheiden kann. Daher besitzt die Durchflusszytometrie ein breites Anwendungsspektrum, das neben Zellzahlbestimmungen auch unterschiedlichste funktionelle Untersuchungen beinhaltet. So eignet es sich beispielsweise auch zur Analyse von Thrombozyten. Für viele dieser Anwendungen ist wie bei der Immunfluoreszenzmikroskopie eine vorherige Markierung der Zellen mit Antikörpern notwendig, die entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind oder mittels eines weiteren, fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen werden. Grundvoraussetzung jeder Messung ist, dass auf diese Weise markierte Zellen von einem Laserstrahl erfasst werden. Dies geschieht in einer engen Kammer mit laminarem Probenstrom, in der die Zellen einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet werden. Das ausgesandte monochromatische Licht, das typischerweise von einem Argonionenlaser stammt, trifft nun auf die in der Probe enthaltenen Bestandteile und wird dadurch gestreut. Neben diesen Lichtstreuungen kommt es durch Lichtabsorption auch zu einer Anregung der konjugierten Fluoreszenzfarbstoffe, die als Reaktion wiederum Licht einer höheren Wellenlänge emittieren. Häufig eingesetzte Fluorochrome sind das Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), ein gelbgrüner Farbstoff mit einem Emissionsmaximum um 519 nm, und das Phycoerythrin (PE), rot, mit einem Emissionsmaximum von etwa 578 nm. Die abgehende Strahlung wird von einem komplexen optischen System, welches zahlreiche Linsen, Spiegel, Filter und Detektoren enthält, gebündelt oder zerlegt. Neben dem spezifischen Signal, das man für jeden gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff erhält, lässt sich anhand der Lichtstreuungen auch eine Aussage über die Zellgröße und Granularität treffen. Dabei gelten die nach vorne abgelenkten Strahlen als Maß für die relative Größe (Vorwärtsstreulicht oder Forwardscatter (FSC)), während

das in einem 90°-Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht als Sidescatter (SSC) bezeichnet wird und als Maß für die Zellgranularität dient [99].

2.4.2 Analyse und Darstellung

Das Ergebnis kann schließlich in unterschiedlichen Messoberflächen dargestellt werden. Im zweidimensionalen Streudiagramm (FSC/SSC-Dot-Plot, Abb. 3a) können verschiedene Eigenschaften einer Zelle gegenübergestellt werden, z.B. die Beziehung von Größe und Granularität. Dies ermöglicht durch Setzen eines „Gate“ das gezielte Auswählen einer bestimmten Zellpopulation (z.B. Thrombozyten). Bei einem Histogramm handelt es sich um eine einfache Häufigkeitsverteilung, bei der die Stärke eines Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl der Ereignisse entweder linear oder logarithmisch aufgetragen wird (Abb. 3B). Durch Setzen von Grenzwerten (Markern) wird der Anteil positiver Partikel gegenüber der Gesamtzahl bzw. deren mittlere Fluoreszenzintensität „mean fluorescence intensity“ (MFI) gemessen. Die mittlere Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Menge gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Partikel.

A.

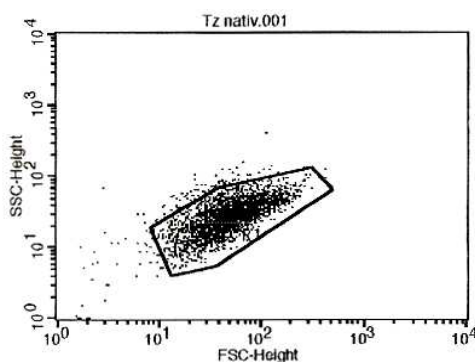


Abb. 3A: Beispiel eines FSC/SSC-Dot-Plots. Native Thrombozyten

B.

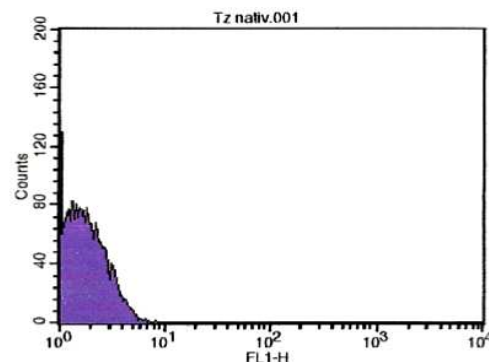


Abb. 3B: Beispiel eines Histogramms. Native, ungefärbte Thrombozyten

2.4.3 FACS-Analyse Immunfluoreszenzmarkierter Thrombozyten

Thrombozyten wurden nach obigem Schema (2.2) aus frischem humanem Vollblut gewonnen und in sterilem Tyrodes-HEPES-Puffer (pH 7,4) auf eine Zellzahl von ca. 1×10^6 / μl eingestellt.

2.4.3.1 Erstellung eines Expressionsprofils thrombozytärer Oberflächenrezeptoren

FACS-Messküvetten wurden mit ca. 10^6 gewaschenen und unstimulierten Blutplättchen pro Ansatz versehen und mit Tyrodes-HEPES-Puffer (pH 7,4) ad 100 μl aufgefüllt. Für die verschiedenen Messreihen war in jeweils einem Proberöhrchen 20 μg / ml FITC-konjugierter anti-CD62P, anti-LOX-1, anti-CD36 oder unkonjugierter anti-CXCL16-Antikörper vorgelegt worden, ein Reaktionsgefäß wurde zusätzlich als Negativkontrolle mitgeführt und mit 20 μg / ml IgG₁ Isotyp-Antikörper beschickt. Der Anteil der Zellen, der mit FITC-markierten Primärantikörper versetzt war, inkubierte je 30 min bei +18°C RT unter Lichtausschluss, wurde dann mit 300 μl 0,5% PFA fixiert und bis zur Messung am FACS-Gerät bei +4°C aufbewahrt. Mit unkonjugierten Antikörper (CXCL16, IgG₁) versehene Thrombozyten ruhten ebenfalls 30 min bei RT und wurden anschließend zum Auswaschen ungebundener Antikörper mit 1000 μl PBS bei 1000 U/min abzentrifugiert (5 min). Nach Dekantieren des Überstandes verblieben ca. 100 μl Volumen im FACS-Röhrchen, zu denen nun der spezifische Sekundärantikörper für CXCL16 (anti-goat to rabbit IgG-FITC) sowie für die Isotypkontrolle (rabbit anti-mouse IgG-FITC) in einer Endkonzentration von 20 μg / ml hinzugefügt wurden. Die Terminierung der Färbereaktion erfolgte nach 30 min mit 300 μl 0,5% Paraformaldehydlösung in PBS (PFA).

Für drei weitere Messreihen erhielten frische unstimulierte Thrombozyten eine Behandlung mit physiologischen Induktoren, um Antigenfärbungen bei aktivierten Blutplättchen durchführen zu können. Zu diesem Zweck wurden ruhende Blutplättchen in 100 μl Gesamtvolumen mit 25 μmol / l Thrombinrezeptor-Aktivierendem-Peptid (TRAP), 10 μmol / l Adenosindiphosphat (ADP) oder 20 μg / ml oxidiertem Low-Density-Lipoprotein (oxLDL) durchmischt

und bei RT 20 min (ADP) bzw. 60 min (TRAP und oxLDL) inkubiert. Die Plättchenstimulation wurde durch Abzentrifugieren der Proben mit 1 ml PBS bei 1000 U/min (5 min) und Verwerfen des Überstandes beendet. Im nächsten Schritt erfolgte ebenfalls eine spezifische Markierung der Scavenger-Rezeptoren LOX-1, CD36 und CXCL16.

Nach Fixation der Proben mit 0,5% PFA fand die Einfarben-Fluoreszenzanalyse (FITC) am Durchflusszytometer FACSCalibur™ (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) statt. Insgesamt wurden bei gleichen Bedingungen sieben Messungen mit Thrombozyten unterschiedlicher Probanden durchgeführt. Zur Detektion des von gebundenen FITC-Farbstoffen emittierten Fluoreszenzlichtes wurde der entsprechende Kanal (FL1) gewählt und auf 688 log eingestellt, nachdem im FSC / SSC Dot-Plot des FACS-Gerätes zuvor der Bereich mit einem „Gate“ markiert wurde, der Größe und Granularität der Thrombozyten am besten widerspiegelt. Innerhalb des „Gates“ wurden pro Messung 10.000 Zellen analysiert, woraus sich letztendlich die „mittlere Fluoreszenzintensität“ (MFI) und damit das Maß für die Dichte der Rezeptoren auf den untersuchten Thrombozyten errechneten. Die Datenermittlung erfolgte mit Hilfe der Cellquest Software (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland).

2.4.3.2 Analyse der thrombozytären Dil-oxLDL Oberflächenbindung

Frisch isolierte humane Thrombozyten wurden nach Aktivierung mit 25 µmol / l TRAP (1 h) auf fünf FACS-Röhrchen zu je 10⁶ Zellen verteilt. Dann wurden unkonjugierte anti-LOX-1-, anti-CD36- und anti-CXCL16-mAk (20 µg / ml Endkonzentration) hinzugefügt und ad 100 µl mit Tyrodes-HEPES-Puffer (pH 7,4) aufgefüllt. Je eine Messküvette wurde mit nativen Blutplättchen bzw. zusätzlich mit 20 µg / ml mouse IgG₁ Isotyp-Ak als Negativkontrolle mitgeführt. Nach 60 min wurden nicht gebundene Antikörper durch Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes ausgewaschen. Anschließend inkubierten die „vorblockierten“ Thrombozyten unter Beigabe von 20 µg / ml Dil-oxLDL 2 h im Dunkeln bei +37°C, bis die Färbereaktion mit 300 µl 0,5% PFA beendet wurde. Die Immunfluoreszenzanalyse der Dil-oxLDL markierten Proben wurde

siebenmal mit Plättchen unterschiedlicher Blutspender wiederholt. Als Einstellung wurde im Kanal FL1 (FITC, P3) 691 log und im Kanal FL2 (PE, P4) 583 log gewählt.

2.4.3.3 Messung des thrombozytären Aktivierungszustandes

Unstimulierte, gewaschene Thrombozyten wurden mit Tyrodes-HEPES-Puffer (pH 7,4) ad 100 µl in FACS-Röhrchen angesetzt (10^6 Zellen pro Gefäß) und zum einen ohne jeglichen Zusatz, zum anderen nach einstündiger Stimulation mit 20 µg / ml oxLDL mit und ohne Beigabe von 20 µg / ml IgG₁ Isotyp-Antikörper auf den Degranulationsmarker CD62P (P-Selektin) gefärbt. Dazu wurden 20 µg / ml FITC-konjugierter CD62P-Antikörper pro FACS-Röhrchen eingesetzt. Zusätzlich sind weitere Thrombozytenproben unter Zugabe von 20 µg / ml anti-LOX-1, anti-CD36 und anti-CXCL16 angelegt und 30 min bei +18°C RT blockiert worden. Auch hier diente eine Probe mit 20 µg / ml mouse IgG₁ Antikörpern als Isotypkontrolle. Daraufhin wurden die Zellen 1 h lang oxidiertem LDL in einer Konzentration von 20 µg / ml ausgesetzt. Nach 30 min begann parallel die Markierung von P-Selektin. In alle Messküvetten wurde zur Fixierung der Zellen schließlich 300 µl 0,5% PFA pipettiert. Am FACS-Gerät erfolgte dann die Einfarben-Fluoreszenz-Analyse (FITC) der unterschiedlich vorbehandelten Thrombozyten. Diese wurde bei fünf Blutspendern als Doppelbestimmung (2 Ansätze) sowie bei drei weiteren Probanden als Einfachbestimmung durchgeführt, so dass insgesamt 13 Datensätze erhoben werden konnten. Die Instrumenteneinstellungen wurden analog zu Versuch 2.4.3.1 vorgenommen.

2.5 Flusskammeruntersuchungen

2.5.1 Versuchsaufbau und Funktionsprinzip

Die Flusskammer ist ein Perfusionskultursystem, das ein Blutgefäß im Endstromgebiet simulieren soll. Die Konstruktion besteht aus einem schmalen Kanal, dessen Boden vom Korpus, die Seitenwände von einer Silikondichtung und das Dach von einem Deckgläschen gebildet werden. Die Deckgläschen („Cover slips“) werden mit Hilfe eines Federrings eingespannt und können vor dem Einlegen beliebig mit Protein oder Zellen beschichtet werden. Über kleine Aperturen auf beiden Seiten des Kanals können entsprechende Schlauchverbindungen sowie ein Perfusor konnektiert und eine konstante Perfusion der Kammer gewährleistet werden. Aufgrund ihres Aufbaus ist die Flusskammer auf beiden Seiten transparent, so dass mit Hilfe eines Mikroskops die perfundierenden Zellen bzw. die Beschichtung und die Interaktion beider beobachtet werden kann.

2.5.2 Analyse des Verhaltens von Thrombozyten an Proteinbeschichtungen in der Flusskammer

Zuerst wurden Deckgläschen in 70% Ethanol gereinigt und vorsichtig in 6-Well-Platten gelegt. Für die Proteinbeschichtungen im ersten Versuchsteil wurden 40 µg / ml bovines Kollagen in PBS angesetzt und großzügig auf drei Glasplättchen verteilt. Die Deckgläser trockneten unter sterilen Bedingungen bei +18°C RT und wurden nach ca. 4 h mit 1000 µl PBS gereinigt und angefrischt. Im nächsten Schritt erfolgte eine Überschichtung mit 60 µg / ml oxLDL in PBS, dessen Überstand nach weiteren 4 h Inkubationszeit wieder entfernt wurde. Abschließend wurde mit 2% BSA gegen unspezifische Bindungen blockiert (30 min). Als Negativkontrolle sind drei Deckgläser lediglich mit 2% BSA und drei mit Kollagen + 2% BSA beschichtet und bis zur weiteren Verwendung bei +4°C aufbewahrt worden. Nach üblichem Schema (2.2) gewonnene humane Thrombozyten wurden mit 10 µmol / l ADP 20 min stimuliert, anschließend in sterilem und auf +37° C vorgewärmten DPBS auf eine Zellzahl von 2×10^8 / ml eingestellt und zu je 12 ml in Perfusorspritzen gefüllt (pro Deckglas ca. 6 ml). Nach Einspannen des Deckglases und Prüfen

auf Dichtigkeit wurde die Flusskammer in Betrieb genommen und mit konstanter Geschwindigkeit (15 ml / h) von den vorbereiteten Thrombozyten in DPBS perfundiert. Um möglichst ähnliche Bedingungen wie in einem arteriellen Endstromgebiet zu erzeugen, wurde die Flussgeschwindigkeit des Perfusors so gewählt, dass die Scherrate bei pH 7,4 und +37 °C der eines arteriellen Flusses (2000^s) entsprach. Zunächst wurde 10 min unter Perfusion zugewartet, bevor mit Hilfe eines Zeiss Axiovert 200 Mikroskops und angeschlossener Kamera (AxioCam MrM) bei 20-facher Vergrößerung 30 sec an vier unterschiedlichen Stellen des Deckgläschens gefilmt wurde. Dies geschah in dreifacher Wiederholung bei BSA, Kollagen/BSA und Kollagen/oxLDL+ BSA beschichteten „Cover slips“. Zur Auswertung wurden Thrombozyten, die eine lockere Verbindung zu den Proteinbeschichtungen eingingen („Roller“) bzw. fest adhärerten, in einem 150 x 100 µm messendem Ausschnitt gezählt und gemittelt.

Für den zweiten Versuchsteil wurden in analoger Weise „Cover slips“ mit 40 µg / ml Kollagen in PBS überzogen und 4 h steril getrocknet. Das zusätzliche Auftragen von 40 µg / ml oxLDL in PBS brachte nach weiteren 4 h Trocknen Kollagenlayer mit immobilisiertem oxLDL hervor, die vorsichtig mit PBS gewaschen und mit 2% BSA versehen wurden. Als Negativkontrolle wurden außerdem drei Objektträger mit 2% BSA- und drei mit Kollagen/BSA-Beschichtung hergestellt. Aus humanem Vollblut isolierte und gewaschene Thrombozyten wurden daraufhin mit 10 µmol / l ADP aktiviert (20 min) und in unterschiedlicher Weise behandelt: Von insgesamt 4 Fraktionen ist je ein Teil mit 20 µg / ml IgG₁ mouse Isotyp-, anti-LOX-1- und anti-CXCL16-mAk vermischt und 60 min bei +18 °C RT inkubiert worden, der vierte Teil blieb unbehandelt. Danach erfolgte die Einstellung der Zellzahl auf 2 x 10⁸ / ml in sterilem DPBS sowie das Umfüllen in Perfusorspritzen, bevor die unbehandelten und die durch spezifische Antikörper vorkblockierten Thrombozyten nacheinander über je drei mit Kollagen/oxLDL beschichtete Glasplättchen perfundiert wurden. Das Verhalten der Blutplättchen an der Proteinmatrix wurde in identischem Vorgehen zum ersten Versuchsabschnitt gefilmt und ausgewertet.

2.6 Statistische Verfahren

Zur Auswertung der erhobenen Daten wurde die Statistiksoftware SPSS (Version 14.0) herangezogen. Jeder Messreihe entsprechend wurde eine Gruppe gebildet, daraus das arithmetische Mittel (= Mittelwert) und die Standardabweichung (\pm SD) errechnet und der einseitige Student-t-Test für nicht gepaarte Stichproben angewandt. Die Nullhypothese H_0 (kein Unterschied zwischen den Gruppen) wurde dann verworfen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug. Demnach galten Unterschiede mit einem Wahrscheinlichkeitswert p von $< 0,05$ als statistisch signifikant. Verglichen wurden jeweils die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der einzelnen Gruppen gegenüber der Isotypkontrolle bzw. die Anzahl adhärenter oder rollender Thrombozyten gegenüber der Isotyp-/Negativkontrolle. Der Wert „n“ stand für die Anzahl der untersuchten FACS-Proben bzw. „Cover slips“.

