

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

Untersuchungen zu Plättchen-Leukozyten- Aggregaten unter entzündlichen Bedingungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Talia Ahrazoglu

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. rer. nat. Sebastian Temme

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Gerdes

Eigene Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Ahrazoglu T, Kluczny JJ, Kleimann P, Irschfeld L-M, Nienhaus FT, Bönner F, Gerdes N, Temme S. **Design of a Robust Flow Cytometric Approach for Phenotypical and Functional Analysis of Human Monocyte Subsets in Health and Disease.** *Biomolecules*. 2024; 14(10):1251. <https://doi.org/10.3390/biom14101251>

Kongressbeiträge

Talia Ahrazoglu, Jennifer Isabel Kluczny, Tamara Straub, Fabian Nienhaus, Jonathan Rohrer, Patricia Kleimann, Lisa-Marie Irschfeld, Maren Döring, Ann Katrin Bergmann, Florian Bönner, Ulrich Flögel, Norbert Gerdes, Sebastian Temme. European Congress of Immunology (ECI), Dublin, Ireland, 2024. **Analysis of platelet monocyte complexes in patients with ST-elevation myocardial infarction.** Eur. J. Immunol. 2024. 54(Suppl. 1): 894 – P2.09.19, DOI: 10.1002/eji.202470200

Zusammenfassung

Monozyten tragen zur Immunabwehr von Pathogenen und zur Bekämpfung steriler Entzündlicher Erkrankungen bei. Die Funktionalität der Monozyten und auch der Monozytensubpopulationen kann durch eine Interaktion mit Thrombozyten beeinflusst werden, dies ist jedoch bisher wenig erforscht ist. Das Hauptziel dieser Arbeit war zum einen die Etablierung einer zuverlässigen Untersuchungsweise der Monozyten-Plättchen-Aggregate (MPAs) mittels Durchflusszytometrie und die anschließende Exploration unterschiedlicher phänotypischer und funktioneller Aspekte dieser, insbesondere die Expression von Oberflächenrezeptoren und die Fähigkeit zur Phagozytose. In einem weiteren Schritt wurde analysiert, inwieweit sich die Ausbildung der Monozyten-Plättchen-Aggregate und die zuvor genannten funktionellen Aspekte in einer entzündlichen Situation verändern könnten.

Als erstes wurden drei verschiedene Methoden zur Darstellung der Monozytensubpopulationen anhand Blutproben gesunder junger Spender erprobt. Zuerst wurden die Proben gegen CD11b, CD14 und CD16 gefärbt. Ein alternativer Versuchsansatz ergänzte diese mit einer Färbung der Proben gegen CD3, CD209 und CD19. Bei diesen beiden Strategien zeigte sich jedoch eine Kontamination der nicht-klassischen Monozyten mit NK-Zellen. Eine weitere Färbung gegen CD11b, CD14, CD16 und MHC-II ermöglichte eine zuverlässige und kontaminationsfreie Darstellung der drei Monozytensubpopulationen, sodass diese Strategie im Folgenden genutzt wurde. Mit einer zusätzlichen Färbung der Blutproben gegen den CD41 konnten dann mit Plättchen assoziierte Monozyten dargestellt werden. Zudem wurden sowohl Plättchen als auch Monozyten auf ihre Expression von Oberflächenrezeptoren im unstimulierten und stimulierten Zustand untersucht. Es zeigte sich ein Anstieg der Expression von P-Selektin auf der Oberfläche der Plättchen nach Stimulation mit Adenosindiphosphat (APD), während die Expression von PSGL-1 auf der Oberfläche der Monozyten nach einer Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) abnahm. Zur Analyse der Phagozytosefähigkeit von Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregaten wurden Lipidnanopartikel genutzt, welche von den Monozyten aufgenommen und so durchflusszytometrisch detektiert werden können. Es konnte eine Zunahme der Phagozytose von Lipidnanopartikeln von plättchengebundenen Monozyten festgestellt werden. Die Aufnahme von Lipidnanopartikeln konnte auch fluoreszenzmikroskopisch am Modell der THP-1 Zellen nachgewiesen werden. Zur Simulation entzündlicher Bedingungen wurden Blutproben mit LPS stimuliert. Die Einteilung der Monozytensubpopulationen mit CD14 und CD16 zeigte sich hier jedoch nicht anwendbar, da sowohl CD14 als auch CD16 starken Veränderungen nach Stimulation mit LPS unterliegen, sodass eine alternative Markierung gegen CCR2 und MHC-II zur Darstellung der Subpopulationen gewählt wurde. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der Subpopulationen nach LPS-Stimulation detektiert werden. Die Aggregatbildung und Aufnahme von Lipidnanopartikeln zeigten sich nach LPS-Stimulation abgeschwächt.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass der Einsatz von CD11b, CD14, CD16 und MHC-II eine präzise Darstellung von Monozytensubpopulationen und damit auch der Monozyten-Plättchen-Aggregate erlaubt. Dies ermöglicht die präzise phänotypische und funktionelle Untersuchung dieser Zellen. Monozyten-Plättchen-Aggregate von jungen gesunden Spendern unterscheiden sich nicht hinsichtlich der Expression von Oberflächenrezeptoren, jedoch weisen sie eine höhere Aufnahme von Lipidnanopartikeln auf. Mit der entwickelten Darstellungsmethode der Monozyten und MPAs lassen sich in Zukunft Monozyten und MPAs bei entzündlichen Erkrankungen untersuchen, um deren Rolle bei der Pathogenes aufzuklären.

Summary

Monocytes contribute to the immune defense against pathogens and to the fight against sterile inflammatory diseases. The functionality of monocytes and monocyte subpopulations is influenced, among other things, by interaction with platelets, which has been little researched to date. The main objective of this work was to establish a reliable method for investigating monocyte-platelet aggregates using flow cytometry and to subsequently explore various functional aspects of these aggregates, in particular the expression of surface receptors and the ability to phagocytose. In a further step, we analyzed the extent to which the formation of monocyte-platelet aggregates and the aforementioned functional aspects could change in an inflammatory situation.

First, three different methods for representing monocyte subpopulations in the blood of healthy young donors were tested. First, the samples were stained against CD11b, CD14, and CD16. An alternative experimental approach supplemented this with staining of the samples against CD3, CD209, and CD19. These two strategies revealed contamination of non-classical monocytes with NK cells. A different staining against CD11b, CD14, CD16, and MHC-II enabled reliable and contamination-free visualization of the three monocyte subpopulations, therefore this strategy was used in the following. With additional staining of the blood samples against CD41, platelet-bound monocytes could be visualized. In addition, both platelets and monocytes were examined for their expression of surface receptors in unstimulated and stimulated states. An increase in the expression of P-selectin on the surface of platelets was observed after stimulation with adenosine diphosphate (APD), while the expression of PSGL-1 on the surface of monocytes decreased after stimulation with lipopolysaccharide (LPS). Lipid nanoparticles were used to analyze the phagocytic capacity of monocytes and monocyte-platelet aggregates, which can be taken up by monocytes and thus detected by flow cytometry. An increase in the phagocytosis of lipid nanoparticles by platelet-bound monocytes was observed. The uptake of lipid nanoparticles was also detected by fluorescence microscopy in the THP-1 cell model. To simulate inflammatory conditions, blood samples were stimulated with LPS. However, the classification of monocyte subpopulations with CD14 and CD16 was not applicable here, as both CD14 and CD16 undergo significant changes after stimulation with LPS, so an alternative marker against CCR2 and MHC-II was chosen to represent the subpopulations. No significant differences in the distribution of subpopulations after LPS stimulation could be detected. Aggregation and uptake of lipid nanoparticles were attenuated after LPS stimulation.

Based on the results of this study, it can be concluded that the use of CD11b, CD14, CD16, and MHC-II allows for a precise representation of monocyte subpopulations and thus also of monocyte-platelet complexes, enabling further phenotypic and functional investigations. Monocyte-platelet aggregates from young healthy donors do not differ in terms of surface receptor expression, but they do show higher uptake of lipid nanoparticles. Based on these results, monocyte-platelet aggregates could play a crucial role in the pathogenesis and control of various diseases.

Abkürzungsverzeichnis

Einheiten

%	Prozent
°C	Grad Celcius
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
h	Stunde
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer

Weitere Abkürzungen

A	Atto
ACD	<i>acid citrate dextrose</i>
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
APC	Allophycocyanin
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DLS	dynamische Lichtstreuung
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Tetranatriumsalz Dihydrat
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
MHC-II	<i>major histocompatibility complex II</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IL	Interleukin
INF	Interferon
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MPA	Monozyten-Plättchen-Aggregat
MPS	mononukleares Phagozytensystem
n	Probenzahl
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
o.g.	oben genannt
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFC	Perfluorkarbon-Nanoemulsion

PFCE	Perfluor-15-kronen-5-ether
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PrP	plättchenreiches Plasma
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Standardabweichung
SSC	side scatter
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	<i>toll-like</i> Rezeptor
u.a.	unter anderem
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	3
1.1 Monozyten und Monozytensubpopulationen.....	3
1.2 Thrombozyten	6
1.3 Monozyten-Plättchen-Aggregate	6
1.4 Durchflusszytometrie	8
2 Zielsetzung.....	8
3 Material	9
3.1 Geräte und Apparaturen	9
3.2 Verbrauchsmaterialien	9
3.3 Chemikalien	10
3.4 Puffer und Medien.....	11
3.5 Antikörper.....	12
3.6 Software und Statistik	13
4 Methoden.....	13
4.1 Gewinnung der Blutproben	13
4.2 Aufbereitung und Antikörpermarkierung der Blutproben zur Detektion der Monozyten	13
4.3 Untersuchung von Monozyten-Plättchen-Aggregaten.....	14
4.4 Analyse der Expression von Oberflächenrezeptoren auf Monozyten	14
4.5 PFC-Aufnahme der Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregate.....	14
4.6 Zellkultur.....	16
4.7 Aufbereitung von Thrombozyten aus humanem Vollblut	16
4.8 Interaktion von THP-1 Zellen mit Thrombozyten	17
4.9 Anfertigung fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von THP-1 Zellen und Plättchen	18
4.10 Stimulation der Monozyten mit LPS	19
5 Ergebnisse	21
5.1 Darstellung humaner Monozyten und ihrer Subpopulationen	21
5.2 Analyse von Monozyten-Plättchen-Aggregaten aus dem Blut gesunder Spender	24
5.3 <i>In vitro</i> Interaktion von THP-1 Zellen mit Plättchen	26
5.4 Funktionelle Untersuchungen zu Monozyten-Plättchen-Aggregaten	28
5.5 LPS-Stimulation zur Simulation entzündlicher Bedingungen.....	36

6	Diskussion	41
6.1	Durchflusszytometrische Darstellung von Monozyten und ihren Subpopulationen	42
6.2	Identifizierung potenzieller Interaktionspartner in der Bildung von Monozyten-Plättchen-Aggregaten	44
6.3	Phagozytose von Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregaten	47
6.4	Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregate unter entzündlichen Bedingungen	49
6.5	Schlussfolgerungen und Ausblick	51
7	Literaturverzeichnis	53
8	Abbildungsverzeichnis	62
9	Tabellenverzeichnis	64
10	Danksagung	66

1 Einleitung

1.1 Monozyten und Monozytensubpopulationen

Monozyten bilden zusammen mit Makrophagen und dendritischen Zellen das mononukleäre Phagozytensystem (MPS), welches eine maßgebliche Rolle im Rahmen der Infektabwehr spielt¹, aber auch an der Bekämpfung unterschiedlicher steriler Entzündungen, wie z.B. ischämische Erkrankungen oder Traumata, beteiligt ist². Monozyten werden, wie andere Blutzellen auch, im Knochenmark gebildet und zirkulieren anschließend im peripheren Blut, bis sie im Falle einer Entzündung oder Erkrankung in das betroffene Gewebe rekrutiert werden³.

Ein wichtiges Ziel der Monozyten und des MPS besteht darin die Endorganschäden im Rahmen eines entzündlichen Prozesses im Körper zu minimieren¹. Um dieses Ziel zu erreichen, kommen verschiedene Mechanismen zum Einsatz. Zum einen dienen Monozyten als Vorläuferzellen für gewebespezifische Makrophagen oder dendritische Zellen⁴. Monozyten nehmen aber auch eine Zwischenstellung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem ein⁵, indem sie beispielsweise Antigene prozessieren und präsentieren können⁶, allerdings wird die konkrete Beteiligung der Monozyten an diesem Mechanismus weiterhin diskutiert⁷. Monozyten beteiligen sich auch direkt an der Phagozytose, was ihre Bedeutung als erste immunologische Instanz bei Entzündung und Verletzung unabdingbar macht, denn der Prozess der Phagozytose eignet sich gut zum direkten Internalisieren und Abtöten von Erregern⁸.