3. Ergebnisse

3.1. Thrombozyten exprimieren CXCL16/SR-PSOX

3.1.1 Detektion durch konfokale Lasermikroskopie

ADP-aktivierte Thrombozyten wurden nach Immobilisierung auf Kollagen immunhistochemisch gefärbt und mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert. Es zeigten sich in geringer Vergrößerung traubenförmig angeordnete Thrombozyten, die sich nach Markierung mit fluoreszierendem Rhodamin-Phalloidin-Farbstoff kräftig rot darstellen (Abb. 4A). Phalloidin ist ein Toxin des weißen Knollenblätterpilzes, welches mit hoher Affinität an die fibrilläre Form des Aktin-Filaments bindet. F-Aktin ist als Strukturprotein Bestandteil des thrombozytären Zytoskeletts und wichtig für den Formwandel aktivierter Plättchen. In weiteren Färbungen (Abb. 4B / 4C) kamen anti-CXCL16-mAk und ein fluoreszierender Sekundärantikörper zum Einsatz, um CXCL16-Antigen auf Thrombozyten zu detektieren. In den fixierten Plättchen auf Abbildung 4C sind im Zytoplasma zahlreiche grünlich fluoreszierende Granula dargestellt, die auf eine Anwesenheit von CXCL16 in der Plasmamembran oder intrazellulären Speichern schließen lassen und belegen, dass CXCL16 auf Blutplättchen lokalisiert ist.

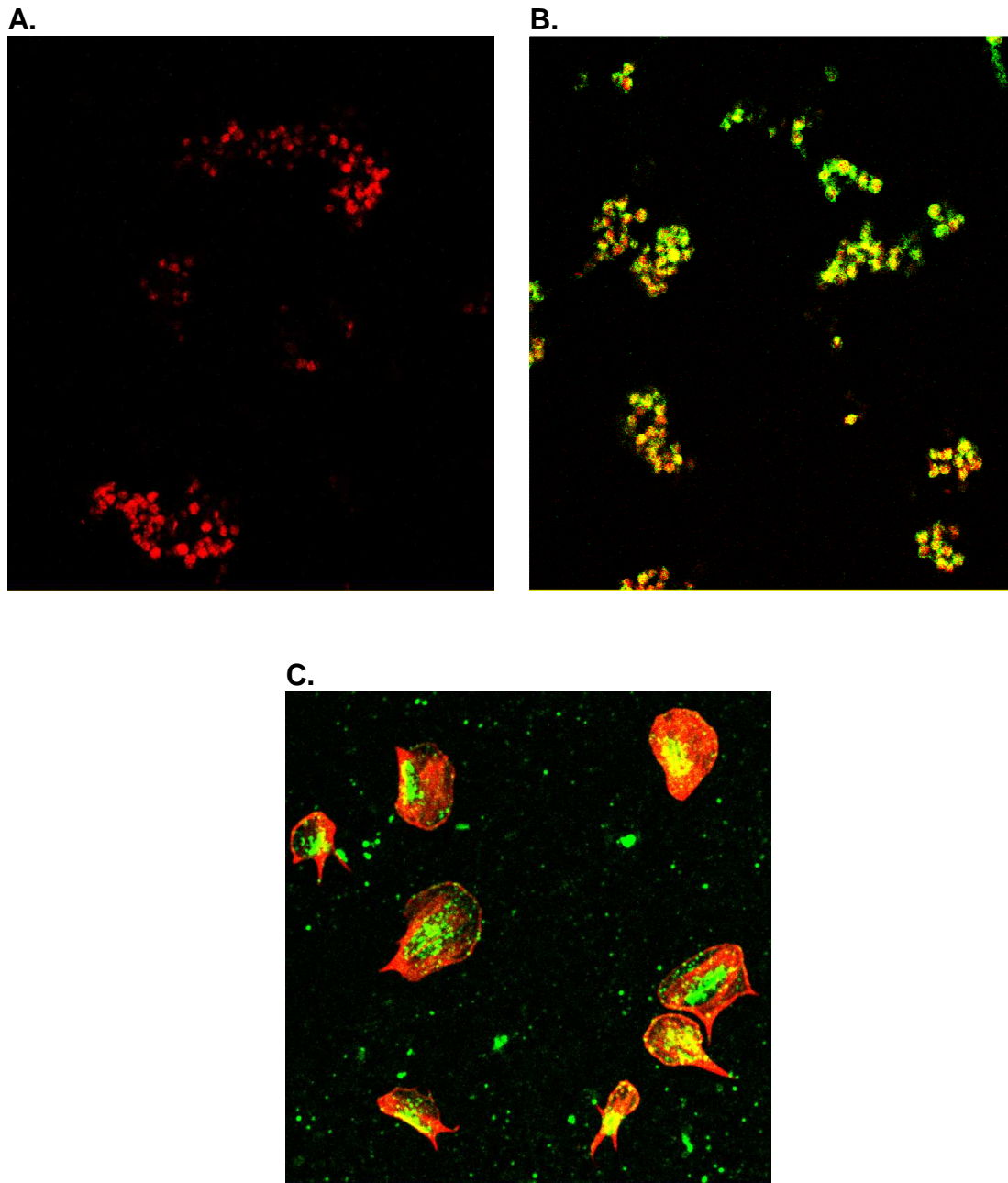


Abb. 4: Expression von CXCL16/SR-PSOX auf Thrombozyten

Konfokale Immunofluoreszenz-Lasermikroskopie von ADP-aktivierten (10 $\mu\text{mol} / \text{l}$) Thrombozyten, die auf Kollagen immobilisiert und mit 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Rhodamin-Phalloidin (rot) und 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ anti-CXCL16 + anti-goat to rabbit IgG-FITC (grün) gefärbt wurden.

A. Rhodamin-Phalloidin, Vergrößerung 1:160

B. Rhodamin-Phalloidin und anti-CXCL16, Vergrößerung 1:160

C. Rhodamin-Phalloidin und anti-CXCL16, Vergrößerung von 1:360 mit Zoomfaktor 3,5

3.1.2 Aktivierungsabhängige Expression auf der Thrombozytenoberfläche

Thrombozyten wurden mit Fluorochromen auf Aktivitätsmarker (CD62P) und Scavenger-Rezeptoren (LOX-1, CD36 und CXCL16) gefärbt und im FACSCalibur™ analysiert. Zusätzlich erfolgte eine Vorbehandlung mit physiologischen Induktoren wie TRAP, ADP oder oxLDL, um nach Degranulierung und Zunahme der Oberflächenproteine ein Rezeptorexpressionsprofil zu erstellen.

Die FACS-Analyse unstimulierter Thrombozyten ergab, dass P-Selektine, Scavenger-Rezeptor LOX-1 und CXCL16 in geringem Maße auf der Oberfläche nachweisbar sind (MFI IgG 19,72±6,29 CD62P 58,59±17,05, LOX-1 50,28±9,20, CXCL16 89,84±28,41, n=7), während CD36 in hoher Anzahl auf der Zellmembran vorzufinden ist (MFI 1019,21±152,71, n=7). Durch Induktion war eine mäßige, nicht signifikante Steigerung der CD36-Expression zu erreichen (MFI ADP 1209,32±171,54, TRAP 1173,48±123,33, oxLDL 1144,17±101,20, n=7). Im Unterschied dazu zeigte CXCL16 eine aktivierungsabhängige Expression auf Thrombozyten (Abb. 5 A / B). Nach Inkubation mit ADP, TRAP oder oxLDL kam es im Vergleich zu ruhenden Thrombozyten (Medium) zu einer signifikanten Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI 89,84±28,41 vs. ADP 189,89±57,65, TRAP 260,23±38,76, oxLDL 191,19±48,75, n=7; jeweils p<0,05). Die Zugabe von TRAP erzielte die höchste Expressionssteigerung. LOX-1 folgte einer vergleichbaren induzierbaren Expression, erreichte allerdings geringere Maximalwerte (MFI 50,28±9,20 vs. ADP 67,66±6,81, TRAP 72,62±8,89, oxLDL 68,03±11,30, n=7; jeweils p<0,05). Parallel dazu wurde als etablierter Kontrollparameter die Oberflächen-expression von P-Selektinen auf ruhenden und stimulierten Thrombozyten gemessen. Hierbei nahm die Zahl der CD62P-positiven Zellen mit allen Stimuli signifikant zu (MFI 58,59±17,05 vs. ADP 142,05±47,94, TRAP 148,02±49,96, oxLDL 89,0±28,53, n=7; jeweils p<0,05). Die mit IgG-FITC angelegten Kontrollansätze zeigten auf aktivierten Plättchen erwartungsgemäß keine Veränderung. (MFI IgG 19,72±6,29, ADP 25,48±12,67, TRAP 21,83±8,56, oxLDL 22,14±6,48 n=7)

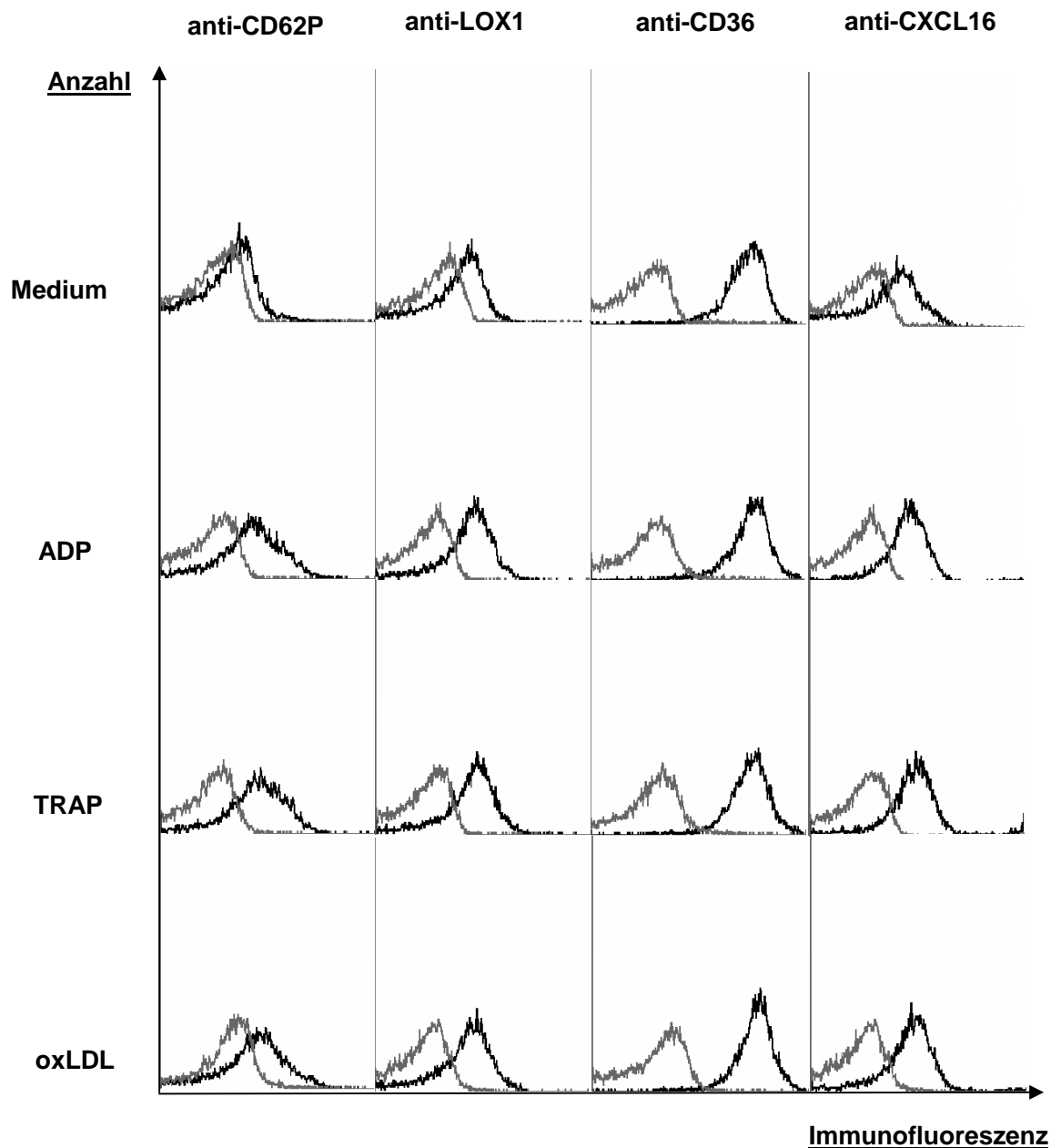


Abb. 5A: CXCL16 wird aktivierungsabhängig auf Thrombozyten exprimiert

Suspensionen mit je 10^6 gewaschenen Thrombozyten wurden mit $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ FITC-konjugiertem anti-CD62P, anti-LOX-1, anti-CD36, anti-CXCL16 + FITC-Sekundärantikörper oder Isotypkontrolle mit $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ IgG₁ + FITC-Sekundärantikörper bei RT inkubiert. Drei weitere Messreihen wurden mit physiologischen Induktoren ($10 \mu\text{mol} / \text{l}$ ADP, $25 \mu\text{mol} / \text{l}$ TRAP oder $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ oxLDL) aktiviert, bevor in der FACS-Analyse die MFI des jeweiligen Fluorochroms bestimmt wurde.

Graue Graphen entsprechen der Isotypkontrolle (IgG-FITC), schwarze Graphen dem jeweiligem Fluorochrom. Ruhende Thrombozyten (Medium) exprimieren nur wenig CD62P, LOX-1 oder CXCL16/SR-PSOX. Nach Aktivierung mit ADP, TRAP oder oxLDL zeigen Thrombozyten CD62P, LOX1 und CXCL16 eine deutliche Expressionszunahme. CD36 wird konstitutiv exprimiert.

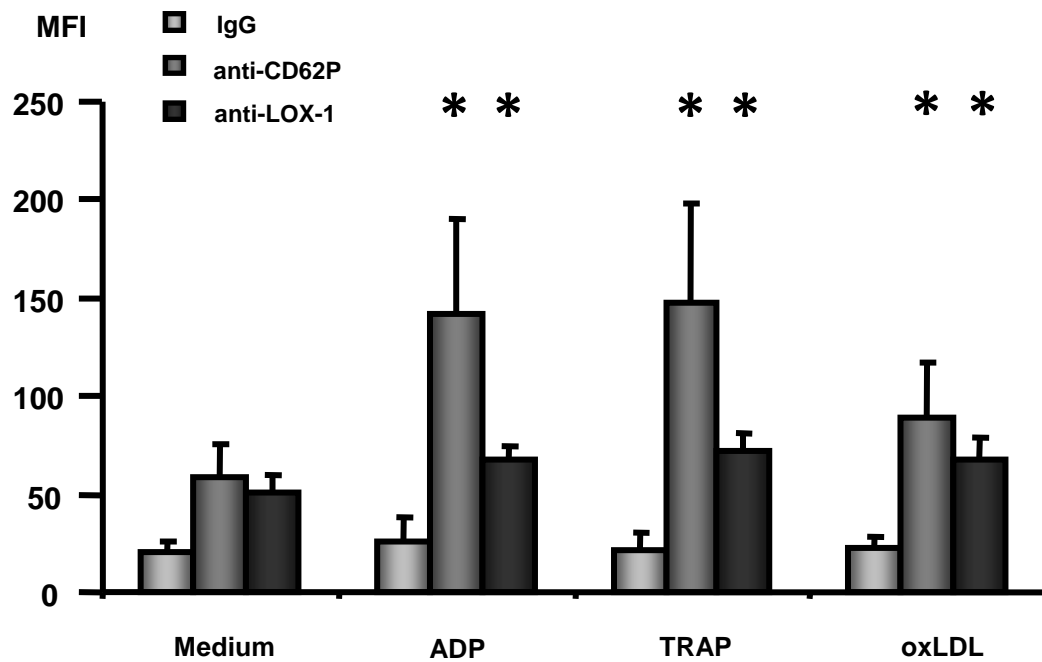
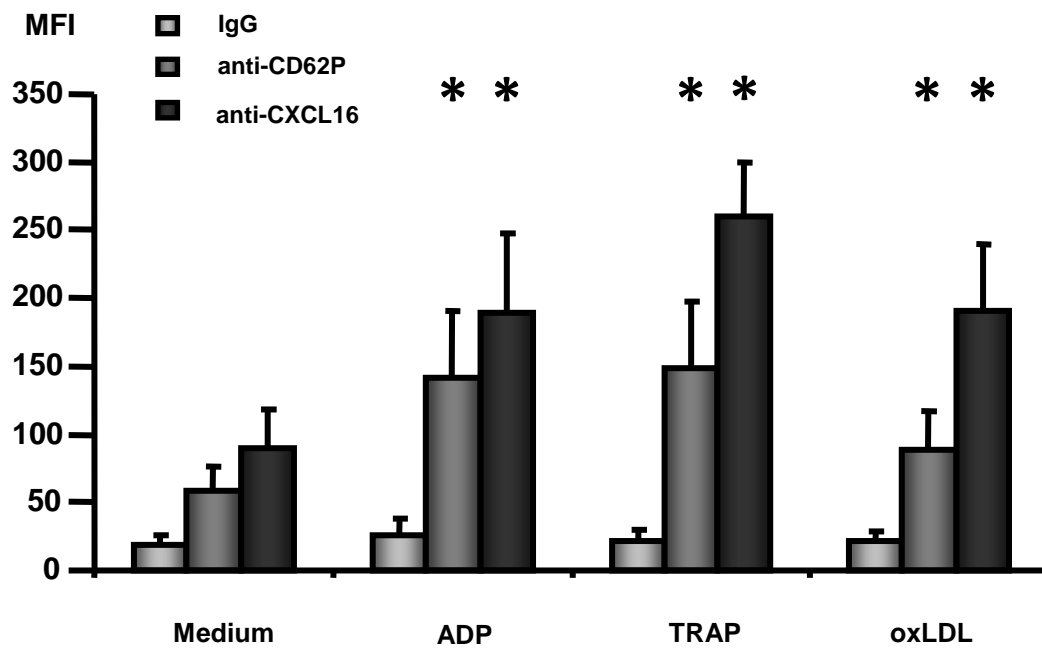


Abb. 5B: CXCL16 wird aktivierungsabhängig auf Thrombozyten exprimiert
 Balkendiagrammdarstellung der FACS-Analyse aus Abb. 5a (MFI-Werte). Ruhende Thrombozyten (Medium) exprimieren wenig CD62P, CXCL16 und LOX-1. Nach Aktivierung mit 10 $\mu\text{mol} / \text{l}$ ADP, 25 $\mu\text{mol} / \text{l}$ TRAP oder 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ oxLDL zeigen CD62P, CXCL16 und LOX-1 eine signifikante Expressionszunahme ($n=7$; $* p<0,05$ im Vergleich zu Medium).