Jedoch sind Monozyten eine heterogene Zellpopulation, welche in verschiedene Subpopulationen mit Unterschieden hinsichtlich der Größe, Morphologie und Funktion eingeteilt werden kann¹. Die heutzutage gängigste Unterteilung der Monozyten findet ihren Ursprung in den 1980er Jahren, als Passlick et al. die unterschiedliche Verteilung hinsichtlich der Expression von CD14 und CD16 auf der Oberfläche der humanen Monozyten beschrieben⁹. Beim Menschen handelt es sich bei CD14 um einen Co-Rezeptor für LPS, während CD16 einen IgG-Rezeptor mit geringer Affinität darstellt¹. Seither werden drei Subpopulationen der Monozyten definiert: die CD14⁺⁺/CD16⁻ klassischen Monozyten, die CD14⁺⁺/CD16⁺ intermediären Monozyten, sowie die CD14⁻/CD16⁺ nicht-klassischen Monozyten¹. Die klassischen Monozyten machen beim Menschen etwa 80-95% aller Monozyten aus, während intermediäre Monozyten 2-8% einnehmen und der Anteil nicht-klassischer Monozyten sich auf etwa 2-11% beläuft⁵.

Vinci et al. haben 2021 von einer neuen, vierten Monozytensubpopulationen berichtet, welche als prä-klassisch bezeichnet wurde und vermehrt bei Patienten mit einem Nicht-ST-Hebungs-Infarkt detektiert wurde¹⁰. Die Population der prä-klassischen Monozyten ist jedoch derzeit kein Bestandteil der gängigen Verteilung der Monozytensubpopulationen.

1.1.1 Funktionelle Unterschiede der Monozytensubpopulationen

Die Monozytensubpopulationen unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer Funktionen. Klassische Monozyten sind primär an der Phagozytose beteiligt^{5,11}. Zudem sind sie auch bei der Wundheilung und Blutgerinnung von Bedeutung¹². Im Falle einer Entzündung oder Verletzung werden klassische Monozyten an das betroffene Gewebe rekrutiert, wo sie dann anschließend in dendritische Zellen oder gewebsspezifische Makrophagen, z.B. Alveolarmakrophagen in der Lunge, differenzieren können^{11,13}.

Dahingegen sind intermediäre Monozyten insbesondere für die Produktion von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verantwortlich und beteiligen sich zudem an der Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung^{5,11}. Auf der Oberfläche der CD16⁺ Monozyten findet sich unter allen Monozyten die größte Menge an MHC-II Molekülen, welches für die Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung unerlässlich ist^{1,14}. Nicht-klassische Monozyten produzieren größere Mengen an inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β infolge einer Stimulation mit LPS als klassische Monozyten¹². Zudem sind nicht-klassische Monozyten auch am Endothel zu finden, wo sie die Adhäsion und transendotheliale Migration unterstützen¹¹.

Es finden sich auch weitere Unterschiede bezüglich der Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren, so exprimieren klassische Monozyten die größte Menge an CCR2, CD36 und CD64 während intermediäre Monozyten, neben MHC-II, auch mehr CD86, CCR5 und CD74 auf ihrer Oberfläche besitzen^{12,11}. Verglichen mit den klassischen und intermediären Monozyten, exprimieren nicht-klassische Monozyten mehr CX3CR1 und CXCR4¹¹.

CCR2 auf der Oberfläche klassischer Monozyten ist von großer Bedeutung bei der Extravasation und Transmigration von Monozyten, beispielsweise im zentralen Nervensystem¹⁵. CD36 spielt eine entscheidende Rolle im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose, indem es oxidiertes LDL bindet und dadurch eine Immunreaktion induziert¹⁶. Zudem wird von einer vermehrten Expression von CD36 auf Monozyten im Rahmen der Artherosklerose berichtet, dies könnte eine Rolle bei der Ausbildung von Schaumzellen spielen¹⁷. Eine erhöhte Expression von CD64 auf der Oberfläche von Monozyten korreliert mit einem vermehrten Auftreten unterschiedlicher rheumatischer Erkrankungen, so zum Beispiel beim systemischen Lupus Erythematoses oder bei rheumatoider Arthritis^{18,19}. Obwohl die Rolle von CD86, einem co-stimulatorischen Molekül auf der Oberfläche der intermediären Monozyten noch nicht abschließend geklärt ist, konnte eine Untersuchung aus dem Jahre 2007 aufzeigen, dass Patienten auf Intensivstation mit reduzierter Expression von CD86 auf den Monozyten vermehrt an postinflammatorischer Immundefizienz leiden²⁰. Die Expression von CCR5 auf den Monozyten ist essentiell für die Migration der Monozyten in das betroffene entzündete Gewebe im Rahmen einer Sepsis und somit von entscheidender Bedeutung für die Bekämpfung einer Sepsis²¹. CD74 ist der Rezeptor für *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) und trägt somit zur Aktivierung von Monozyten und Makrophagen bei²². CX3CR1 hingegen ist für die Regulierung der Neovaskularisation zuständig²³. Bei durch Tabakrauch induziertem Lungenemphysem ist CX3CR1 auf den Monozyten außerdem an der Rekrutierung der Monozyten in die Lunge beteiligt²⁴. CXCR4 trägt eine wichtige Rolle im Rahmen eines Schlaganfalls, indem es die Monozyteninfiltration in das Gehirn nach einem Schlaganfall induziert²⁵.

Weiterhin beschrieben Patel et al. unterschiedliche Lebensspannen für die jeweiligen Monozytensubpopulationen im peripheren Blut. Klassische Monozyten zirkulieren etwa 24h im Blut, die überlebenden Zellen migrieren entweder in unterschiedliche Gewebe, z.B. in Lungengewebe um als Alveolarmakrophagen weiter Phagozytose zu betreiben²⁶ oder entwickeln sich zu intermediären Monozyten und zirkulieren für weitere vier Tage oder migrieren dann in Gewebe. Alle intermediären Monozyten differenzieren anschließend zu nicht-klassischen Monozyten und überleben für weitere sieben Tage bevor sie entweder sterben oder ebenfalls in Gewebe einwandern¹³. Im Falle einer Apoptose der Monozyten werden die apoptotischen Monozyten von

Makrophagen phagozytiert oder durchlaufen sekundär den Prozess der Nekrose²⁷. Eine Übersicht über die unterschiedlichen Attribute der verschiedenen Monozytensubpopulationen findet sich in Abbildung 1.

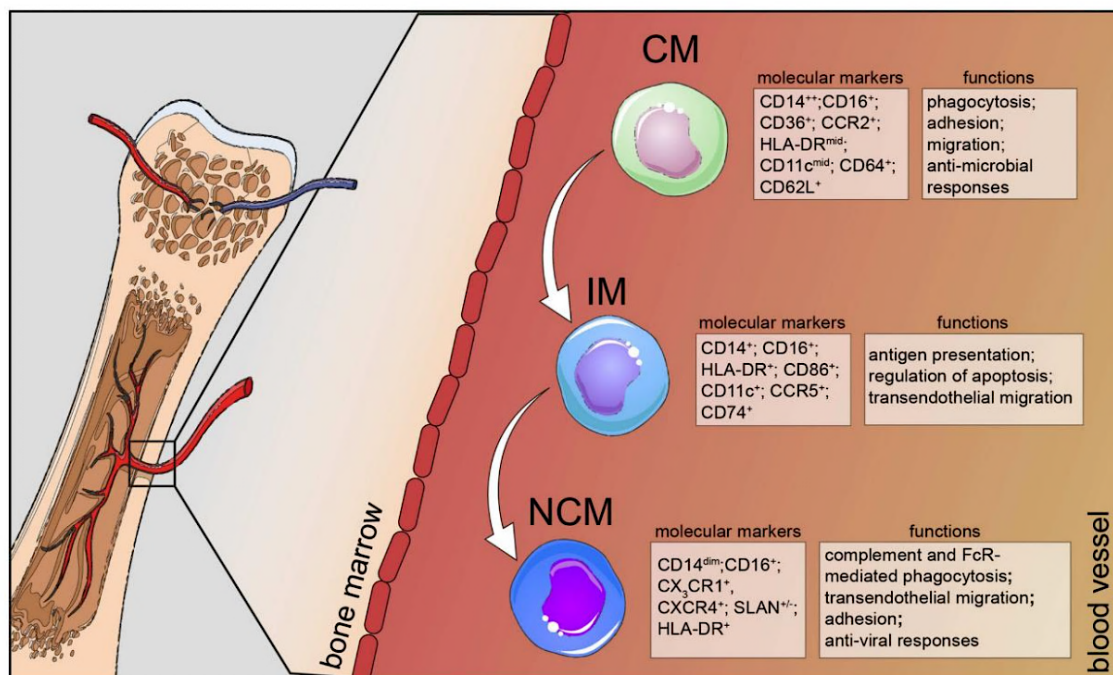


Abbildung 1: Entwicklung der Monozytensubpopulationen sowie ihre spezifischen Oberflächenrezeptoren und ihre Rolle im Organismus. Monozyten werden im Knochenmark entwickelt und anschließend als klassische Monozyten ins Blut ausgeschwemmt. Sie differenzieren dann zu intermediären Monozyten und anschließend zu nicht-klassischen Monozyten. Die klassischen Monozyten sind insbesondere für die Phagozytose und Migration der Monozyten zuständig, während die intermediären Monozyten an der Antigenpräsentation teilnehmen und die nicht-klassischen Monozyten sich an der anti-viralen Abwehr beteiligen. Diese Abbildung wurde aus Kapellos et al. entnommen¹¹.

1.1.2 Die Bedeutung der Monozyten bei unterschiedlichen Erkrankungen

Die Bedeutung der Monozyten in der Pathogenese und Bekämpfung des Organismus verschiedener Erkrankungen wird unter anderem bei kardiovaskulären Erkrankungen hervorgehoben²⁸. So konnte ein Zusammenhang zwischen den Lipidwerten im Blut und den zirkulierenden Monozyten festgestellt werden²⁹. Es wurden auch Veränderungen in der Verteilung der Monozytensubpopulationen beobachtet, in diesem Kontext wird besonders den intermediären Monozyten bei Artherosklerose, Myokardinfarkten und Herzinsuffizienz eine besondere Rolle zugeschrieben³⁰. Der genaue Mechanismus der Beteiligung der Monozyten an diesen Erkrankungen bleibt zum aktuellen Stand jedoch weitgehend ungeklärt. Ein zukünftiger Nutzen der Monozyten für diagnostische und therapeutische Zwecke bei kardiovaskulären Erkrankungen ist jedoch nicht auszuschließen.

Weiterhin sind Monozyten auch an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beteiligt. Sie können sowohl proinflammatorisch als auch antiinflammatorisch wirken indem sie beispielsweise die Gewebsdestruktion fördern (proinflammatorisch) oder die T-Zell-Proliferation inhibieren (antiinflammatorisch)³¹. Beim systemischen Lupus Erythematos wurde eine Verminderung der phagozytotischen Fähigkeit von Monozyten beobachtet³². Für rheumatische

Erkrankungen wird auch eine modulierende Wirkung der häufig zur Therapie genutzten Corticosteroiden auf die Monozyten spekuliert³³.

Eine besonders häufige und gefährliche Erkrankung ist die Sepsis. Jährlich sind weltweit 278-678/100.000 Personen betroffen, die Mortalität liegt hierbei bei 22,5-26,7%³⁴. Bei der Sepsis handelt es sich um eine Fehlregulation des Immunsystems als Antwort auf eine systemische Infektion, welche in einer Dysfunktion multipler Organsysteme bis zum Tod resultiert³⁵. Monozyten sind auch bei der Pathogenese und Bekämpfung der Sepsis beteiligt. Zum einen wechseln sie von einem proinflammatorischen Phänotypen in einen immunsupprimierenden Phänotypen und verstärken die Phagozytose und das Remodeling des Gewebes³⁶. Zum anderen werden sie durch eine vermehrte Expression von CCR5 stärker an den Infektherd rekrutiert, um dort die Erreger zu phagozytieren und zu töten²¹. Trotz dieser ersten Hinweise auf eine Beteiligung der Monozyten im Rahmen einer Sepsis ist der konkrete Mechanismus und die Tragweite der Beteiligung bislang weitgehend unerforscht. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sie ein therapeutisches Ziel in der Behandlung dieser tödlichen Erkrankung darstellen könnte.

1.2 Thrombozyten

Bei Thrombozyten handelt es sich um kernlose Zellen, die sich aus dem Zytoplasma ihrer Vorläuferzellen – den Megakaryozyten, die im Knochenmark entstehen – abschnüren und anschließend für zehn Tag im peripheren Blut zirkulieren^{37,38}. Plättchen sind für die primäre Hämostase essenziell. Im Falle einer Verletzung oder Entzündung kommt es zu einer GPIIb-vermittelten Adhäsion der Plättchen an den von-Willebrand-Faktor, welcher wiederum die Interaktion zwischen den Thrombozyten und dem subendothelialen Kollagen ermöglicht^{38,39}. Die endothelständigen Thrombozyten setzen ADP aus ihren Granula frei, welches an die P2Y₁₂-Rezeptoren anderer Thrombozyten binden kann, dies bewerkstelligt die weitere Entleerung der Granula, sodass verschiedene Botenstoffe, z.B. P-Selektin, frei werden³⁸. Im Anschluss erfolgt die Plättchenaggregation, bei der es durch die vernetzende Funktion des Fibrinogens zur Ausbildung eines stabilen Thrombus kommt⁴⁰.