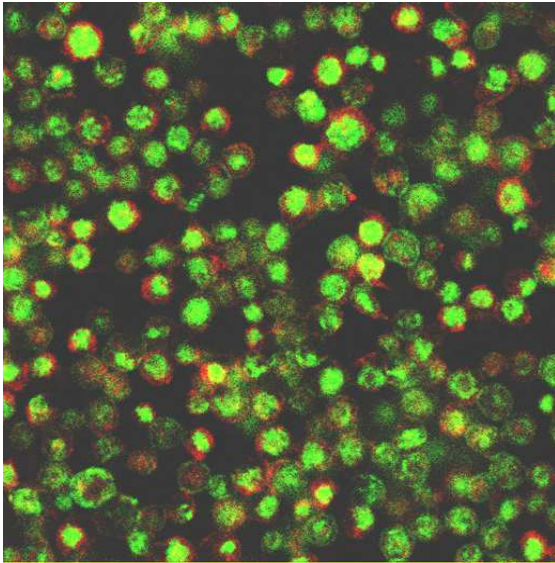
3.2 Thrombozyten binden oxidierte Lipoproteine über CXCL16/SR-PSOX

3.2.1 Oberflächenbindung von oxidiertem LDL auf aktivierten Thrombozyten

Stimulierte, auf einer Kollagenmatrix fixierte Thrombozyten wurden mit Dil-oxLDL inkubiert und im konfokalen Lasermikroskop untersucht. In direkter Umgebung zu den Plättchen zeigten sich zirkulär oxLDL-Aggregate, die einen dichten, rot fluoreszierenden Saum bildeten (Abb. 6A). Bei weiterer Vergrößerung imponierten intrazellulär vereinzelt rötliche Granula, die Ausdruck einer möglichen Internalisierung von Dil-oxLDL-Partikeln sein könnten (Abb. 6B). Die Positivkontrolle mit anti-CD62P-FITC diente der Markierung thrombozytärer P-Selektine, welche nach Degranulation überwiegend in die Zellmembran transloziert werden [109] und infolge der Laserexzitation die Zelloberfläche grün zur Darstellung bringen (Abb. 6). Der an oxLDL gekoppelte Farbstoff Dil ermöglicht den Nachweis spezifischer Bindungen zwischen Lipoproteinen und thrombozytären Scavenger-Rezeptoren, da unspezifische chemische Bindungen zuvor durch Absättigung mit „blockenden“ bovinen Albuminen (BSA) auf ein geringes Maß reduziert wurden [138]. Es ist daher von einer spezifischen Assoziation der oxLDL-Partikel, unter Beteiligung von Scavenger-Rezeptoren wie CD36, LOX-1 oder CXCL16, mit der thrombozytären Plasmamembran auszugehen.

Ergänzend durchgeführte FACS-Messungen zur Oberflächenbindung von Dil-oxLDL ergaben, dass sowohl initial ruhende als auch stimulierte Blutplättchen Dil-oxLDL binden können (Abb. 7). Im Falle der ruhenden Thrombozyten ist der Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität auch auf einen stimulierenden Effekt des Dil-oxLDL per se zurückzuführen. Nach Induktion mit TRAP wurde die MFI signifikant gesteigert (MFI Dil-oxLDL Medium $21,36 \pm 1,52$ vs. Medium+TRAP $28,36 \pm 1,92$, $n=7$, $p<0,05$). In der IgG-Isotypkontrolle zeigte sich nach Induktion durch TRAP eine vergleichbare, signifikante Zunahme der Dil-oxLDL Bindung. (MFI Dil-oxLDL Medium $21,36 \pm 1,52$ vs. TRAP+IgG $27,75 \pm 3,84$, $n=7$, $p<0,05$).

A.



B.

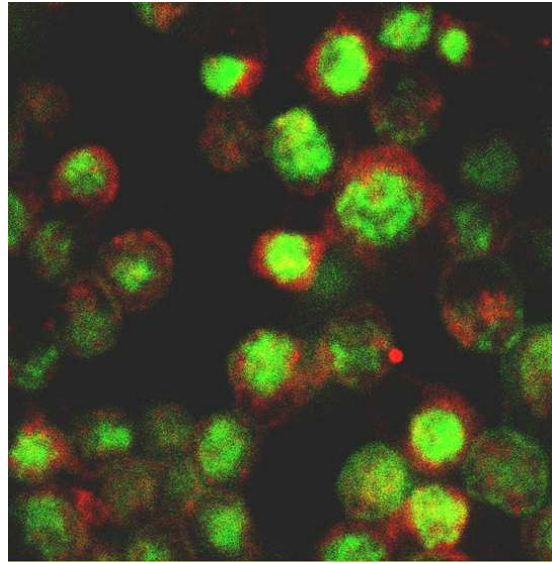


Abb. 6: Thrombozytäre Oberflächenbindung von Dil-oxLDL

ADP-aktivierte (10 $\mu\text{mol} / \text{l}$) Thrombozyten wurden mit 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ anti-CD62P-FITC (grün) und 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Dil-oxLDL (rot) gefärbt und auf Kollagen immobilisiert. Visualisierung mit Immunofluoreszenz-Lasermikroskopie.

A. Vergrößerung 1:260 B. Vergrößerung 1:360, Zoomfaktor 2

3.2.2 Aktivierte Thrombozyten binden oxidiertes LDL über CXCL16/SR-PSOX

Nach Koinkubation der TRAP-aktivierten Plättchen mit anti-LOX-1-, anti-CD36- oder anti-CXCL16-mAk konnte signifikant weniger Dil-oxLDL an der Oberfläche stimulierter Thrombozyten gebunden werden. Die spezifische Blockade senkte die mittlere Fluoreszenzintensität von LOX-1 um 31%, diejenige von CD36 um 20% und diejenige von CXCL16 um 21% (MFI TRAP+IgG 27,75 \pm 3,84 vs. TRAP+anti-LOX1 19,09 \pm 1,33, TRAP+anti-CD36 22,26 \pm 2,60, TRAP+anti-CXCL16 21,87 \pm 1,68, n=7; jeweils p<0,05). Demnach reduzierte der Einsatz blockierender Antikörper die oxLDL Bindung auf ein Niveau, das dem Ausgangswert unstimulierter Thrombozyten nahekommt (MFI Medium 21,36 \pm 1,52 (siehe Abb. 7). Dies belegt eine relevante Beteiligung von CXCL16 bei Bindungsprozessen zwischen oxLDL-Partikeln und der Zellmembran aktivierter Blutplättchen.

MFI (DiI-oxLDL)

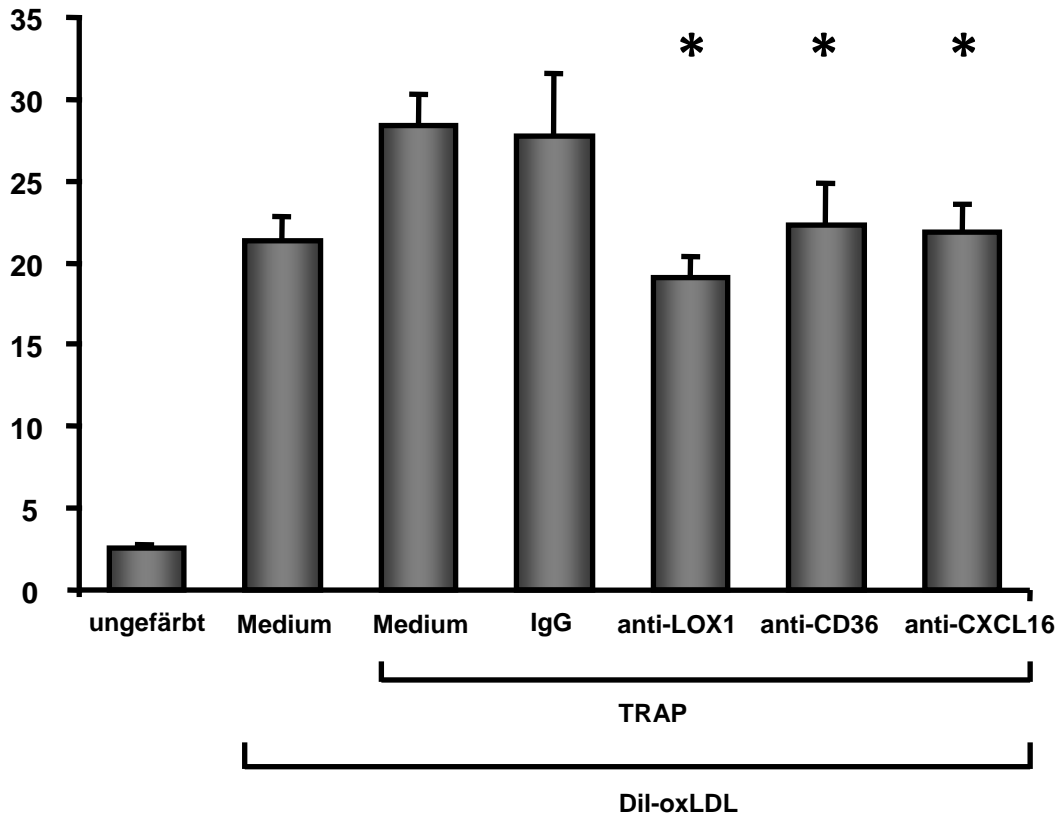


Abb. 7: TRAP-aktivierte Thrombozyten binden DiI-oxLDL via CXCL16

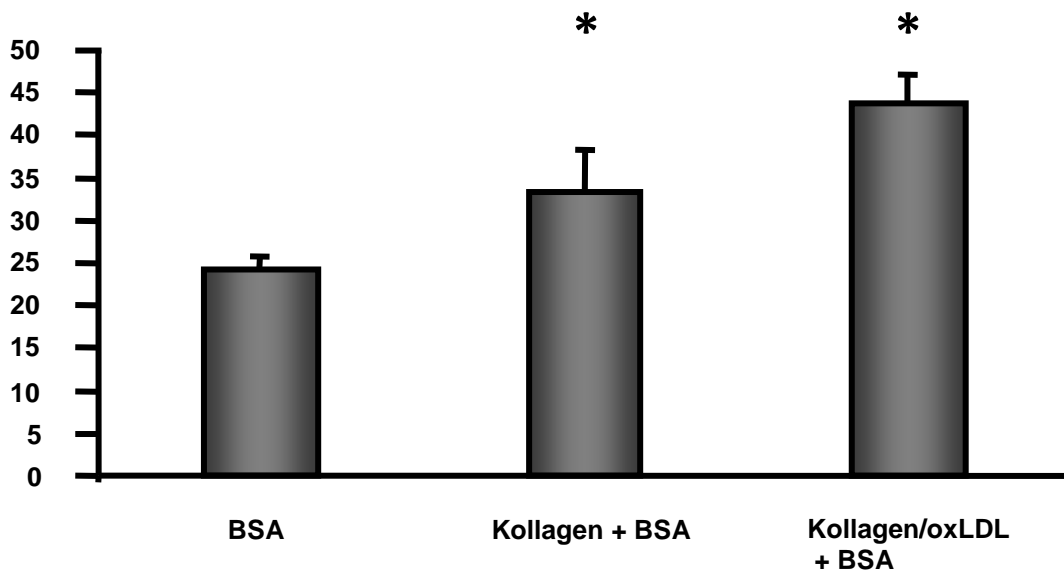
Suspensionen mit je 10^6 gewaschenen Thrombozyten wurden ruhend (Medium) sowie nach Aktivierung durch $25 \mu\text{mol} / \text{l}$ TRAP mit $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ DiI-oxLDL gefärbt und mittels FACS analysiert. Sowohl initial ruhende als auch TRAP-stimulierte Thrombozyten binden DiI-oxLDL. Durch Vorbehandlung der TRAP-aktivierten Thrombozyten mit $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ blockierendem anti-LOX-1, anti-CD36 oder anti-CXCL16 zeigte sich eine signifikante Reduktion der DiI-oxLDL-Bindung ($n=7$, $p<0,05$ im Vergleich zu TRAP stimulierter IgG-Isotypkontrolle).

3.2.3 Aktivierte Thrombozyten zeigen unter Flussbedingungen erhöhte Interaktion mit einer oxLDL/Kollagen-Matrix via CXCL16/SR-PSOX

Zur weiteren Aufklärung der funktionellen Relevanz als Zelladhäsionsmolekül wurden ADP-stimulierte Thrombozyten in einem Flusskammersystem unter arteriellen Bedingungen mit hohen Scherraten über unterschiedlich beschichtete Proteinlayer perfundiert und gefilmt. Bei den im ersten Versuchsteil eingesetzten „Cover slips“ mit BSA-, Kollagen- oder Kollagen/oxLDL-Beschichtung fiel eine erhöhte Affinität der Plättchen zu kollagenbeschichteten Deckgläschen auf, die sich in einer gegenüber der BSA-Kontrolle gesteigerten Anzahl von rollenden als auch adhärenen Thrombozyten zeigte. Das Einbringen von oxLDL in die Kollagenmatrix führte zu einer signifikanten Zunahme rollender als auch adhärenter Plättchen (Roller BSA $24,25 \pm 1,64$ vs. Kollagen+BSA $33,34 \pm 5,03$ vs. Kollagen/oxLDL+BSA $43,75 \pm 3,5$; $n=3$, jeweils $p < 0,05$; Adhärente BSA $1,34 \pm 0,80$ vs. Kollagen+BSA $2,12 \pm 0,96$ $p=0.3097$ vs. Kollagen/oxLDL+ BSA $3,84 \pm 0,58$; $p < 0,05$, $n=3$, siehe Abb. 8). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von thrombozytären Rezeptoren, darunter Scavenger-Rezeptoren wie CXCL16/SR-PSOX, bei der lockeren und festen Adhäsion an Proteinverbände, die oxidierte Lipoproteine enthalten.

Im nächsten Schritt war zu klären, ob durch vorausgehende Inkubation der stimulierten Blutplättchen mit blockierenden SR-Antikörpern diese Affinitätssteigerung wieder antagonisiert bzw. reduziert werden kann. Tatsächlich konnte die Zugabe von anti-LOX-1-mAk oder anti-CXCL16-mAk einen Rückgang der beobachteten rollenden (-26% bzw. -24%) und adhärenen (-46% bzw. -54%) Thrombozyten an der Kollagen/oxLDL-Matrix hervorrufen (Abb. 9, Tz + IgG: Roller $59,92 \pm 3,22$, Adhärent $4,92 \pm 0,14$ vs. Tz + anti-LOX-1-mAk: Roller $45,42 \pm 6,78$, Adhärent $2,67 \pm 0,29$ vs. Tz + anti-CXCL16-mAk: Roller $44,18 \pm 4,51$, Adhärent: $2,25 \pm 0,75$; jeweils $p < 0,05$, $n=3$). Daraus wird ersichtlich, dass CXCL16/SR-PSOX als Adhäsionskomponente aktiv an diesen Bindungsvorgängen beteiligt sein könnte.

A. „Rollende“ Thrombozyten/high power field



B. „Adhärenente“ Thrombozyten/high power field

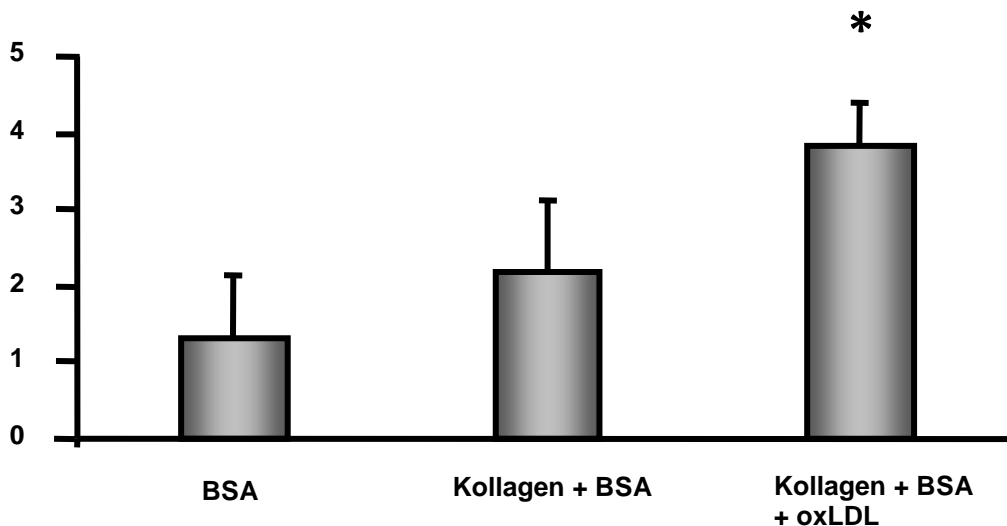


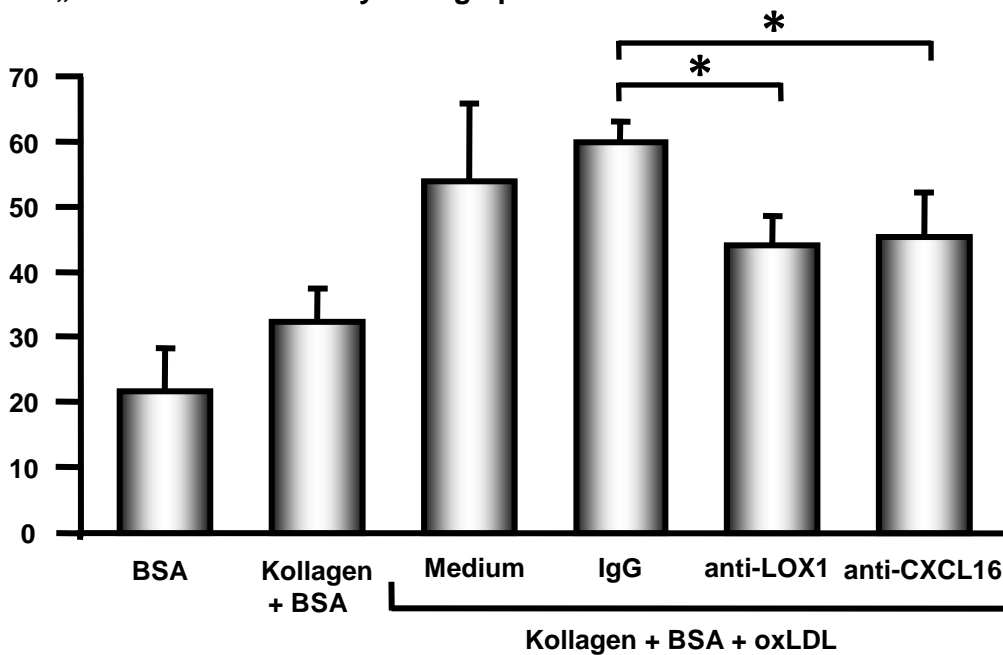
Abb. 8: Aktivierte Thrombozyten binden an oxLDL-haltige Proteinmatrix

Aktivierte Thrombozyten (ADP 10 $\mu\text{mol/l}$, $2 \times 10^8/\text{ml}$) wurden in der Flusskammer mit 15 ml/h über verschiedene Proteinlayer perfundiert und videoassistent ausgewertet. Im Vergleich zu einer 2% bovines Serumalbumin Beschichtung (BSA) wiesen rollende Thrombozyten eine signifikant erhöhte Interaktion mit Kollagen- oder Kollagen/oxLDL-Layer auf. An Kollagen+BSA waren adhärenente Thrombozyten nicht signifikant erhöht feststellbar, jedoch an Kollagen/oxLDL+BSA.