Neben der klassischen Funktion der Plättchen im Rahmen der Hämostase, erfüllen sie auch zahlreiche weitere Funktionen. So exprimieren sie *pattern recognition receptors* (PRRs), insbesondere *toll-like receptors* (TLRs) sowohl auf ihrer Oberfläche als auch intrazellulär, welche durch PAMPs und DAMPs wie z.B. LPS aktiviert werden können^{41,42}. Über die TLRs können Plättchen den CD8⁺ T-Zellen auch Antigene präsentieren, sodass sie sich auch an der erworbenen Immunität beteiligen können⁴³. Thrombozyten exprimieren außerdem Zytokin- und Chemokin-Rezeptoren, beschrieben ist hier insbesondere die Expression vom IL-1-Rezeptor und TNF-Rezeptoren^{44,45}. Weiterhin können Thrombozyten mit anderen Immunzellen, wie z.B. neutrophilen Granulozyten, interagieren und so mitunter den Prozess der NETose induzieren⁴⁶.

1.3 Monozyten-Plättchen-Aggregate

Neben neutrophilen Granulozyten wird die Interaktion von Plättchen auch mit anderen Leukozyten, insbesondere Monozyten beschrieben. Diese Interaktion wird vornehmlich durch P-Selektin, welches sich auf der Oberfläche von Thrombozyten findet, ermöglicht⁴⁷. Unter allen Leukozyten weisen Monozyten die höchste Affinität für P-Selektin auf der Oberfläche der Plättchen auf und binden an PSGL-1, welches auf ihrer Zelloberfläche exprimiert wird⁴⁷. Es wird

angenommen, dass die Bindung zwischen Monozyten und Plättchen infolge entzündlicher Stimuli erfolgt, beispielsweise im Rahmen einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* oder dem *human immunodeficiency virus*⁴⁸.

Neben P-Selektin und PSGL-1 sind auch diverse andere Zelladhäsionsmoleküle an der Interaktion zwischen Monozyten und Thrombozyten beteiligt. Die Bindung von P-Selektin mit PSGL-1 ermöglicht mitunter die Aktivierung von Mac-1 und LFA-1 seitens der Monozyten⁴⁷, welche beide an ICAM-1 auf der Oberfläche der Thrombozyten binden können⁴⁹. Plättchen exprimieren außerdem CD40L, welches an Mac-1 auf der Oberfläche der Monozyten binden kann⁵⁰. Die für die Interaktion zwischen Monozyten und Thrombozyten relevanten Adhäsionsrezeptoren und -liganden sind in Abbildung 2 veranschaulicht.

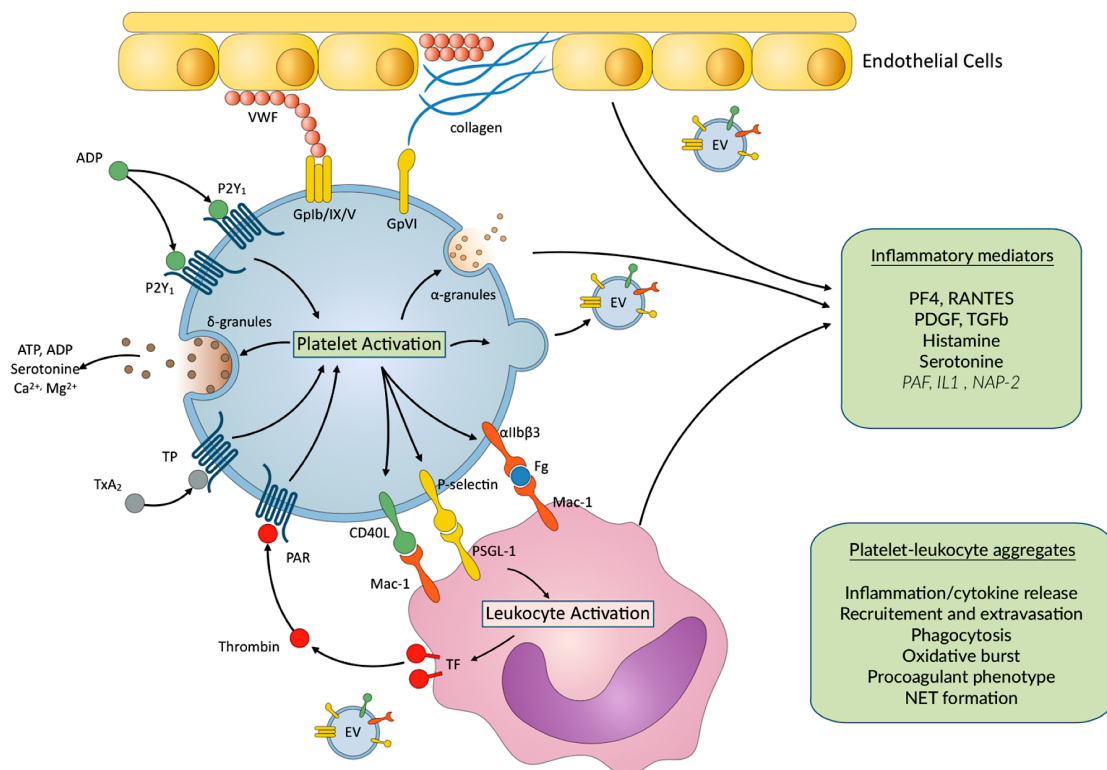


Abbildung 2: Interaktion zwischen Plättchen und Leukozyten. Die Bindung wird insbesondere durch die Interaktion von P-Selektin seitens der Plättchen an PSGL-1 auf den Leukozyten ermöglicht. Beteiligt sind außerdem Mac-1, CD40L, LFA-1 und ICAM-1. Dargestellt sind außerdem die Mediatoren, die im Rahmen der Interaktion zwischen Plättchen und Leukozyt freigesetzt werden. Bemerkenswert ist hier insbesondere die Freisetzung von ADP und Calcium zu weiteren Plättchenaktivierung, sowie die Sekretion diverser Mediatoren und Zytokine seitens der Leukozyten. Diese Abbildung wurde aus Mansour et al. (2020)⁴⁷ entnommen.

1.3.1 Bedeutung von Monozyten-Plättchen-Aggregaten bei entzündlichen Erkrankungen

Die Relevanz von Monozyten-Plättchen-Aggregaten wird insbesondere im Rahmen von Infekten, z.B. mit *Mycobacterium tuberculosis*, deutlich⁵¹. Im Allgemeinen resultiert die Interaktion von Thrombozyten mit Leukozyten in der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, sowie die Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-10, IL-6, IL-1β oder TNF-α⁵². Die Bindung von PSGL-1 an P-Selektin ermöglicht die Aktivierung von NF-κB, sodass proinflammatorische Gene der Monozyten aktiviert und so proinflammatorische Zytokine produziert und sezerniert

werden⁵³. Weiterhin wird durch die Interaktion von Plättchen mit Monozyten die Extravasation bzw. Transmigration von Monozyten ermöglicht⁵², wodurch eine vaskuläre Inflammation initiiert wird und Monozyten zu Makrophagen differenzieren⁴⁷. Die Interaktion von Plättchen mit neutrophilen Granulozyten hat u.a. eine verbesserte Phagozytose und NETose zur Folge^{52,54}. Außerdem bewirkt die Interaktion mit Thrombozyten eine Differenzierung der Monozyten in proatherogene Makrophagen⁵⁵. Auch die Funktion der Thrombozyten wird von der Interaktion mit Leukozyten beeinflusst, indem die Expression des *tissue factors* gesteigert wird, sodass die Koagulation und Thrombenbildung verbessert wird⁴⁷.