A. Anzahl der rollenden Thrombozyten/high power field (n=3, * $p < 0,05$, im Vergleich zu BSA)

B. Anzahl der adhärenenten Thrombozyten/high power field (n=3, * $p < 0,05$, im Vergleich zu BSA)

A. „Rollende“ Thrombozyten/high power field



B. „Adhärenente“ Thrombozyten/high power field

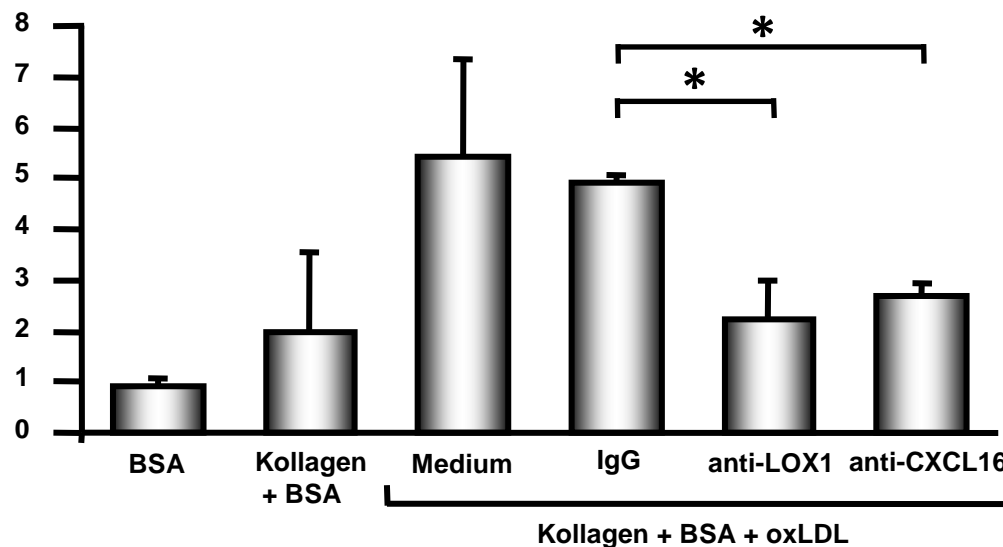


Abb. 9: Aktivierte Thrombozyten binden an oxLDL-haltige Proteinmatrix via CXCL16

ADP-aktivierte Thrombozyten (10 $\mu\text{mol} / \text{l}$) wurden 1 h mit 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ blockierendem anti-LOX-1 oder anti-CXCL16 inkubiert, in der Flusskammer über eine Kollagen/oxLDL-Matrix perfundiert (2×10^8 Thrombozyten/ml, 15 ml/h) und videoassistent ausgewertet. Die Anzahl der rollenden (**A.**) und adhärenenten (**B.**) Thrombozyten konnte durch Blockade von CXCL16 signifikant reduziert werden (n=3, * p<0,05, im Vergleich zur IgG-Isotypkontrolle).

3.3 Beeinflussung der thrombozytären P-Selektin-Expression durch oxLDL-Bindung an CXCL16/SR-PSOX

Es wurde außerdem untersucht, ob eine vorangehende Inkubation von Thrombozyten mit SR-blockierenden Antikörpern den stimulierenden und plättchen-degranulierenden Effekt von oxLDL herabsetzen kann. Dazu wurde im FACSCalibur™ die thrombozytäre CD62P-Expression auf nativen und anschließend auf stimulierten Blutplättchen gemessen. Erwartungsgemäß zeigte sich nach Aktivierung eine Expressionssteigerung von CD62P. Die folgenden Analysen ergaben, dass eine Vorbehandlung mit anti-LOX-1-mAk, anti-CD36-mAk oder anti-CXCL16-mAk zu einer reduzierten Anzahl CD62P-positiver Zellen führte. Die Oberflächenexpression konnte im Vergleich zur Isotypkontrolle (IgG + oxLDL) um 28% (anti-LOX-1-mAk), 16% (anti-CD36-mAk) bzw. 18% (anti-CXCL16-mAk) gesenkt werden (Abb. 10, MFI IgG+oxLDL $19,46 \pm 4,73$ vs. anti-LOX-1 $4,69 \pm 6,29$ vs. anti-CD36 $10,73 \pm 3,36$ vs. anti-CXCL16 $9,89 \pm 6,42$; n = 11, jeweils $p < 0,05$). Eine spezifische Blockade von SR-Rezeptoren auf Blutplättchen, inklusive CXCL16/SR-PSOX, könnte demnach die oxLDL-geförderte Aktivierung abschwächen, welche zuvor durch eine gesteigerte Expression von P-Selektinen auf der Thrombozytenmembran messbar war.

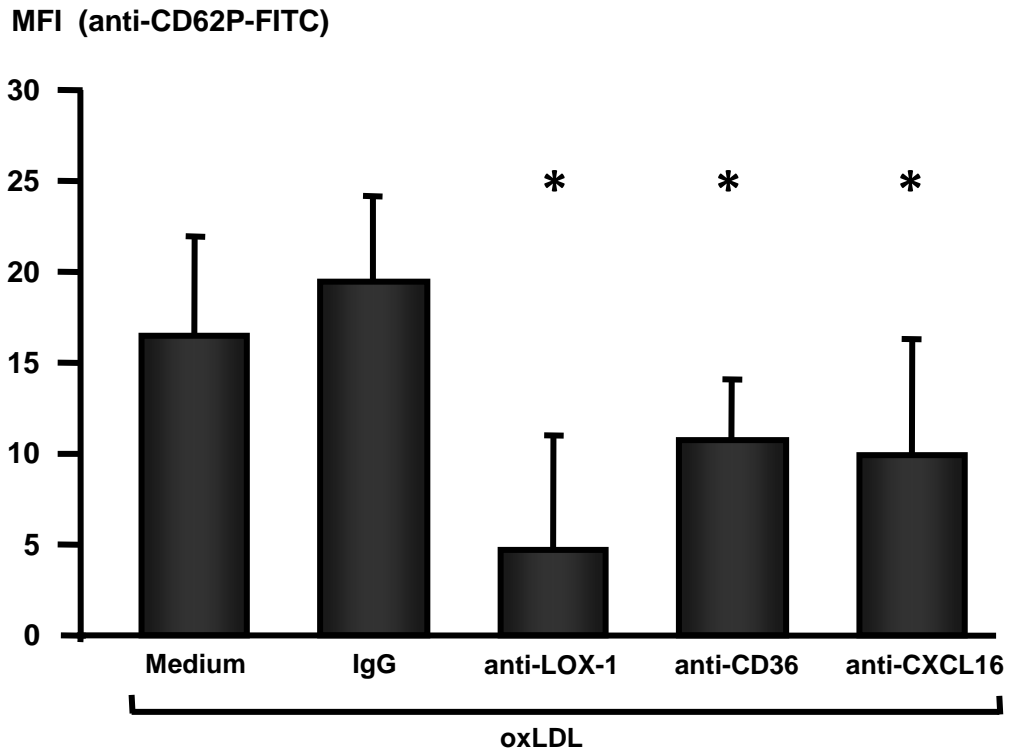


Abb. 10: Beeinflussung der thrombozytären P-Selektin-Expression durch oxLDL-Bindung an CXCL16

$10^6/\mu\text{l}$ gewaschene Thrombozyten wurden mit $20\ \mu\text{g} / \text{ml}$ oxLDL stimuliert und mit $20\ \mu\text{g} / \text{ml}$ anti-CD62P-FITC markiert. Im Vergleich zur Isotypkontrolle ($20\ \mu\text{g} / \text{ml}$ IgG) zeigten mit blockierendem anti-LOX-1, anti-CD36 und anti-CXCL16 vorbehandelte Thrombozyten eine signifikant geringere CD62P-Expression ($n = 11$, * $p < 0,05$ im Vergleich zu IgG)

4. Diskussion

4.1 Expression von CXCL16/SR-PSOX auf Thrombozyten

Im Rahmen der in-vitro-Untersuchungen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass CXCL16/SR-PSOX auf Blutplättchen lokalisiert ist. Der spezifische Nachweis mittels immunofluoreszenz-gekoppelter Antigen-Antikörper-Reaktion gelang sowohl durch konfokale Lasermikroskopie als auch durch FACS-Analysen. CXCL16 konnte als neuer Scavenger-Rezeptor auf Thrombozyten identifiziert werden. Er unterscheidet sich in Struktur oder Funktionsspektrum erheblich von den bisher bekannten SR-Klassen. Das multifunktionale Molekül erlangte als Vertreter der Klasse G zwar bereits Bekanntheit als Scavenger-Rezeptor auf Makrophagen sowie als lösliches inflammatorisches Chemokin, ist aber fortan als Bestandteil der thrombozytären Plasmamembran auch in eine Reihe neben SR der Klasse A, B, D und E zu stellen.

Es ist bekannt, dass Thrombozyten abhängig von ihrem Ruhezustand Proteine in verschiedensten intrazellulären Granula speichern. Bei einer Aktivierung, hervorgerufen durch Kontakt von Adhäsionsrezeptoren zu subendothelialen Matrixproteinen oder durch exogene chemische Stimuli, werden Speichervesikel durch ein System von Kanälen an die Oberfläche entleert und können so ihre Aufgaben, z.B. als Botenstoffe, wahrnehmen. Andere Proteine wiederum werden aus dem Zellinneren in die Zellmembran überführt, um dort als Rezeptoren Funktionen wie Bindung und Verarbeitung von Signalstoffen oder das Aufbauen interzellulärer Verbindungen auszuüben. Deshalb ist es notwendig, die Expression thrombozytärer Rezeptoren auch abhängig vom Grad der Aktivierung zu untersuchen. In unserer Arbeit wurden dazu Stimulanzen wie ADP, TRAP und oxLDL eingesetzt, die als physiologische Induktoren für diese Anwendung bereits etabliert waren [28, 182, 194]. Die Versuchsergebnisse zeigen, dass CXCL16/SR-PSOX mit zunehmendem Aktivierungsgrad eine gesteigerte Oberflächenexpression erfährt, wie es auch Chen et al. für LOX-1 postulierten [22]. Auf ruhenden Thrombozyten hingegen

konnte nur eine geringe bzw. eine minimale konstitutive Expression nachgewiesen werden. Dies spricht für eine Translokation von CXCL16/SR-PSOX aus intrazellulären Speichern an die Zelloberfläche, sobald ein gewisses Erregungsniveau überschritten wird. Diese These wird auch von der Beobachtung gestützt, dass in parallel durchgeführten Experimenten CD62P-markierte Thrombozyten in ähnlicher Weise auf die Zugabe entsprechender Stimulanzen reagierten. Für CD62P ist eine induzierbare Freisetzung aus Speichergranula an die Zelloberfläche nämlich bereits belegt [109].

CD36, der als wichtiger Scavenger-Rezeptor auf Thrombozyten vertreten ist, folgte in unseren Untersuchungen nicht diesem Mechanismus. Er zeigte schon auf ruhenden Blutplättchen eine starke Expression, die durch Stimulation nur noch geringfügig zu steigern war (ca. 15%). Im Konsens mit anderen Autoren ist daher davon auszugehen, dass CD36 konstitutiv in der Plättchenmembran exprimiert wird [179, 196].

Betrachtet man die unterschiedliche Lokalisation der drei SR-Rezeptoren LOX-1, CD36 und CXCL16 im subzellulären Bereich, entsteht der Eindruck, dass jeder dieser Rezeptoren nur in bestimmten Phasen des Thrombozytenmetabolismus aktiv wird. Den Hauptanteil der SR-Oberflächenexpression bei ruhenden Thrombozyten stellt demnach CD36, das auf ruhenden, im Blutstrom zirkulierenden Thrombozyten, als eine Art Sensor für eine Reihe pathologischer Liganden, u.a. oxLDL, dienen könnte. Kommt es durch oxLDL-Bindung oder durch andere Ereignissen zu einer Sensibilisierung und Aktivitätszunahme der Plättchen [87], werden zusätzlich LOX-1- und CXCL16-Antigen auf der Zelloberfläche exponiert, was einer Zunahme der Bindungskapazität von oxidierten Lipoproteinen gleichkommt.

4.2 Bindung von oxLDL auf Thrombozyten via CXCL16/SR-PSOX

Bisher wurde die Bindung von oxLDL auf Thrombozyten überwiegend CD36, SR-A und LOX-1 zugeschrieben, da diese scheinbar auch quantitativ die wichtigsten SR auf Thrombozyten waren [22]. Der Zusammenhang zwischen oxLDL-Bindung an SR und gesteigerter Plättchenreaktivität wurde u.a. von Siess et al. hergestellt, dessen Arbeitsgruppe Lysophosphatidsäure (LPA) aus oxidiertem LDL als auslösendes Agens identifizierte [166]. Der stimulierende Effekt auf Thrombozyten konnte nach Aufklären der nachgeschalteten p38^{MAPK} abhängigen Signalkaskade schließlich gemessen werden. Korporaal et al. gelang es jedoch nicht, diesen intrazellulären Signalweg weder durch einzeln bzw. kombiniert eingesetzte Antikörper gegen CD36 oder SR-A, noch durch Knockout der beiden Gene in Versuchstieren, vollständig zu unterdrücken [87]. Dies legte den Verdacht nahe, dass weitere, bislang unbekannte SR an diesen Vorgängen beteiligt sein müssen.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit konnten nochmals verdeutlichen, dass Thrombozyten oxLDL auf ihrer Zelloberfläche binden. Dies geschah sowohl auf unstimulierten, als auch in größerem Umfang auf stimulierten Blutplättchen. Dass sich Dil-markiertes oxLDL bereits an ruhende Plättchen anheftet, könnte vor allem auf dem konstitutiven CD36-Gehalt in der Zellmembran, teilweise aber auch auf stimulierenden Effekten des oxLDL oder unspezifischer Bindung beruhen. Der unspezifische Anteil kann jedoch vernachlässigt werden, da er in gleichem Umfang auch auf aktivierten Plättchen zu erwarten ist. In jedem Fall brachte eine Thrombozyteninduktion mit TRAP eine Steigerung der Dil-oxLDL-Bindung mit sich, was vereinbar mit der These ist, dass zusätzlich aktivierungsabhängige SR wie CXCL16 und LOX-1 exprimiert werden und verstärkt mit oxLDL als Bindungspartner in Kontakt treten. Im Umkehrschluss ist eine Beteiligung von CXCL16/SR-PSOX zu vermuten, da eine spezifische Blockade des Antigens mit anti-CXCL16-mAk auf stimulierten Thrombozyten einen deutlichen Rückgang der Dil-oxLDL Oberflächenbindung hervorrief. Die Blockade der Scavenger-Rezeptoren LOX-1 und CD36 zeigte im Vergleich

ebenfalls eine signifikante Reduktion des oxLDL-Bindungsvermögens, so dass auch diesen eine Bedeutung bei der Bindung von oxidierten Lipoproteinen auf aktivierten Blutplättchen einzuräumen ist. Erneut stützten die Ergebnisse daher die Vermutung, dass thrombozytäre Scavenger-Rezeptoren, auch CXCL16, in verschiedenen metabolischen Phasen oxLDL binden und in der Folge die Plättchenphysiologie beeinflussen können. So könnte nach Expression von CXCL16 bzw. LOX-1 eine überschießende Bindung und beschleunigte Endozytose von oxLDL stattfinden, die mit weiterer autoaktiver Stimulation einhergeht. All das sind Faktoren, die eine bedeutsame Rolle in der plättchengetriggerten Atherogenese spielen. Daneben trägt eine oxLDL induzierte Hyperreaktivität zu akuten kardiovaskulären Ereignissen, wie z.B. der Atherothrombose, bei [179].

4.3 Interaktion mit Kollagen-/oxLDLhaltigen Oberflächen via CXCL16/SR-PSOX

Shimaoka et al. stellten CXCL16 als Adhäsionsrezeptor vor, der Thrombozyten zur Interaktion mit Endothelzellen und anderen CXCR6 positiven Zellen befähigt [162]. Neben den zuvor ausführlich dargestellten Eigenschaften dieses multifunktionalen Rezeptors spielt diese Fähigkeit eine bedeutende Rolle bei der Rekrutierung von Entzündungszellen, die als kritische Schritte bei inflammatorischen Prozessen in der Atherosklerose und anderen Erkrankungen gesehen werden [160]. Der initiale Kontakt von Thrombozyten zur Gefäßwand tritt jedoch als Folge anderer Prozesse auf. Sobald es in vivo zur endogenen oder exogenen Läsion der Endothelverkleidung kommt, werden Kollagene freigelegt, die zur Auslösung einer physiologischen Reparationskaskade Kontakte zu unterschiedlichen Zelltypen eingehen können. Auf Blutplättchen existiert eine Reihe von Kollagenrezeptoren, die entweder direkt oder indirekt über Brückenproteine mit Kollagen interagieren und durch diesen Vorgang zur Plättchenaktivierung führen. Zu den wichtigsten Kollagenrezeptoren zählen $\alpha 2\beta 1$ -Integrin (GPIa-IIa), GPVI und der GPIb-V-IX Komplex, der über den von-Willebrand-Faktor an Kollagen binden kann [129].

In Flusskammerversuchen sollte dieser Kontakt zwischen aktivierten Thrombozyten und Kollagengewebe im Endstromgebiet eines Gefäßes in vitro simuliert werden. Es wurde zunächst deutlich, dass Plättchen tatsächlich in signifikant höherem Maße eine lockere und feste Verbindung zu Beschichtungen mit bovinem Kollagen als zu Proteinplatten mit bovinen Serumalbuminen ohne kollagene Anteile eingingen.

Bei atherosklerotischen Gefäßerkrankungen ist in Plaques darüber hinaus mit der Anwesenheit oxidierter Lipoproteine zu rechnen, so dass im nächsten Schritt das Verhalten von Blutplättchen an einer oxLDL/Kollagenmatrix zu untersuchen war. Die hierbei gewonnene Erkenntnis, dass erneut eine merkliche Zunahme der rollenden und adhärenen Thrombozyten zu verzeichnen war, stützt die Überlegung, dass Scavenger-Rezeptoren, wie LOX-1 und CXCL16, unabhängig von den Kollagenrezeptoren ein Anheften auf der Kollagen/oxLDL-Matrix ermöglichen könnten. Tatsächlich zog der Einsatz von anti-CXCL16-mAk bzw. anti-LOX-1-mAk wieder eine deutliche Verminderung der rollenden und adhärenen Blutplättchen nach sich, so dass damit eine Beteiligung von CXCL16/SR-PSOX als Adhäsionskomponente wahrscheinlich wird. Überträgt man die anhand dieses Modells gewonnenen Ergebnisse auf Vorgänge in der Pathogenese der Atherosklerose, so könnte CXCL16/SR-PSOX nicht nur bei chronisch inflammatorischen, sondern auch bei akuten vaskulären Adhäsionsprozessen eine Rolle spielen. Haben Thrombozyten infolge einer Stimulation vermehrt CXCL16 exprimiert, könnten diese leichter an bestimmte Gefäßwandläsionen, die neben Kollagen auch oxLDL enthalten, fest adhären. Eine Dysbalance dieser Vorgänge könnte auch zu einer übermäßigen Aggregation mit vollständiger Verlegung des Gefäßlumens beitragen. Möglicherweise beteiligt sich CXCL16 auf diese Weise an einer verstärkten Thrombusbildung und begünstigt dadurch die Entstehung von Erkrankungen wie dem akuten Koronarsyndrom.

4.4 Einfluss von CXCL16/SR-PSOX auf die oxLDL-induzierte P-Selektin-Expression auf Thrombozyten

Roll- und Adhäsionsprozesse von Thrombozyten und anderen im Blut zirkulierenden Zelltypen finden in vivo auch an der intakten oder entzündlich veränderten Endothelbarriere statt [47, 165]. Zur transienten Kontaktaufnahme sind, wie anfangs beschrieben, thrombozytäre P-Selektine und andere Adapterproteine auf den beteiligten Zelloberflächen notwendig [109, 110]. Es konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass die Oberflächenexpression von P-Selektinen (CD62P) abhängig vom Aktivierungsgrad der Thrombozyten stattfindet. Auch oxidierte Lipoproteine wirken sensibilisierend auf Plättchen und begünstigen dadurch die Freisetzung von CD62P in die Zellmembran (siehe 3.1.2, Abb. 5 & 6). FACS-Versuche konnten außerdem belegen, dass Antikörper gegen CXCL16, LOX-1 oder CD36 diese aktivierenden Effekte von oxLDL auf Thrombozyten reduzieren können, wodurch signifikant weniger CD62P auf der Zelloberfläche exponiert wird. Den größten Effekt erzielte dabei die Blockade von LOX-1.

Hierin kann eine Verbindung zu initialen pathogenetischen Schritten der Atherosklerose gesehen werden, für die Vorgänge wie die feste Adhäsion von oxLDL beladenen Plättchen an Gefäßwände inzwischen als wahrscheinlich gelten [101]. In vivo könnten demnach Thrombozyten bei Dysliproteinämie Kontakt zu oxidativ veränderten Lipoproteinen erlangen und nach Bindung und Internalisierung via CD36 oder anderen konstitutiv exprimierten SR (in geringem Maße auch CXCL16) in einen aktivierten Zustand versetzt werden. Neben Expressionssteigerung von induzierbaren SR wie CXCL16 oder LOX-1 ist in diesem Stadium auch eine zunehmende CD62P-Oberflächenexpression denkbar, die Roll- und Adhäsionsprozesse an intaktem oder aktiviertem Endothel ermöglicht und dadurch lokale Entzündungsreaktionen vorantreibt. Als ideale Matrix zur Extravasation von Monozyten und Progenitorzellen kann so im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren die Formation atherosklerotischer Läsionen initiiert werden [47, 49].

In vivo eingesetzte Antikörper gegen CXCL16 und andere SR könnten den Circulus vitiosus unterbrechen und zu einer Stabilisierung bzw. Desensibilisierung der Plättchen führen. Das Unterdrücken oxLDL-induzierter Effekte bietet insofern eine neue Möglichkeit, die „Klebrigkeit“ von Thrombozyten abzuschwächen und damit die Interaktion mit Endothel zu erschweren.

4.5 Schlussfolgerung

4.5.1 Stellenwert von CXCL16/SR-PSOX in der Atherogenese

Die Auffassung, dass oxLDL eine Schlüsselrolle in der Atherogenese einnimmt, ist heute allgemein akzeptiert. In unserer Arbeit konnte CXCL16 als neuer Scavenger-Rezeptor auf Thrombozyten identifiziert werden, der oxLDL bindet und dadurch in Abläufe eingebunden ist, die insgesamt als proatherogen einzustufen sind. Unsere Ergebnisse sind demnach gut vereinbar mit Erkenntnissen anderer Autoren, die CXCL16/SR-PSOX eine Beteiligung an vielen kausalen Schritten der Atherogenese bescheinigen. Wie unter Punkt 1.3.5.4.2 beschrieben, ist eine Expression von CXCL16 in atherosklerotischen Läsionen und in lipidreichen Plaquemakrophagen gesichert [115, 161]. Des Weiteren unterliegt die Regulation von CXCL16 auf Makrophagen Mechanismen, die von proatherogenen Mediatoren gestützt werden. Ähnlich zu unserem Versuchsergebnis mit Thrombozyten beschrieben Wuttge et al. eine induzierbare Steigerung der Oberflächenexpression auf Makrophagen, die mit einer Zunahme der oxLDL-Aufnahme einherging [187]. In beiden Fällen war diese gesteigerte Fähigkeit zur oxLDL-Bindung durch anti-CXCL16-mAk wieder antagonisierbar. Es gibt also keinen Zweifel, dass transmembranäres CXCL16/SR-PSOX für einen beträchtlichen Teil der oxLDL-Bindung auf Makrophagen und Thrombozyten verantwortlich ist. Thrombozytäres CXCL16 könnte in diesem Zusammenhang oxLDL aus dem Blutkreislauf „einfangen“, zu vaskulären Läsionen transportieren und die Formierung atherosklerotischer Plaques einleiten oder beschleunigen.

Auch die Tatsache, dass der Gen-Knockout von CD36 und SR-A in Versuchstieren keinen ausreichenden Schutz gegen Atherosklerose bietet,

rückt den Stellenwert von Scavenger-Rezeptoren wie CXCL16 in den Vordergrund, obwohl dies Veröffentlichungen anderer Autoren widerspricht [117]. Knockout-Studien zu CXCL16/SR-PSOX liefern bisher ebenfalls kontroverse Ergebnisse: Zwar ist die Aufnahme von oxLDL in Makrophagen CXCL16-defizienter Mäuse signifikant reduziert, jedoch wird bei zusätzlicher Abwesenheit des LDLR-Gens die Atherogenese in den Versuchstieren vehement beschleunigt. Dies unterstellt CXCL16 allgemein eine atheroprotektive Wirkung [8]. Einen Erklärungsansatz für diesen Widerspruch könnte die duale Funktion von CXCL16 liefern, die neben „Scavenging“ auch die chemoattraktive Wirkung der löslichen Form auf CXCR6-positive Zellen beinhaltet. Es ist noch nicht abschließend geklärt, welche der beiden Eigenschaften in vivo überwiegt und ob beiden eine atherosklerose-fördernde oder doch eine gegensätzliche biologische Funktion zu Grunde liegt.

Bisher hat man Interaktionen der CXCL16/CXCR6-Achse, die in einer festen Adhäsion beider Zelltypen resultieren, eher proatherogene Folgen zugesprochen. CXCR6 existiert vor allem auf Leukozyten-Subpopulationen wie etwa T-Zellen [83], die durch Chemoattraktion zu CXCL16 exprimierenden Läsionen migrieren und mit Produktion von proinflammatorischen Substanzen (z.B. IFN- γ) eine atherosklerotische Plaqueformation begünstigen könnten. Zur direkten Rekrutierung zirkulierender Lymphozyten wäre allerdings auch eine Oberflächenexpression von CXCL16/SR-PSOX auf plaque-nahem Endothel notwendig, was bisher noch nicht bzw. nur für HUVECs belegt wurde [67]. Hierzu dürften die in-vitro-Versuchsergebnisse dieser Arbeit ein alternatives Modell bieten, da stimulierte Thrombozyten reichlich CXCL16 in ihrer Zellmembran exprimieren. In vivo könnten diese z.B. über P-Selektine an Endothelzellen fest adhärieren, ebenso denkbar wäre auch eine Zytoadhäsion über CXCL16, falls Endothel - ähnlich wie HUVEC [97] - CXCR6 exprimiert. Somit ist ein Brückenmechanismus zu diskutieren, der die Migration von CXCR6-positiven Zellen zu den kritischen Lokalisationen in der Gefäßwand erleichtert. Dies würde die Annahme, dass CXCL16/SR-PSOX als dualer Rezeptor oxLDL-Aufnahme und Inflammation in der Atherogenese verbindet, weiter stützen.

Es ist noch nicht bekannt, ob Thrombozyten transmembranäres CXCL16 in die lösliche Form überführen können (sCXCL16). In diesem Fall würden neben einer verstärkten chemoattraktiven Wirkung auch zusätzliche stimulierende und proliferierende Signale auf die Zellverbände vor Ort einwirken, denn transmembranäres CXCL16 reduziert Zellwachstum via CXCR6, während gelöstes Proliferation und Migration steigert [32, 114]. Aus diesem widersprüchlichem Verhalten ergaben sich bei in-vitro-Versuchen Konsequenzen für die Atherogenese: Lösliches CXCL16 im Ernährungsmedium steigerte die Zellteilungsrate kultivierter glatter Muskelzellen (SMCs), was in vivo am ehesten einer Stabilisierung atherosklerotischer Läsionen gleich käme [20]. Desweiteren wurde die Freisetzung von IL-8, MCP-1 und MMPs in vaskulären SMCs angeregt, die dadurch inflammatorische und destabilisierende Wirkungen auf Plaques vermitteln könnten [170]. Die für sCXCL16 ebenfalls gezeigte Chemotaxis und Proliferation endothelialer Zellen (HUVECs) [195] vermag ebenfalls gegensätzliche Auswirkungen haben: zum einen die protektive Endothelialisierung der Atheromkappe, zum anderen die gesundheitsschädliche Steigerung der Angiogenese im Atherom [160]. Eine neuere Studie zum Thema konnte inzwischen aufdecken, dass die Überexpression von löslichem CXCL16 in Mäusen mit Apolipoprotein E - Knockout vorbestehende atherosklerotische Plaques in ihrer Größe nicht verändern konnte, jedoch die Morphologie beeinflusste und insgesamt zu gesteigerter Vulnerabilität führte [190].

Es bleibt noch zu diskutieren, wie auf Thrombozyten lokalisiertes CXCL16 im Endstadium der Atherosklerose beteiligt sein könnte. Die Ergebnisse deuten an, dass CXCL16 als Zelladhäsionsrezeptor mit oxLDL-haltigen Oberflächen in Kontakt treten und auf diese Weise in vivo eine verstärkte Thrombusbildung unterstützen könnte. Bei Plaqueruptur käme es zur Freilegung einer Gewebematrix aus Proteinen wie Kollagen und Fibronectin, Lipiden und Zellüberresten. Es sind bereits eine Reihe thrombozytärer Glykoproteine bekannt (siehe Tab. 1.1), die in diesem Szenario Adhäsionsprozesse ermöglichen und eine Thrombozytenaggregation herbeiführen. Parallel dazu

könnte transmembranäres CXCL16 in diesen Regionen an immobilisiertes oxLDL fest binden und zur Thrombozytenadhäsion beitragen.

Für eine abschließende Beurteilung von CXCL16 als möglicher Promotor der Atherosklerose sind jedenfalls noch tiefergehende in-vivo-Untersuchungen notwendig, welche die gegensätzlichen Effekte von CXCL16/SR-PSOX genauer beleuchten.

4.5.2 CXCL16/SR-PSOX als Biomarker im akuten Koronarsyndrom

Aufgrund der potentiell negativen Auswirkungen im menschlichen Gefäßsystem ist CXCL16/SR-PSOX auch als diagnostischer Marker im akuten Koronarsyndrom ins Gespräch gebracht worden. Unsere Arbeitsgruppe ermittelte in einer Beobachtungsstudie mit 61 konsekutiven Patienten eine deutliche Hochregulierung von thrombozytärem CXCL16 im akuten Koronarsyndrom und wies eine Korrelation mit der P-Selektin-Expression nach [154].

Darüber hinaus gilt insbesondere lösliches CXCL16 (sCXCL16), das durch Metalloproteinasen wie ADAM-10 und ADAM-17 kontinuierlich von der Zelloberfläche abgespalten wird [55] und aus vaskulären Läsionen in den systemischen Kreislauf eindringen könnte, als vielversprechender Parameter. Nach Auswertung einer Fall-Kontrollstudie mit 699 Patienten zeigte sich eine Korrelation von sCXCL16 mit metabolischen bzw. inflammatorischen Risikofaktoren und eine Assoziation mit chronischer und akuter koronarer Herzerkrankung [94]. Auch Smith et al. belegten für Patienten mit stabiler und instabiler Angina pectoris erhöhte Plasmawerte von sCXCL16 [170]. Daher wurde es als Biomarker hinsichtlich Spezifität und Sensitivität untersucht und mit hsCRP, TnT und sLOX-1 verglichen. Im Endergebnis zeigten KHK-Patienten überraschenderweise durchweg erniedrigte sCXCL16-Plasmaspiegel, die auch nicht mit den zuvor genannten Biomarkern korrelierbar waren [116]. Daraufhin haben weitere Arbeitsgruppen kontroverse Studien veröffentlicht, in denen keine Korrelation zwischen sCXCL16 und koronarer Herzkrankheit [181] oder erniedrigte Plasmaspiegel im akuten Koronarsyndrom gemessen wurden [116, 159]. Da auch Erkrankungen wie z.B. die rheumatoide Arthritis mit einer

Überexpression von CXCL16 einhergehen, ging man von falsch hohen Blutwerten in den zuvor erhobenen Studien aus. Insgesamt gesehen sind deshalb noch weitere, mit größerer Vorsicht erstellte und mit ausreichender Fallzahl versehene klinische Studien notwendig, die Unterschiede zwischen Patienten mit akutem Koronarsyndrom und Kontrollgruppen deutlicher detektieren können.

4.5.3 CXCL16/SR-PSOX als therapeutisches Angriffsziel

Pharmakologische Therapien, wie etwa die Inhibierung der Cholesterinsynthese durch Statine, sind inzwischen wichtige Stützpfeiler der Prävention und Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen. Trotz ihrer pleiotropen protektiven Effekte verhindern sie jedoch nicht vollständig die Aufnahme von oxLDL in somatische Zellen. In dieser Arbeit sind bereits ausführlichst die negativen Aspekte einer Interaktion zwischen oxLDL und Scavenger-Rezeptoren, wie LOX-1, CD36 und dem neuen Vertreter CXCL16, dargelegt worden. Daher scheint die selektive Blockade von Scavenger-Rezeptoren eine interessante neue therapeutische Strategie zu sein. In unseren Versuchen bestätigte sich, dass die Oberflächenbindung von oxLDL auf Thrombozyten durch anti-LOX-1- und anti-CD36-mAk vermindert werden kann. Auch für CXCL16/SR-PSOX zeigte sich eine Abnahme der oxLDL Bindung und eine reduzierte Affinität gegenüber einer oxLDL/Kollagen-Proteinmatrix. Schließlich konnte in allen Fällen auch die vom Aktivierungszustand abhängige Expression thrombozytärer P-Selektine abgeschwächt werden. Weitere Versuche müssen nun klären, inwieweit diese in-vitro-Ergebnisse auf den lebenden Organismus übertragbar sind. Es sollte auch erprobt werden, ob sich aus der Kombination mehrerer Antikörper eine additive Wirkung ergibt. Für LOX-1 existieren bereits vielversprechende Ansätze, so zeigte sich in kultivierten Endothelzellen (HUVECs) nach Einsatz von anti-LOX-1-mAk eine reduzierte Bildung freier Radikale und dadurch eine verminderte oxLDL induzierte Apoptose [25]. Auch CXCL16/SR-PSOX ist gegenwärtig bereits Gegenstand einiger Studien, die seine Beteiligung an der Pathogenese weiterer inflammatorischer Erkrankungen überprüft. Daraus können erste Hinweise auf mögliche klinische Auswirkungen

von anti-CXCL16-mAk gezogen werden: Die Rekrutierung CXCR6-positiver natürlichen T-Killer-Zellen, die auch in der Atherogenese unlängst als kritische Verbindung zwischen Dyslipidämie und Inflammation gehandelt wurden [16], wird in entzündlichen Geweben, wie etwa Transplantaten, blockiert [74]. Ebenso reduzierte sich die Migration von T-Zellen in die Synovia von Mäusen, die an rheumatoider Arthritis leiden – in der Folge mit gelinderter Krankheitsaktivität und abgeschwächter Gelenksdestruktion [125].