Neben Infekten wurde eine Veränderung der Plättchen-Leukozyten-Aggregate auch im Rahmen von Myokardinfarkten beobachtet⁵⁶. So konnten Kamińska et al. (2019) einen Anstieg der Monozyten-Plättchen-Aggregate bei ST-Hebungs-Infarkten nachweisen⁵⁷. Auch bei Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise beim systemischen Lupus Erythematoses, konnte ein Anstieg der Monozyten-Plättchen-Aggregate beobachtet werden⁵⁸. Ein ähnlicher Anstieg der Aggregate lässt sich auch bei Patienten mit Nierenversagen bzw. im Zuge einer Hämodialyse finden^{59,60}. Trotz der beobachteten erhöhten Level an Aggregaten bleibt die pathologische Relevanz der Aggregate bislang jedoch unklar.

1.4 Durchflusszytometrie

Die Methode der Wahl, die in dieser Arbeit zur Analyse von Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregaten genutzt wurde, ist die Durchflusszytometrie. Hierbei handelt es sich um eine Möglichkeit Zellpopulationen schnell und zuverlässig anhand ihrer qualitativen und quantitativen Charakteristika einzuteilen⁶¹. Die Zellen werden durch eine schmale Kapillare geführt und passieren hierbei einen Laserstrahl, welcher anhand des Streulichtes der Zellen und des Fluoreszenzsignales Informationen zur Größe, Granularität und zu den Fluoreszenz-markierten Oberflächenrezeptoren der Zellen tätigen kann⁶². Es werden zwei Arten von Streulicht unterschieden. Der *forward scatter* (FSC) korreliert mit der Größe der Zellen und entsteht durch Umlenken des Laserstrahls an der Zelloberfläche⁶³. Der *side scatter* (SSC) entsteht durch Beugung an inneren Zellmembranen oder am Zellkern und entspricht somit der Granularität der Zelle⁶³. Zusätzlich können Zellen zuvor mit Fluoreszenz-gebundenen Antikörpern markiert werden, sodass unterschiedliche Oberflächenrezeptoren auf den Zellen untersucht werden können⁶¹.

Der große Vorteil der Durchflusszytometrie ist die schnelle Analyse größerer Zellpopulationen hinsichtlich mehrerer Parameter gleichzeitig⁶⁴. Zudem handelt es sich um eine Methode, die bereits Einzug in den klinischen Alltag, z.B. im Rahmen der Lymphom-Diagnostik, gefunden hat⁶⁵. Allerdings gibt es bei der Durchflusszytometrie auch einige Nachteile, insbesondere die starke Untersucherabhängigkeit, die zu teils stark variablen Ergebnissen führen kann, ist eine große Herausforderung, welche auch im Rahmen dieser Arbeit thematisiert wird⁶⁴.

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertation soll zunächst herausgefunden werden, wie Monozyten und ihre Subpopulationen möglichst präzise durchflusszytometrisch dargestellt werden können. Dies soll dann als Grundlage dienen, um Monozyten-Plättchen-Aggregate hinsichtlich ihrer Verteilung zu untersuchen. Anschließend sollen einige funktionelle Aspekte der Monozyten und Monozyten-

Plättchen-Aggregate genauer beurteilt werden. Hierzu gehört zum einen die Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren (CD11b, CD18, LFA-1, ICAM-1, CD40 und PSGL-1), sowie die Phagozytose von Nanopartikeln. Diese Untersuchungen werden neben humanen Monozyten auch an THP-1 Zellen als Modell für Monozyten durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden dann als Grundlage genutzt, um LPS-stimulierte Monozyten hinsichtlich derselben Aspekte zu untersuchen und vergleichen.

3 Material

3.1 Geräte und Apparaturen

Tabelle 1: Geräte und Apparaturen

Gerät	Hersteller, Typenbezeichnung
Analysenwaage	Ohaus Europe (Greifensee, Schweiz), PA214
Brutschrank	Binder GmbH (Tuttlingen, Deutschland), CB 170
Disperiergerät	IKA Werke (Staufen, Deutschland), T18
Durchflusszytometer	BD Bioscience (San José, USA), FACSVerse™
Fluoreszenzmikroskop	Olympus Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland), BX61
Hochdruckhomogenisator	Microfluidizer (Newton, USA), LV1
Inkubator	Memmert (Schwabach, Deutschland), INB200 Heidolph (Schwabach, Deutschland), Inkubator 1000
Magnetrührer	IKA Werke (Staufen, Deutschland), RCT basic
Partikelgrößen-Analysator	Microtrac (Retsch GmbH, Haan, Deutschland), Nanotrac Wave II
pH-Meter	Knick (Berlin, Deutschland), 766 Calimatic
Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Stauschlauch	Prämeta (Troisdorf, Deutschland)
Ultraschallbad	Bandelin (Berlin, Deutschland), Somorex RK 100 H
Vortex	VWR International (Darmstadt, Deutschland) VWR International (Radnor, Pennsylvania, USA)
Zentrifugen	Universal 320 R, Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Deutschland) Rotanta 460 R, Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Deutschland) Centrifuge 5424 R, Eppendorf AG (Hamburg, Germany) Centrifuge 5810, Eppendorf AG (Hamburg, Germany)

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
24-Well-Platten	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
96-Well-Platten	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
<i>Butterfly</i>	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)

<i>Butterfly</i> -Aufsatz	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Citrat-Blutentnahmeröhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Cryoröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Deckgläser 12 mm	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
EDTA-Blutentnahmeröhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Heparin-Blutentnahmeröhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Objektträger (Polylysine)	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Spritzen (Omnifix-F, 10 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Stripetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturflasche (75 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zentrifugen-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

3.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie	Molekulargewicht [g/mol]	Hersteller
Adenosindiphosphat	427,2	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Albumin Fraktion V > 98%	66.000	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Atto 488 DPPE (Bis(diphenylphosphino)ethan)	-	Atto-Tec GmbH (Siegen, Deutschland)
Citronensäure	210,14	Merck (Darmstadt, Deutschland)
D-Glucose	180,16	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	350,25	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dimethylsulfoxid	78,13	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) ≥ 99%	416,2	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
FBS (Fetal bovine serum) Supreme	-	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
Formaldehyd-Lösung 4% phosphatgepuffert	-	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Glucose 200 g/L	-	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
Kaliumchlorid	74,56	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

LPS	-	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
Natriumchlorid	58,44	VWR Chemicals (Radnor, Pennsylvania, USA)
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	-	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
Perfluor-15-kronen-5-ether	580,07	fluorochem (Hadfield, UK)
Rhodamin-DSPE (1,2-Diste- aroyl-sn-glycero-3-phos- phoethanolamin)	-	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
<i>Sodium Pyruvate Solution</i> 100 mM	-	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trinatriumdihydrat	294,10	Merck (Darmstadt, Deutschland)
WGA Alexa Fluor™ 594	-	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)

3.4 Puffer und Medien

Tabelle 4: Puffer und Medien

Puffer/Medium	Chemikalien oder Hersteller
ACD	eigene Herstellung enthält: 85 mM Trinatrium-Dihydrat 71 mM Citronensäure 110 mM D-Glucose gelöst in MilliQ™
DMEM	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland) 4,5 g/L Glucose 3,7 g/L NaHCO ₃
Erythrozytenlyse-Puffer (pH 7,4)	Herstellung in der Zentralapotheke des Universitätsklinikums Düsseldorf, 1 ml enthält: 8,29 mg Ammoniumchlorid 1,00 mg Kaliumhydrogencarbonat 0,0375 mg Natrium-EDTA
MACS-Puffer	eigene Herstellung enthält: 2 mM EDTA 0,5% BSA 500 ml PBS
Medium für THP-1-Zellen und humanes Blut	eigene Herstellung enthält: 10% FBS 1 mM Sodium Pyruvate 2,5 g/L Glucose Lösung 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

	500 ml RPMI 1640
PBS	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) 137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 10 mM Natriumdihydrogenphosphat 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat
Phosphat-Glycerol-Puffer (pH 7,4)	1 mM Phosphat 7 mM Dinatriumhydrogenphosphat 3 mM Natriumhydrogenphosphat 2,5% m/m Glycerol
RPMI 1640	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland) 2,0 g/L NaHCO ₃
Waschpuffer für Plättchen	eigene Herstellung enthält: 36 mM Citronensäure 103 mM Natriumchlorid 5 mM Kaliumchlorid 5 mM EDTA 5,6 mM D-Glucose gelöst in MilliQ™

3.5 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Verdün- nung	Hersteller
CD3	FITC	HIT3a	1:200	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD11b	APC	ICRF44	1:200	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD14	PE-Cyanine7	63D3	1:200	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD16	APC-Cyanine7	3G8	1:200	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD18	FITC	TS1/18	1:200	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD19	FITC	HIB19	1:200	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD40	APC	QA18A47	1:200	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD40L	FITC	24-31	1:200	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD41	Alexa Fluor™ 488	HIP8	1:200	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD41	PE	HIP8	1:200	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD41/CD61	Alexa Fluor™ 674	PAC-1	1:200	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD62P	PerCP	AK4	1:200	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD209	FITC	9E9A8	1:200	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
HLA-DR	PerCP	L243	1:200	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
ICAM-1	Alexa Fluor™ 488	HA58	1:200	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)

LFA-1	Alexa Fluor™ 488	m24	1:200	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
PSGL-1	APC	KPL-1	1:200	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)

3.6 Software und Statistik

Im Zuge dieser Arbeit wurden die Programme Microsoft Word 2019, Microsoft PowerPoint 2019 und Microsoft Excel 2019 genutzt. Bei dem in dieser Arbeit genutzten Durchflusszytometer handelt es sich um ein BD FACS Verse™ (s. Tabelle 1) mit der korrespondierenden BD FACSuite™ Software V1.0.6. Die Analyse der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mittels FlowJo V10.8.1 (FlowJo, Ashland, USA). Die Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurde mit Fiji™ (Bethesda, Maryland, USA)⁶⁶ durchgeführt.

Die statistische Analyse erfolgte mittels GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Boston, USA). Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben. Die Normalverteilung der Werte wurde mithilfe eines Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Bei vorliegender Normalverteilung erfolgte die Anwendung eines t-Tests zum Vergleich zweier Gruppen. Bei nicht gegebener Normalverteilung wurde ein Mann-Whitney U Test durchgeführt. Signifikanz wurde definiert als p-Wert ≤ 0.05 : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4 Methoden

4.1 Gewinnung der Blutproben

Nach informierter und schriftlicher Zustimmung der Blutspender wurden 6 ml peripher, venöses Blut gesunder Spender durch sterile Punktion der *Vena mediana cubiti* mit einem 21G *Butterfly* in EDTA-Blutentnahmeröhrchen entnommen. Das Blut wurde umgehend mit 60 ml Lysepuffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

4.2 Aufbereitung und Antikörpermarkierung der Blutproben zur Detektion der Monozyten

Nachdem die Erythrozyten der Blutproben durch den Lysepuffer entfernt wurden, wurden die restlichen Blutzellen mit MACS-Puffer bei 300 x g für 5 Minuten gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in MACS-Puffer resuspendiert. Etwa $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden in ein Well einer 96-Well-Platte transferiert. Um die Monozyten durchflusszytometrisch zu analysieren, wurden drei verschiedene Antikörper-Kombinationen erprobt, welche in Tabelle 6 dargestellt sind. Die Antikörper wurden je 1:200 in MACS-Puffer verdünnt. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Zellen erneut mit MACS-Puffer bei 300 x g für 5 Minuten gewaschen und mit dem Lebend-Tot-Marker DAPI (1 µg/ml, verdünnt in MACS-Puffer) markiert.

Tabelle 6: Unterschiedliche Antikörperkombinationen zur Detektion von Monozytensubpopulationen.

Strategie A	CD11b (APC), CD14 (PE-Cyanine7), CD16 (APC-Cyanine7)
Strategie B	CD11b (APC), CD14 (PE-Cyanine7), CD16 (APC-Cyanine7), CD3/CD209/CD19 (alle FITC)

Strategie C	CD11b (APC), CD14 (PE-Cyanine7), CD16 (APC-Cyanine7), MHC-II (PerCP-Cyanine5.5)
--------------------	---

4.3 Untersuchung von Monozyten-Plättchen-Aggregaten

Um die Interaktion von Monozyten mit Plättchen zu analysieren, wurden die Proben wie in 4.2 erläutert verarbeitet. Zusätzlich zu den in Tabelle 6 beschriebenen Färbeschemata wurde je eine Markierung gegen CD41 (1:200 in MACS-Puffer) durchgeführt, um plättchengebundene Monozyten zu detektieren.