5. Zusammenfassung

Oxidierter Lipoproteine sind als Promotoren der Atherosklerose für eine Reihe von schädlichen Prozessen im Organismus verantwortlich, zu denen unter anderem zytotoxische Effekte, vaskuläre Inflammation und Schaumzellbildung zählen. Die kritische Schaltstelle ist dabei die Bindung und Internalisierung von oxLDL über Scavenger-Rezeptoren. Auch Thrombozyten erlangen im Blutstrom Kontakt zu oxLDL und werden dadurch in ihrem Aktivierungszustand verändert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde CXCL16/SR-PSOX als neuer Scavenger-Rezeptor auf Thrombozyten vorgestellt und seine Eigenschaften *in vitro* charakterisiert.

Konfokale Lasermikroskopie und FACS-Analysen konnten zeigen, dass CXCL16 aktivierungsabhängig auf der Zelloberfläche von Blutplättchen exprimiert wird und im aktivierten Zustand auch an der Bindung von oxLDL beteiligt ist. Mit Flusskammerexperimenten konnte belegt werden, dass CXCL16 sowohl Rollvorgänge als auch eine feste Adhäsion von Thrombozyten an einer Kollagen/oxLDL-Matrix begünstigt. Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen CXCL16 setzte das oxLDL-Bindungsvermögen stimulierter Thrombozyten signifikant herab und verminderte auch signifikant die Affinität zu Kollagen/oxLDL-Beschichtungen. Thrombozytäres CXCL16 und CD62P werden oxLDL-abhängig induziert und auf der Zelloberfläche exprimiert. In dieser Arbeit konnte belegt werden, dass anti-CXCL16-mAk durch Störung der oxLDL-Bindung die Oberflächenexpression von P-Selektinen statistisch signifikant verringert.

Diese Untersuchungsergebnisse lassen den Schluss zu, dass thrombozytäres CXCL16/SR-PSOX bei Ereignissen, die mit einer Plättchenaktivierung einhergehen, aus intrazellulären Speichern an die Zelloberfläche überführt werden kann und dort die Bindung von oxLDL antreibt. Eine daraus resultierende Hyperreaktivität der Plättchen könnte die Expression von Adapterproteinen wie P-Selektin begünstigen und ein Rollen und Anheften an Gefäßwände ermöglichen. Mit oxLDL beladene Thrombozyten könnten auf diese Weise in der Lage sein, Kontakt mit der Endothelbarriere zu erlangen und

in der Folge die Initiierung oder Progression von atherosklerotischen Plaques begünstigen. Außerdem könnte transmembranäres CXCL16/SR-PSOX die Bindung an immobilisiertes oxLDL, beispielsweise in einer Gewebematrix nach Plaqueruptur, erleichtern und eine Thrombusformation im Blutgefäß fördern. Aufgrund der einzigartigen dualen Funktion von CXCL16/SR-PSOX, die neben „Scavenging“ auch Chemotaxis beinhaltet, ist außerdem in Betracht zu ziehen, dass CXCL16 als Zytoadhäsionsrezeptor bestimmte CXCR6-positive Entzündungszellen aus dem Blutstrom rekrutiert und eine Transmigration zu vaskulären Läsionen vorantreibt. Am Endothel adhärente Thrombozyten mit oberflächen-gebundenem CXCL16 könnten dabei als Brückenzellen dienen. Diese Überlegungen lassen CXCL16 als einen Scavenger-Rezeptor erscheinen, der eine kritische Verbindung zwischen Atherogenese und Inflammation herstellt. Da in Veröffentlichungen anderer Autoren teils widersprüchliche Effekte von CXCL16/SR-PSOX dargestellt wurden, die zum Teil auf der unterschiedlichen Konstitution als gelöstes oder transmembranäres Molekül beruhen könnten, sind für eine abschließende Beurteilung von CXCL16 noch tiefergehende in-vivo-Untersuchungen notwendig. Für eine Anwendung in der klinischen Praxis ist zudem die Rolle von CXCL16 als Biomarker im akuten Koronarsyndrom genauer zu überprüfen. Eine Einsatzmöglichkeit von Antikörpern gegen CXCL16 als therapeutische Strategie bei kardiovaskulären Erkrankungen ist bis jetzt ein theoretischer Gedanke und muss nach weiterer Aufklärung des multifunktionellen Moleküls in vivo fortgeführt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Abel, S., C. Hundhausen, R. Mentlein, A. Schulte, T.A. Berkhout, N. Broadway, D. Hartmann, R. Sedlacek, S. Dietrich, B. Muetze, B. Schuster, K.J. Kallen, P. Saftig, S. Rose-John, and A. Ludwig (2004), *The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10*. J Immunol. 172(10): p. 6362-72.
2. Abumrad, N.A., M.R. el-Maghrabi, E.Z. Amri, E. Lopez, and P.A. Grimaldi (1993), *Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36*. J Biol Chem. 268(24): p. 17665-8.
3. Aitman, T.J., A.M. Glazier, C.A. Wallace, L.D. Cooper, P.J. Norsworthy, F.N. Wahid, K.M. Al-Majali, P.M. Trembling, C.J. Mann, C.C. Shoulders, D. Graf, E. St Lezin, T.W. Kurtz, V. Kren, M. Pravenec, A. Ibrahimi, N.A. Abumrad, L.W. Stanton, and J. Scott (1999), *Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats*. Nat Genet. 21(1): p. 76-83.
4. Akkerman, J.W. (2008), *From low-density lipoprotein to platelet activation*. Int J Biochem Cell Biol. 40(11): p. 2374-8.
5. Anderson, K.M., P.M. Odell, P.W. Wilson, and W.B. Kannel (1991), *Cardiovascular disease risk profiles*. Am Heart J. 121(1 Pt 2): p. 293-8.
6. Aoyama, T., T. Sawamura, Y. Furutani, R. Matsuoka, M.C. Yoshida, H. Fujiwara, and T. Masaki (1999), *Structure and chromosomal assignment of the human lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor-1 (LOX-1) gene*. Biochem J. 339 (Pt 1): p. 177-84.
7. Asch, A.S., J. Barnwell, R.L. Silverstein, and R.L. Nachman (1987), *Isolation of the thrombospondin membrane receptor*. J Clin Invest. 79(4): p. 1054-61.
8. Aslanian, A.M. and I.F. Charo (2006), *Targeted disruption of the scavenger receptor and chemokine CXCL16 accelerates atherosclerosis*. Circulation. 114(6): p. 583-90.
9. Aviram, M. and J.G. Brook (1987), *Platelet activation by plasma lipoproteins*. Prog Cardiovasc Dis. 30(1): p. 61-72.
10. Aviram, M., B. Fuhrman, S. Keidar, I. Maor, M. Rosenblat, G. Dankner, and G. Brook (1989), *Platelet-modified low density lipoprotein induces macrophage cholesterol accumulation and platelet activation*. J Clin Chem Clin Biochem. 27(1): p. 3-12.
11. Barlage, S., D. Boettcher, A. Boettcher, A. Dada, and G. Schmitz (2006), *High density lipoprotein modulates platelet function*. Cytometry A. 69(3): p. 196-9.
12. Barnwell, J.W., A.S. Asch, R.L. Nachman, M. Yamaya, M. Aikawa, and P. Ingravallo (1989), *A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. J Clin Invest. 84(3): p. 765-72.

13. Berendt, A.R., D.J. Ferguson, and C.I. Newbold (1990), *Sequestration in Plasmodium falciparum malaria: sticky cells and sticky problems*. Parasitol Today. 6(8): p. 247-54.
14. Bombeli, T., B.R. Schwartz, and J.M. Harlan (1998), *Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalpha*. J Exp Med. 187(3): p. 329-39.
15. Bouazzaoui, A., E. Spacenko, G. Mueller, S. Miklos, E. Huber, E. Holler, R. Andreesen, and G.C. Hildebrandt (2009), *Chemokine and chemokine receptor expression analysis in target organs of acute graft-versus-host disease*. Genes Immun. 10(8): p. 687-701.
16. Braun, N.A., R. Covarrubias, and A.S. Major *Natural killer T cells and atherosclerosis: form and function meet pathogenesis*. J Innate Immun. 2(4): p. 316-24.
17. Brown, M.S., S.K. Basu, J.R. Falck, Y.K. Ho, and J.L. Goldstein (1980), *The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages*. J Supramol Struct. 13(1): p. 67-81.
18. Carnevale, R., P. Pignatelli, L. Lenti, B. Buchetti, V. Sanguigni, S. Di Santo, and F. Violi (2007), *LDL are oxidatively modified by platelets via GP91(phox) and accumulate in human monocytes*. FASEB J. 21(3): p. 927-34.
19. Carr, A.C., M.R. McCall, and B. Frei (2000), *Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20(7): p. 1716-23.
20. Chandrasekar, B., S. Bysani, and S. Mummidi (2004), *CXCL16 signals via Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, I kappa B kinase, and nuclear factor-kappa B and induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation*. J Biol Chem. 279(5): p. 3188-96.
21. Chen, K., M. Febbraio, W. Li, and R.L. Silverstein (2008), *A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxidized low-density lipoprotein*. Circ Res. 102(12): p. 1512-9.
22. Chen, M., M. Kakutani, T. Naruko, M. Ueda, S. Narumiya, T. Masaki, and T. Sawamura (2001), *Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets*. Biochem Biophys Res Commun. 282(1): p. 153-8.
23. Chen, M., T. Masaki, and T. Sawamura (2002), *LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis*. Pharmacol Ther. 95(1): p. 89-100.
24. Chen, X.P. and G.H. Du (2007), *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: protein, ligands, expression and pathophysiological significance*. Chin Med J (Engl). 120(5): p. 421-6.
25. Chen, X.P., K.L. Xun, Q. Wu, T.T. Zhang, J.S. Shi, and G.H. Du (2007), *Oxidized low density lipoprotein receptor-1 mediates oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of reactive oxygen species*. Vascul Pharmacol. 47(1): p. 1-9.

26. Coburn, C.T., T. Hajri, A. Ibrahimi, and N.A. Abumrad (2001), *Role of CD36 in membrane transport and utilization of long-chain fatty acids by different tissues*. J Mol Neurosci. 16(2-3): p. 117-21; discussion 151-7.
27. Collot-Teixeira, S., F. De Lorenzo, and J.L. McGregor (2007), *Scavenger receptor A and CD36 are implicated in mediating platelet activation induced by oxidized low-density lipoproteins*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 27(12): p. 2491-2.
28. Colman, R.W. and W.R. Figures (1984), *Characteristics of an ADP receptor mediating platelet activation*. Mol Cell Biochem. 59(1-2): p. 101-11.
29. Coppinger, J.A., G. Cagney, S. Toomey, T. Kislinger, O. Belton, J.P. McRedmond, D.J. Cahill, A. Emili, D.J. Fitzgerald, and P.B. Maguire (2004), *Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions*. Blood. 103(6): p. 2096-104.
30. Daub, K., S. Lindemann, H. Langer, P. Seizer, K. Stellos, D. Siegel-Axel, and M. Gawaz (2007), *The evil in atherosclerosis: adherent platelets induce foam cell formation*. Semin Thromb Hemost. 33(2): p. 173-8.
31. de Bruin, J.A., Dorn, F., Duguid J. B., Hamperl H., Hartroft W.S., Higgenson J. (1958), *Classification of atherosclerotic lesions*. Technical Report Series 143: p. 3-4.
32. Deng, L., N. Chen, Y. Li, H. Zheng, and Q. Lei *CXCR6/CXCL16 functions as a regulator in metastasis and progression of cancer*. Biochim Biophys Acta. 1806(1): p. 42-9.
33. Dhaliwal, B.S. and U.P. Steinbrecher (1999), *Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins*. Clin Chim Acta. 286(1-2): p. 191-205.
34. Eagan, T.M., T. Ueland, P.D. Wagner, J.A. Hardie, T.E. Mollnes, J.K. Damas, P. Aukrust, and P.S. Bakke *Systemic inflammatory markers in COPD: results from the Bergen COPD Cohort Study*. Eur Respir J. 35(3): p. 540-8.
35. Endemann, G., L.W. Stanton, K.S. Madden, C.M. Bryant, R.T. White, and A.A. Protter (1993), *CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein*. J Biol Chem. 268(16): p. 11811-6.
36. Evangelista, V., S. Manarini, R. Sideri, S. Rotondo, N. Martelli, A. Piccoli, L. Totani, P. Piccardoni, D. Vestweber, G. de Gaetano, and C. Cerletti (1999), *Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule*. Blood. 93(3): p. 876-85.
37. Febbraio, M., D.P. Hajjar, and R.L. Silverstein (2001), *CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism*. J Clin Invest. 108(6): p. 785-91.
38. Febbraio, M., E.A. Podrez, J.D. Smith, D.P. Hajjar, S.L. Hazen, H.F. Hoff, K. Sharma, and R.L. Silverstein (2000), *Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice*. J Clin Invest. 105(8): p. 1049-56.

39. Fernandez-Ruiz, E., A.L. Armesilla, F. Sanchez-Madrid, and M.A. Vega (1993), *Gene encoding the collagen type I and thrombospondin receptor CD36 is located on chromosome 7q11.2*. Genomics. 17(3): p. 759-61.
40. Fogelman, A.M., I. Shechter, J. Seager, M. Hokom, J.S. Child, and P.A. Edwards (1980), *Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A. 77(4): p. 2214-8.
41. Frenette, P.S., R.C. Johnson, R.O. Hynes, and D.D. Wagner (1995), *Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin*. Proc Natl Acad Sci U S A. 92(16): p. 7450-4.
42. Frenette, P.S., C. Moyna, D.W. Hartwell, J.B. Lowe, R.O. Hynes, and D.D. Wagner (1998), *Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules*. Blood. 91(4): p. 1318-24.
43. Fries, J.W., A.J. Williams, R.C. Atkins, W. Newman, M.F. Lipscomb, and T. Collins (1993), *Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation*. Am J Pathol. 143(3): p. 725-37.
44. Frostegard, J., R. Wu, R. Giscombe, G. Holm, A.K. Lefvert, and J. Nilsson (1992), *Induction of T-cell activation by oxidized low density lipoprotein*. Arterioscler Thromb. 12(4): p. 461-7.
45. Galkina, E., B.L. Harry, A. Ludwig, E.A. Liehn, J.M. Sanders, A. Bruce, C. Weber, and K. Ley (2007), *CXCR6 promotes atherosclerosis by supporting T-cell homing, interferon-gamma production, and macrophage accumulation in the aortic wall*. Circulation. 116(16): p. 1801-11.
46. Gawaz, M., K. Brand, T. Dickfeld, G. Pogatsa-Murray, S. Page, C. Bogner, W. Koch, A. Schomig, and F. Neumann (2000), *Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis*. Atherosclerosis. 148(1): p. 75-85.
47. Gawaz, M., H. Langer, and A.E. May (2005), *Platelets in inflammation and atherogenesis*. J Clin Invest. 115(12): p. 3378-84.
48. Gawaz, M., F.J. Neumann, T. Dickfeld, A. Reininger, H. Adelsberger, A. Gebhardt, and A. Schomig (1997), *Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction*. Circulation. 96(6): p. 1809-18.
49. Gawaz, M., K. Stellos, and H.F. Langer (2008), *Platelets modulate atherogenesis and progression of atherosclerotic plaques via interaction with progenitor and dendritic cells*. J Thromb Haemost. 6(2): p. 235-42.
50. Gawaz, M.P. (1999), *Das Blutplättchen : Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung ; 31 Tabellen*. Stuttgart {[u.a.]}: Thieme. VII, 144 S.
51. Ge, Y. and M.T. Elghetany (2005), *CD36: a multiligand molecule*. Lab Hematol. 11(1): p. 31-7.
52. Gerrity, R.G. (1981), *The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions*. Am J Pathol. 103(2): p. 181-90.

53. Goldstein, J.L. and M.S. Brown (1975), *Lipoprotein receptors, cholesterol metabolism, and atherosclerosis*. Arch Pathol. 99(4): p. 181-4.
54. Goldstein, J.L., Y.K. Ho, S.K. Basu, and M.S. Brown (1979), *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition*. Proc Natl Acad Sci U S A. 76(1): p. 333-7.
55. Gough, P.J., K.J. Garton, P.T. Wille, M. Rychlewski, P.J. Dempsey, and E.W. Raines (2004), *A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16*. J Immunol. 172(6): p. 3678-85.
56. Greenwalt, D.E., R.H. Lipsky, C.F. Ockenhouse, H. Ikeda, N.N. Tandon, and G.A. Jamieson (1992), *Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine*. Blood. 80(5): p. 1105-15.
57. Greenwalt, D.E., K.W. Watt, O.Y. So, and N. Jiwani (1990), *PAS IV, an integral membrane protein of mammary epithelial cells, is related to platelet and endothelial cell CD36 (GP IV)*. Biochemistry. 29(30): p. 7054-9.
58. Gruarin, P., R.F. Thorne, D.J. Dorahy, G.F. Burns, R. Sitia, and M. Alessio (2000), *CD36 is a ditopic glycoprotein with the N-terminal domain implicated in intracellular transport*. Biochem Biophys Res Commun. 275(2): p. 446-54.
59. Gutwein, P., M.S. Abdel-Bakky, A. Schramme, K. Doberstein, N. Kampfer-Kolb, K. Amann, I.A. Hauser, N. Obermuller, C. Bartel, A.A. Abdel-Aziz, S.M. El Sayed el, and J. Pfeilschifter (2009), *CXCL16 is expressed in podocytes and acts as a scavenger receptor for oxidized low-density lipoprotein*. Am J Pathol. 174(6): p. 2061-72.
60. Harb, D., K. Bujold, M. Febbraio, M.G. Sirois, H. Ong, and S. Marleau (2009), *The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation*. Cardiovasc Res. 83(1): p. 42-51.
61. Harmon, C.M. and N.A. Abumrad (1993), *Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids*. J Membr Biol. 133(1): p. 43-9.
62. Hawrylowicz, C.M., G.L. Howells, and M. Feldmann (1991), *Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production*. J Exp Med. 174(4): p. 785-90.
63. Hayashida, K., N. Kume, T. Murase, M. Minami, D. Nakagawa, T. Inada, M. Tanaka, A. Ueda, G. Kominami, H. Kambara, T. Kimura, and T. Kita (2005), *Serum soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 levels are elevated in acute coronary syndrome: a novel marker for early diagnosis*. Circulation. 112(6): p. 812-8.
64. Heinecke, J.W. (1998), *Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis*. Atherosclerosis. 141(1): p. 1-15.
65. Henriksen, T., E.M. Mahoney, and D. Steinberg (1981), *Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated*

- with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 78(10): p. 6499-503.*
66. Hermey, G. *Der Experimentator: Neurowissenschaften.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 273 S.
 67. Hofnagel, O., B. Luechtenborg, G. Plenz, and H. Robenek (2002), *Expression of the novel scavenger receptor SR-PSOX in cultured aortic smooth muscle cells and umbilical endothelial cells.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22(4): p. 710-1.
 68. Husemann, J. and S.C. Silverstein (2001), *Expression of scavenger receptor class B, type I, by astrocytes and vascular smooth muscle cells in normal adult mouse and human brain and in Alzheimer's disease brain.* *Am J Pathol.* 158(3): p. 825-32.
 69. Hwang, E.H., J. Taki, S. Yasue, M. Fujimoto, M. Taniguchi, I. Matsunari, K. Nakajima, S. Shiobara, T. Ikeda, and N. Tonami (1998), *Absent myocardial iodine-123-BMIPP uptake and platelet/monocyte CD36 deficiency.* *J Nucl Med.* 39(10): p. 1681-4.
 70. Ignatius, R., Y. Wei, S. Beaulieu, A. Gettie, R.M. Steinman, M. Pope, and S. Mojsov (2000), *The immunodeficiency virus coreceptor, Bonzo/STRL33/TYMSTR, is expressed by macaque and human skin- and blood-derived dendritic cells.* *AIDS Res Hum Retroviruses.* 16(11): p. 1055-9.
 71. Janabi, M., S. Yamashita, K. Hirano, N. Sakai, H. Hiraoka, K. Matsumoto, Z. Zhang, S. Nozaki, and Y. Matsuzawa (2000), *Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20(8): p. 1953-60.
 72. Jang, I.K., R. Lassila, and V. Fuster (1993), *Atherogenesis and inflammation.* *Eur Heart J.* 14 Suppl K: p. 2-6.
 73. Jialal, I. and S. Devaraj (1996), *The role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis.* *J Nutr.* 126(4 Suppl): p. 1053S-7S.
 74. Jiang, X., T. Shimaoka, S. Kojo, M. Harada, H. Watarai, H. Wakao, N. Ohkohchi, S. Yonehara, M. Taniguchi, and K. Seino (2005), *Cutting edge: critical role of CXCL16/CXCR6 in NKT cell trafficking in allograft tolerance.* *J Immunol.* 175(4): p. 2051-5.
 75. Jin, Y., S. Nonoyama, T. Morio, K. Imai, H.D. Ochs, and S. Mizutani (2001), *Characterization of soluble CD40 ligand released from human activated platelets.* *J Med Dent Sci.* 48(1): p. 23-7.
 76. Johnston, B., C.H. Kim, D. Soler, M. Emoto, and E.C. Butcher (2003), *Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR alpha beta NKT cell subsets.* *J Immunol.* 171(6): p. 2960-9.
 77. Jurgens, G., H.F. Hoff, G.M. Chisolm, 3rd, and H. Esterbauer (1987), *Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation--characterization and pathophysiological implications.* *Chem Phys Lipids.* 45(2-4): p. 315-36.
 78. Kagan, A., T.R. Dawber, W.B. Kannel, and N. Revotskie (1962), *The Framingham study: a prospective study of coronary heart disease.* *Fed Proc.* 21(4)Pt 2: p. 52-7.

79. Kakutani, M., T. Masaki, and T. Sawamura (2000), *A platelet-endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*. Proc Natl Acad Sci U S A. 97(1): p. 360-4.
80. Kataoka, H., N. Kume, S. Miyamoto, M. Minami, M. Morimoto, K. Hayashida, N. Hashimoto, and T. Kita (2001), *Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 21(6): p. 955-60.
81. Kim, C.H., E.C. Butcher, and B. Johnston (2002), *Distinct subsets of human Valpha24-invariant NKT cells: cytokine responses and chemokine receptor expression*. Trends Immunol. 23(11): p. 516-9.
82. Kim, C.H., B. Johnston, and E.C. Butcher (2002), *Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity*. Blood. 100(1): p. 11-6.
83. Kim, C.H., E.J. Kunkel, J. Boisvert, B. Johnston, J.J. Campbell, M.C. Genovese, H.B. Greenberg, and E.C. Butcher (2001), *Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential*. J Clin Invest. 107(5): p. 595-601.
84. Koller, E. (1986), *Lipoprotein-binding proteins in the human platelet plasma membrane*. FEBS Lett. 200(1): p. 97-102.
85. Kornitzer, M. (1996), *[20 years of cardiovascular epidemiology. The epidemiologist's viewpoint]*. Rev Epidemiol Sante Publique. 44(6): p. 563-76.
86. Korporaal, S.J., G. Gorter, H.J. van Rijn, and J.W. Akkerman (2005), *Effect of oxidation on the platelet-activating properties of low-density lipoprotein*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25(4): p. 867-72.
87. Korporaal, S.J., M. Van Eck, J. Adelmeijer, M. Ijsseldijk, R. Out, T. Lisman, P.J. Lenting, T.J. Van Berkel, and J.W. Akkerman (2007), *Platelet activation by oxidized low density lipoprotein is mediated by CD36 and scavenger receptor-A*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 27(11): p. 2476-83.
88. Kudo, E., T. Hirose, T. Sano, and K. Hizawa (1992), *Epitopic heterogeneity of the CD36 antigen expressed by normal and neoplastic endothelial cells. An immunohistochemical study with a novel monoclonal antibody 8C9*. Acta Pathol Jpn. 42(11): p. 807-17.
89. Kuliczowska-Plaksej, J., G. Bednarek-Tupikowska, R. Plaksej, and A. Filus (2006), *[Scavenger receptor CD36: its expression, regulation, and role in the pathogenesis of atherosclerosis. Part I]*. Postepy Hig Med Dosw (Online). 60: p. 142-51.
90. Kume, N., T. Murase, H. Moriwaki, T. Aoyama, T. Sawamura, T. Masaki, and T. Kita (1998), *Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells*. Circ Res. 83(3): p. 322-7.
91. Kunicki, T.J. (1989), *Platelet membrane glycoproteins and their function: an overview*. Blut. 59(1): p. 30-4.
92. Langer, H.F., K. Daub, G. Braun, T. Schonberger, A.E. May, M. Schaller, G.M. Stein, K. Stellos, A. Bueltmann, D. Siegel-Axel, H.P. Wendel, H. Aebert, M. Roecken, P. Seizer, S. Santoso, S. Wesselborg, P. Brossart, and M. Gawaz (2007), *Platelets recruit human dendritic cells via Mac-*

- 1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27(6): p. 1463-70.
93. Langer, H.F. and M. Gawaz (2008), *Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease.* *Thromb Haemost.* 99(3): p. 480-6.
 94. Lehrke, M., S.C. Millington, M. Lefterova, R.G. Cumarantunge, P. Szapary, R. Wilensky, D.J. Rader, M.A. Lazar, and M.P. Reilly (2007), *CXCL16 is a marker of inflammation, atherosclerosis, and acute coronary syndromes in humans.* *J Am Coll Cardiol.* 49(4): p. 442-9.
 95. Liang, C.P., S. Han, H. Okamoto, R. Carnemolla, I. Tabas, D. Accili, and A.R. Tall (2004), *Increased CD36 protein as a response to defective insulin signaling in macrophages.* *J Clin Invest.* 113(5): p. 764-73.
 96. Libby, P., Y.J. Geng, M. Aikawa, U. Schoenbeck, F. Mach, S.K. Clinton, G.K. Sukhova, and R.T. Lee (1996), *Macrophages and atherosclerotic plaque stability.* *Curr Opin Lipidol.* 7(5): p. 330-5.
 97. Lin, S., L. Sun, J. Hu, S. Wan, R. Zhao, S. Yuan, and L. Zhang (2009), *Chemokine C-X-C motif receptor 6 contributes to cell migration during hypoxia.* *Cancer Lett.* 279(1): p. 108-17.
 98. Lindemann, S., B. Kramer, P. Seizer, and M. Gawaz (2007), *Platelets, inflammation and atherosclerosis.* *J Thromb Haemost.* 5 Suppl 1: p. 203-11.
 99. Luttmann, W. (2009), *Der Experimentator: Immunologie.* 3. Aufl.. ed., Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. XIV, 309 S.
 100. Martin-Fuentes, P., F. Civeira, D. Recalde, A.L. Garcia-Otin, E. Jarauta, I. Marzo, and A. Cienarro (2007), *Individual variation of scavenger receptor expression in human macrophages with oxidized low-density lipoprotein is associated with a differential inflammatory response.* *J Immunol.* 179(5): p. 3242-8.
 101. Massberg, S., K. Brand, S. Gruner, S. Page, E. Muller, I. Muller, W. Bergmeier, T. Richter, M. Lorenz, I. Konrad, B. Nieswandt, and M. Gawaz (2002), *A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation.* *J Exp Med.* 196(7): p. 887-96.
 102. Massberg, S., G. Enders, R. Leiderer, S. Eisenmenger, D. Vestweber, F. Krombach, and K. Messmer (1998), *Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin.* *Blood.* 92(2): p. 507-15.
 103. Matloubian, M., A. David, S. Engel, J.E. Ryan, and J.G. Cyster (2000), *A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo.* *Nat Immunol.* 1(4): p. 298-304.
 104. Matsumoto, K., K. Hirano, S. Nozaki, A. Takamoto, M. Nishida, Y. Nakagawa-Toyama, M.Y. Janabi, T. Ohya, S. Yamashita, and Y. Matsuzawa (2000), *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.* 20(4): p. 1027-32.
 105. May, A.E., T. Kalsch, S. Massberg, Y. Herouy, R. Schmidt, and M. Gawaz (2002), *Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha(IIb)beta3) on*

- platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells.* Circulation. 106(16): p. 2111-7.
106. May, A.E., H. Langer, P. Seizer, B. Bigalke, S. Lindemann, and M. Gawaz (2007), *Platelet-leukocyte interactions in inflammation and atherothrombosis.* Semin Thromb Hemost. 33(2): p. 123-7.
 107. May, A.E., R. Schmidt, B.O. Bulbul, M. Holderle, F. Walther, A. Schomig, M. Gawaz, and M. Klouche (2005), *Plasminogen and matrix metalloproteinase activation by enzymatically modified low density lipoproteins in monocytes and smooth muscle cells.* Thromb Haemost. 93(4): p. 710-5.
 108. May, A.E., P. Seizer, and M. Gawaz (2008), *Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 28(3): p. s5-10.
 109. McEver, R.P. (1990), *Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium.* Blood Cells. 16(1): p. 73-80; discussion 80-3.
 110. McEver, R.P. (2001), *Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation.* Thromb Haemost. 86(3): p. 746-56.
 111. McGilvray, I.D., L. Serghides, A. Kapus, O.D. Rotstein, and K.C. Kain (2000), *Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance.* Blood. 96(9): p. 3231-40.
 112. McGregor, J.L., B. Catimel, S. Parmentier, P. Clezardin, M. Dechavanne, and L.L. Leung (1989), *Rapid purification and partial characterization of human platelet glycoprotein IIIb. Interaction with thrombospondin and its role in platelet aggregation.* J Biol Chem. 264(1): p. 501-6.
 113. McRedmond, J.P., S.D. Park, D.F. Reilly, J.A. Coppinger, P.B. Maguire, D.C. Shields, and D.J. Fitzgerald (2004), *Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes.* Mol Cell Proteomics. 3(2): p. 133-44.
 114. Meijer, J., J. Ogink, B. Kreike, D. Nuyten, K.E. de Visser, and E. Roos (2008), *The chemokine receptor CXCR6 and its ligand CXCL16 are expressed in carcinomas and inhibit proliferation.* Cancer Res. 68(12): p. 4701-8.
 115. Minami, M., N. Kume, T. Shimaoka, H. Kataoka, K. Hayashida, Y. Akiyama, I. Nagata, K. Ando, M. Nobuyoshi, M. Hanyuu, M. Komeda, S. Yonehara, and T. Kita (2001), *Expression of SR-PSOX, a novel cell-surface scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized LDL in human atherosclerotic lesions.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 21(11): p. 1796-800.
 116. Mitsuoka, H., M. Toyohara, N. Kume, K. Hayashida, T. Jinnai, M. Tanaka, and T. Kita (2009), *Circulating soluble SR-PSOX/CXCL16 as a biomarker for acute coronary syndrome -comparison with high-sensitivity C-reactive protein.* J Atheroscler Thromb. 16(5): p. 586-93.
 117. Moore, K.J., V.V. Kunjathoor, S.L. Koehn, J.J. Manning, A.A. Tseng, J.M. Silver, M. McKee, and M.W. Freeman (2005), *Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not*

- ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice.* J Clin Invest. 115(8): p. 2192-201.
118. Morel, D.W., P.E. DiCorleto, and G.M. Chisolm (1984), *Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation.* Arteriosclerosis. 4(4): p. 357-64.
 119. Munro, J.M. and R.S. Cotran (1988), *The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation.* Lab Invest. 58(3): p. 249-61.
 120. Murase, T., N. Kume, H. Kataoka, M. Minami, T. Sawamura, T. Masaki, and T. Kita (2000), *Identification of soluble forms of lectin-like oxidized LDL receptor-1.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20(3): p. 715-20.
 121. Murase, T., N. Kume, R. Korenaga, J. Ando, T. Sawamura, T. Masaki, and T. Kita (1998), *Fluid shear stress transcriptionally induces lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells.* Circ Res. 83(3): p. 328-33.
 122. Nagase, M., K. Ando, T. Nagase, S. Kaname, T. Sawamura, and T. Fujita (2001), *Redox-sensitive regulation of lox-1 gene expression in vascular endothelium.* Biochem Biophys Res Commun. 281(3): p. 720-5.
 123. Nakata, A., Y. Nakagawa, M. Nishida, S. Nozaki, J. Miyagawa, T. Nakagawa, R. Tamura, K. Matsumoto, K. Kameda-Takemura, S. Yamashita, and Y. Matsuzawa (1999), *CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 19(5): p. 1333-9.
 124. Nakayama, T., K. Hieshima, D. Izawa, Y. Tatsumi, A. Kanamaru, and O. Yoshie (2003), *Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues.* J Immunol. 170(3): p. 1136-40.
 125. Nanki, T., T. Shimaoka, K. Hayashida, K. Taniguchi, S. Yonehara, and N. Miyasaka (2005), *Pathogenic role of the CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum. 52(10): p. 3004-14.
 126. Newby, A.C. and A.B. Zaltsman (1999), *Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation.* Cardiovasc Res. 41(2): p. 345-60.
 127. Nicholson, A.C. (2004), *Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis: the role of lipid regulation of PPARgamma signaling.* Trends Cardiovasc Med. 14(1): p. 8-12.
 128. Nozaki, S., H. Kashiwagi, S. Yamashita, T. Nakagawa, B. Kostner, Y. Tomiyama, A. Nakata, M. Ishigami, J. Miyagawa, K. Kameda-Takemura, and et al. (1995), *Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects.* J Clin Invest. 96(4): p. 1859-65.
 129. Nuyttens, B.P., T. Thijs, H. Deckmyn, and K. Broos *Platelet adhesion to collagen.* Thromb Res. 127 Suppl 2: p. S26-9.
 130. Ogura, S., A. Kakino, Y. Sato, Y. Fujita, S. Iwamoto, K. Otsui, R. Yoshimoto, and T. Sawamura (2009), *Lox-1: the multifunctional receptor underlying cardiovascular dysfunction.* Circ J. 73(11): p. 1993-9.

131. Oka, K., T. Sawamura, K. Kikuta, S. Itokawa, N. Kume, T. Kita, and T. Masaki (1998), *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 95(16): p. 9535-40.
132. Okumura, T. and G.A. Jamieson (1976), *Platelet glycoprotein. I. Orientation of glycoproteins of the human platelet surface*. J Biol Chem. 251(19): p. 5944-9.
133. Parthasarathy, S., D.J. Printz, D. Boyd, L. Joy, and D. Steinberg (1986), *Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor*. Arteriosclerosis. 6(5): p. 505-10.
134. Podrez, E.A., T.V. Byzova, M. Febbraio, R.G. Salomon, Y. Ma, M. Valiyaveetil, E. Poliakov, M. Sun, P.J. Finton, B.R. Curtis, J. Chen, R. Zhang, R.L. Silverstein, and S.L. Hazen (2007), *Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype*. Nat Med. 13(9): p. 1086-95.
135. Podrez, E.A., E. Poliakov, Z. Shen, R. Zhang, Y. Deng, M. Sun, P.J. Finton, L. Shan, M. Febbraio, D.P. Hajjar, R.L. Silverstein, H.F. Hoff, R.G. Salomon, and S.L. Hazen (2002), *A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions*. J Biol Chem. 277(41): p. 38517-23.
136. Poston, R.N., D.O. Haskard, J.R. Coucher, N.P. Gall, and R.R. Johnson-Tidey (1992), *Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques*. Am J Pathol. 140(3): p. 665-73.
137. Rajavashisth, T.B., A. Andalibi, M.C. Territo, J.A. Berliner, M. Navab, A.M. Fogelman, and A.J. Lusis (1990), *Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins*. Nature. 344(6263): p. 254-7.
138. Rehm, H. (2006), *Proteinbiochemie/Proteomics*. 5., erw. und überarb. Aufl. ed., Heidelberg: Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag. 381 S.
139. Reiner, Z. and E. Tedeschi-Reiner (2001), *[New information on the pathophysiology of atherosclerosis]*. Lijec Vjesn. 123(1-2): p. 26-31.
140. Relou, A.M., G. Gorter, H.J. van Rijn, and J.W. Akkerman (2002), *Platelet activation by the apoB/E receptor-binding domain of LDL*. Thromb Haemost. 87(5): p. 880-7.
141. Ricciarelli, R., C. D'Abramo, J.M. Zingg, L. Giliberto, W. Markesbery, A. Azzi, U.M. Marinari, M.A. Pronzato, and M. Tabaton (2004), *CD36 overexpression in human brain correlates with beta-amyloid deposition but not with Alzheimer's disease*. Free Radic Biol Med. 36(8): p. 1018-24.
142. Romo, G.M., J.F. Dong, A.J. Schade, E.E. Gardiner, G.S. Kansas, C.Q. Li, L.V. McIntire, M.C. Berndt, and J.A. Lopez (1999), *The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin*. J Exp Med. 190(6): p. 803-14.
143. Ross, R. (1976), *Atherosclerosis: the role of endothelial injury, smooth muscle proliferation and platelet factors*. Triangle. 15(2-3): p. 45-51.
144. Ross, R. (1979), *Platelets: cell proliferation and atherosclerosis*. Metabolism. 28(4 Suppl 1): p. 410-4.

145. Ross, R., J. Glomset, and L. Harker (1977), *Response to injury and atherogenesis*. Am J Pathol. 86(3): p. 675-84.
146. Ross, R. and J.A. Glomset (1976), *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)*. N Engl J Med. 295(7): p. 369-77.
147. Ross, R. and J.A. Glomset (1976), *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts)*. N Engl J Med. 295(8): p. 420-5.
148. Ruggeri, Z.M. (2002), *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med. 8(11): p. 1227-34.
149. Santoso, S., U.J. Sachs, H. Kroll, M. Linder, A. Ruf, K.T. Preissner, and T. Chavakis (2002), *The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1*. J Exp Med. 196(5): p. 679-91.
150. Sato, T., H. Thorlacius, B. Johnston, T.L. Staton, W. Xiang, D.R. Littman, and E.C. Butcher (2005), *Role for CXCR6 in recruitment of activated CD8+ lymphocytes to inflamed liver*. J Immunol. 174(1): p. 277-83.
151. Savill, J., N. Hogg, and C. Haslett (1991), *Macrophage vitronectin receptor, CD36, and thrombospondin cooperate in recognition of neutrophils undergoing programmed cell death*. Chest. 99(3 Suppl): p. 6S-7S.
152. Sawamura, T., N. Kume, T. Aoyama, H. Moriwaki, H. Hoshikawa, Y. Aiba, T. Tanaka, S. Miwa, Y. Katsura, T. Kita, and T. Masaki (1997), *An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein*. Nature. 386(6620): p. 73-7.
153. Scanu, A.M. and C. Edelstein (2008), *HDL: bridging past and present with a look at the future*. FASEB J. 22(12): p. 4044-54.
154. Seizer, P., K. Stellos, G. Selhorst, B.F. Kramer, M.R. Lang, M. Gawaz, and A.E. May (2011), *CXCL16 is a novel scavenger receptor on platelets and is associated with acute coronary syndrome*. Thromb Haemost. 105(6): p. 1112-4.
155. Shah, P.K., E. Falk, J.J. Badimon, A. Fernandez-Ortiz, A. Mailhac, G. Villareal-Levy, J.T. Fallon, J. Regnstrom, and V. Fuster (1995), *Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture*. Circulation. 92(6): p. 1565-9.
156. Sharron, M., S. Pohlmann, K. Price, E. Lolis, M. Tsang, F. Kirchhoff, R.W. Doms, and B. Lee (2000), *Expression and coreceptor activity of STRL33/Bonzo on primary peripheral blood lymphocytes*. Blood. 96(1): p. 41-9.
157. Shashkin, P., B. Dragulev, and K. Ley (2005), *Macrophage differentiation to foam cells*. Curr Pharm Des. 11(23): p. 3061-72.
158. Shashkin, P., D. Simpson, V. Mishin, B. Chesnutt, and K. Ley (2003), *Expression of CXCL16 in human T cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 23(1): p. 148-9.
159. Sheikine, Y., C.S. Bang, L. Nilsson, A. Samnegard, A. Hamsten, L. Jonasson, P. Eriksson, and A. Sirsjo (2006), *Decreased plasma CXCL16/SR-PSOX concentration is associated with coronary artery disease*. Atherosclerosis. 188(2): p. 462-6.

160. Sheikine, Y. and A. Sirsjo (2008), *CXCL16/SR-PSOX--a friend or a foe in atherosclerosis?* *Atherosclerosis*. 197(2): p. 487-95.
161. Shimaoka, T., N. Kume, M. Minami, K. Hayashida, H. Kataoka, T. Kita, and S. Yonehara (2000), *Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages.* *J Biol Chem*. 275(52): p. 40663-6.
162. Shimaoka, T., T. Nakayama, N. Fukumoto, N. Kume, S. Takahashi, J. Yamaguchi, M. Minami, K. Hayashida, T. Kita, J. Ohsumi, O. Yoshie, and S. Yonehara (2004), *Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells.* *J Leukoc Biol*. 75(2): p. 267-74.
163. Shimaoka, T., T. Nakayama, N. Kume, S. Takahashi, J. Yamaguchi, M. Minami, K. Hayashida, T. Kita, J. Ohsumi, O. Yoshie, and S. Yonehara (2003), *Cutting edge: SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates bacterial phagocytosis by APCs through its chemokine domain.* *J Immunol*. 171(4): p. 1647-51.
164. Siegel-Axel, D., K. Daub, P. Seizer, S. Lindemann, and M. Gawaz (2008), *Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis.* *Cardiovasc Res*. 78(1): p. 8-17.
165. Siegel-Axel, D., H. Langer, S. Lindemann, and M. Gawaz (2006), *[Role of platelets in atherosclerosis and inflammation].* *Med Klin (Munich)*. 101(6): p. 467-75.
166. Siess, W., K.J. Zangl, M. Essler, M. Bauer, R. Brandl, C. Corrinth, R. Bittman, G. Tigyi, and M. Aepfelbacher (1999), *Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions.* *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(12): p. 6931-6.
167. Silverstein, R.L. (2009), *Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36.* *Cleve Clin J Med*. 76 Suppl 2: p. S27-30.
168. Silverstein, R.L. and M. Febbraio (2000), *CD36 and atherosclerosis.* *Curr Opin Lipidol*. 11(5): p. 483-91.
169. Silverstein, R.L. and M. Febbraio (2009), *CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior.* *Sci Signal*. 2(72): p. re3.
170. Smith, C., B. Halvorsen, K. Otterdal, T. Waehre, A. Yndestad, B. Fevang, W.J. Sandberg, U.M. Breland, S.S. Froland, E. Oie, L. Gullestad, J.K. Damas, and P. Aukrust (2008), *High levels and inflammatory effects of soluble CXC ligand 16 (CXCL16) in coronary artery disease: down-regulatory effects of statins.* *Cardiovasc Res*. 79(1): p. 195-203.
171. Statistisches Bundesamt Deutschland, *Todesursachen in Deutschland 2010*, in Fachserie 12. 2010, Statistisches Bundesamt Deutschland: Wiesbaden. p. 43.
172. Steinberg, D. (1990), *Arterial metabolism of lipoproteins in relation to atherogenesis.* *Ann N Y Acad Sci*. 598: p. 125-35.
173. Swerlick, R.A., K.H. Lee, T.M. Wick, and T.J. Lawley (1992), *Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein*

- endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro.* J Immunol. 148(1): p. 78-83.
174. Tabata, S., N. Kadowaki, T. Kitawaki, T. Shimaoka, S. Yonehara, O. Yoshie, and T. Uchiyama (2005), *Distribution and kinetics of SR-PSOX/CXCL16 and CXCR6 expression on human dendritic cell subsets and CD4+ T cells.* J Leukoc Biol. 77(5): p. 777-86.
 175. Tandon, N.N., R.H. Lipsky, W.H. Burgess, and G.A. Jamieson (1989), *Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36).* J Biol Chem. 264(13): p. 7570-5.
 176. Tao, N., S.J. Wagner, and D.M. Lublin (1996), *CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails.* J Biol Chem. 271(37): p. 22315-20.
 177. Tenger, C., A. Sundborger, J. Jawien, and X. Zhou (2005), *IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN-gamma and CXCL16 expression independently of T cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25(4): p. 791-6.
 178. Tontonoz, P., L. Nagy, J.G. Alvarez, V.A. Thomazy, and R.M. Evans (1998), *PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL.* Cell. 93(2): p. 241-52.
 179. Valiyaveetil, M. and E.A. Podrez (2009), *Platelet hyperreactivity, scavenger receptors and atherothrombosis.* J Thromb Haemost. 7 Suppl 1: p. 218-21.
 180. van der Wal, A.C., P.K. Das, A.J. Tigges, and A.E. Becker (1992), *Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions.* Am J Pathol. 141(6): p. 1427-33.
 181. van Lieshout, A.W., C. Popa, F. Meyer-Wentrup, H.L. Lemmers, A.F. Stalenhoef, G.J. Adema, P.L. van Riel, L.J. van Tits, and T.R. Radstake (2007), *Circulating CXCL16 is not related to circulating oxLDL in patients with rheumatoid arthritis.* Biochem Biophys Res Commun. 355(2): p. 392-7.
 182. Vassallo, R.R., Jr., T. Kieber-Emmons, K. Cichowski, and L.F. Brass (1992), *Structure-function relationships in the activation of platelet thrombin receptors by receptor-derived peptides.* J Biol Chem. 267(9): p. 6081-5.
 183. Wagsater, D., P.S. Olofsson, L. Norgren, B. Stenberg, and A. Sirsjo (2004), *The chemokine and scavenger receptor CXCL16/SR-PSOX is expressed in human vascular smooth muscle cells and is induced by interferon gamma.* Biochem Biophys Res Commun. 325(4): p. 1187-93.
 184. Watanabe, T. and J. Fan (1998), *Atherosclerosis and inflammation mononuclear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM-1/LFA-1 pathway in atherogenesis.* Int J Cardiol. 66 Suppl 1: p. S45-53; discussion S55.
 185. Wilbanks, A., S.C. Zondlo, K. Murphy, S. Mak, D. Soler, P. Langdon, D.P. Andrew, L. Wu, and M. Briskin (2001), *Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR ligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines.* J Immunol. 166(8): p. 5145-54.
 186. Wu, T., C. Xie, H.W. Wang, X.J. Zhou, N. Schwartz, S. Calixto, M. Mackay, C. Aranow, C. Putterman, and C. Mohan (2007), *Elevated*

- urinary VCAM-1, P-selectin, soluble TNF receptor-1, and CXC chemokine ligand 16 in multiple murine lupus strains and human lupus nephritis.* J Immunol. 179(10): p. 7166-75.
187. Wuttge, D.M., X. Zhou, Y. Sheikine, D. Wagsater, V. Stemme, U. Hedin, S. Stemme, G.K. Hansson, and A. Sirsjo (2004), *CXCL16/SR-PSOX is an interferon-gamma-regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 24(4): p. 750-5.
 188. Yamauchi, R., M. Tanaka, N. Kume, M. Minami, T. Kawamoto, K. Togi, T. Shimaoka, S. Takahashi, J. Yamaguchi, T. Nishina, M. Kitaichi, M. Komeda, T. Manabe, S. Yonehara, and T. Kita (2004), *Upregulation of SR-PSOX/CXCL16 and recruitment of CD8+ T cells in cardiac valves during inflammatory valvular heart disease.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 24(2): p. 282-7.
 189. Yanaba, K., E. Muroi, A. Yoshizaki, T. Hara, F. Ogawa, K. Shimizu, M. Yozaki, M. Hasegawa, M. Fujimoto, K. Takehara, and S. Sato (2009), *Serum CXCL16 concentrations correlate with the extent of skin sclerosis in patients with systemic sclerosis.* J Rheumatol. 36(9): p. 1917-23.
 190. Yi, G.W., Q.T. Zeng, X.B. Mao, M. Cheng, X.F. Yang, H.T. Liu, Y. Mao, M. Guo, Q.W. Ji, and Y.C. Zhong *Overexpression of CXCL16 promotes a vulnerable plaque phenotype in Apolipoprotein E-Knockout Mice.* Cytokine.
 191. Yla-Herttuala, S., B.A. Lipton, M.E. Rosenfeld, T. Sarkioja, T. Yoshimura, E.J. Leonard, J.L. Witztum, and D. Steinberg (1991), *Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions.* Proc Natl Acad Sci U S A. 88(12): p. 5252-6.
 192. Yla-Herttuala, S., M.E. Rosenfeld, S. Parthasarathy, C.K. Glass, E. Sigal, J.L. Witztum, and D. Steinberg (1990), *Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions.* Proc Natl Acad Sci U S A. 87(18): p. 6959-63.
 193. Yoshida, H., N. Kondratenko, S. Green, D. Steinberg, and O. Quehenberger (1998), *Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor.* Biochem J. 334 (Pt 1): p. 9-13.
 194. Zhao, B. (1996), *Role of lipoproteins in platelet activation.* Blood Coagul Fibrinolysis. 7(2): p. 270-3.
 195. Zhuge, X., T. Murayama, H. Arai, R. Yamauchi, M. Tanaka, T. Shimaoka, S. Yonehara, N. Kume, M. Yokode, and T. Kita (2005), *CXCL16 is a novel angiogenic factor for human umbilical vein endothelial cells.* Biochem Biophys Res Commun. 331(4): p. 1295-300.
 196. Zimman, A. and E.A. Podrez (2010), *Regulation of platelet function by class B scavenger receptors in hyperlipidemia.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 30(12): p. 2350-6.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Thrombozyten als Induktor der Atherosklerose. Modifiziert nach Langer/Gawaz	16
Abb. 2: Rolle von CXCL16/SR-PSOX in der Atherogenese. Modifiziert nach Sheikine/Sirsjö.....	26
Abb. 3A: Beispiel eines Histogramms. Native Thrombozyten.....	37
Abb. 3B: Beispiel eines Histogramms. Native, ungefärbte Thrombozyten	37
Abb. 4: Expression von CXCL16/SR-PSOX auf Thrombozyten	45
Abb. 5A: CXCL16 wird aktivierungsabhängig auf Thrombozyten exprimiert ...	47
Abb. 5B: CXCL16 wird aktivierungsabhängig auf Thrombozyten exprimiert ...	48
Abb. 6: Thrombozytäre Oberflächenbindung von Dil-oxLDL	50
Abb. 7: TRAP-aktivierte Thrombozyten binden Dil-oxLDL via CXCL16.....	51
Abb. 8: Aktivierte Thrombozyten binden an oxLDL-haltige Proteinmatrix.....	53
Abb. 9: Aktivierte Thrombozyten binden an oxLDL-haltige Proteinmatrix via CXCL16.....	54
Abb. 10: Beeinflussung der thrombozytären P-Selektin-Expression durch oxLDL-Bindung an CXCL16	56
Tab. 1: Thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren. Modifiziert nach Gawaz	13
Tab. 2: SR-Expression auf Thrombozyten. Modifiziert nach Siegel-Axel	17

8. Veröffentlichungen

In Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertationsschrift entstanden folgende Publikationen:

Seizer, P., Stellos, K., Selhorst, G., Kramer, B. F., Lang, M. R., Gawaz, M., May, A. E. (2011), *CXCL16 is a novel scavenger receptor on platelets and is associated with acute coronary syndrome*. Thromb Haemost 105(6): p. 1112-1114.

P. Seizer, K. Stellos, G. Selhorst, V. Mozes, V. Panagiota, J. Grimm, B. Krämer, O. Borst, M. Lang, B. Bigalke, M. Gawaz, A. May (2010), *CXCL16 is a novel scavenger receptor on platelets which expression is associated with acute coronary syndromes*. Clin Res Cardiol 99, Suppl 1.

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. Peter Seizer, dem Betreuer meiner Arbeit, und Herrn Prof. Dr. Andreas May, Leiter der Arbeitsgruppe, bedanken. Durch das Überlassen der interessanten experimentellen Thematik und durch die wissenschaftliche Unterstützung der Arbeit mit wertvollen Ratschlägen trugen beide maßgeblich zum Gelingen meiner Dissertation bei.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz für die von Ihm zur Verfügung gestellten Laboreinrichtungen und die dadurch geschaffenen hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere bei Frau Klaudia Posavec und Frau Hanna Schnell, für die große Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken.

Abschließend danke ich meinen Eltern für ihre Motivation, Unterstützung und ihr Vertrauen in mich und meine Arbeit.

10. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Gerhard Erich Maximilian Selhorst
geboren am 15. Juli 1983 in Regensburg
ledig

Ausbildung

Seit 03/2011	Assistenzarzt in der Klinik für Kardiologie und internistische Intensivmedizin, Städt. Klinikum München-Bogenhausen, Prof. Dr. E. Hoffmann
24.11.2010	Approbation als Arzt
12.11.2010	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung („sehr gut“)
08/2009 – 07/2010	Praktisches Jahr am Marienhospital Stuttgart (Anästhesiologie, Allgemein- und Thoraxchirurgie) und Inselspital Bern (Innere Medizin)
09/2007 – 12/2009	Wissenschaftliche Mitarbeit in der experimentellen Kardiologie/ Innere Medizin III – Kardiologie und Kreislauferkrankungen, Universitätsklinik Tübingen, Prof. Dr. A. E. May und Prof. Dr. M. Gawaz
2006 – 2010	Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen
4.10.2006	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung („sehr gut“)
2004 – 2006	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2002 – 2003	Zivildienst in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Regensburg
1993 – 2002	Albertus-Magnus-Gymnasium Regensburg (Abitur)

Auslandsaufenthalte

12/2009 – 04/2010	Schweiz: Inselspital Bern
03/2009	USA: Louisiana State University Hospital, New Orleans
09/2008	Schweiz: Unispital Zürich