4.4 Analyse der Expression von Oberflächenrezeptoren auf Monozyten

Weiterhin sollte überprüft werden, ob eine unterschiedliche Verteilung verschiedener Oberflächenrezeptoren auf der Oberfläche der jeweiligen Monozytensubpopulationen, in je plättchengebundener und freier Form, festgestellt werden kann. Hierzu wurden die Monozytensubpopulationen wie in 4.2 erläutert aufbereitet und entsprechend der in Tabelle 6 dargestellten Strategie C markiert. Zusätzlich erfolgte je eine Markierung gegen CD11b, CD18, LFA-1, ICAM-1, CD40 oder PSGL-1 (je 1:200 in MACS-Puffer verdünnt).

4.5 PFC-Aufnahme der Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregate

Perfluorkarbon-Nanoemulsionen wurden in dieser Arbeit zur Ermittlung der Phagozytosefähigkeit genutzt. Es handelt sich hierbei um fluoreszenzmarkierte Nanopartikel, die von den phagozytierenden Zellen aufgenommen werden und durchflusszytometrisch ermittelt werden können.

4.5.1 Herstellung der Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs)

Die Herstellung der PFCs erfolgte mittels Hochdruckhomogenisation. Es wird zunächst eine Voremulsion hergestellt, deren Zusammensetzung aus Tabelle 7 entnommen werden kann. E80S Lipide wurden in Phosphatglycerolpuffer aufgelöst. Anschließend wurden Atto488-markierte Lipide hinzugegeben. Nachdem die Lipide sich aufgelöst haben, wurde Perfluoro-15-kronen-5-ether hinzugegeben. Die Voremulsion wurde mittels Dispergiergerät für drei Minuten homogenisiert. Zum Schluss folgte die Hochdruckhomogenisation mittels Mikrofluidisierung für fünf Zyklen bei 1000 bar. Die fertigen PFCs wurden lichtgeschützt bei -20°C gelagert.

Tabelle 7: Zusammensetzung der ^{A488}PFCs.

Perfluoro-15-kronen-5-ether	Lipid E80S [100 mg/ml]	Atto-488 DPPE	Phosphatglycerolpuffer
20%	35 mM	100 mg	auffüllen auf 5g

Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der PFC-Aufnahme wurden Rhodamin-PFCs (^{Rh}PFCs) genutzt, die Komponenten dieser sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Zusammensetzung der ^{Rho}PFCs.

Perfluoro-15-kro- nen-5-ether	Lipoid E80S [100 mg/ml]	Rho-DSPE	Phosphatglycerol- puffer
20%	35 mM	100 mg	auffüllen auf 5g

4.5.2 Charakterisierung der PFCs mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS)

Um die Qualität der hergestellten PFCs zu überprüfen, wurden diese mittels dynamischer Lichtstreuung hinsichtlich ihres hydrodynamischen Durchmessers, Polydispersitätsindex und Zeta-Potenzials charakterisiert. Es wurden für jede Art von PFCs drei Messungen mit je zehn Messzyklen durchgeführt. Aus diesen Ergebnissen wurden die Mittelwerte für jedes der o.g. Qualitätskriterien berechnet. Die Ergebnisse dieser Messungen wurden in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Charakterisierung der PFCs mittels dynamischer Lichtstreuung.

	Hydrodynamischer Durchmesser d [nm]	Polydispersitätsindex (PDI)	Zeta-Potenzial [mV]
^{A488} PFCs	184,7	0,21	-36,5
^{Rho} PFCs	172,1	0,07	-48,1

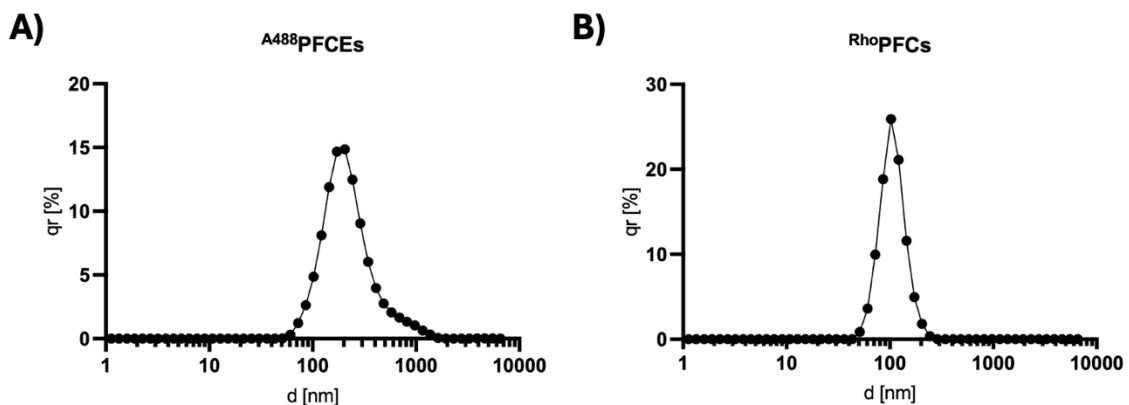


Abbildung 3: Graphische Darstellung des hydrodynamischen Durchmessers der ^{A488}PFCs (A) und ^{Rho}PFCs (B).

4.5.3 Anfertigung der Proben zur PFC-Aufnahme

Die aus dem Blut gesunder Spender nach 4.2 aufbereiteten Monozyten wurden in 1 ml Kulturmedium der THP-1 Zellen (RPMI mit Zusätzen, s. Tabelle 4) resuspendiert. 2 µl der ^{A488}PFCs wurden hinzugefügt. Die Zellen wurden anschließend für 20 Minuten bei 37°C unter Bewegung lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 300 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und mit MACS-Puffer gewaschen, bevor sie mit Antikörpern, wie in 4.2 beschrieben, markiert wurden.

Die Anwendung der ^{Rho}PFCs zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der PFC-Aufnahme wird detailliert in 4.9.1 beschrieben.

4.6 Zellkultur

Um die Interaktion zwischen Monozyten und Plättchen auch in einem *in vitro* Modell nachvollziehen zu können, wurden THP-1 Zellen, eine menschliche monozytäre Zelllinie aus dem Blut eines Leukämie-Patienten, genutzt.

4.6.1 Zellzahl

Die Anzahl der THP-1 Zellen wurde mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden hierzu 1:1 mit Trypanblau gefärbt, 10 µl der gefärbten Zellen wurden in die Zählkammer übertragen. Es wurden vier große Quadrate ausgezählt und -gewertet, dazu wurde der Mittelwert der vier Quadrate berechnet und mit zwei und 10^4 multipliziert, um die Zellzahl/ml zu bestimmen.

4.6.2 Kultivierung der THP-1 Zellen

Die THP-1 Zellen wurden in 20 ml Zellkulturmedium in einer T75 Flasche bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zusammensetzung des Zellkulturmediums ist in Tabelle 4 beschrieben. Die Zellen wurden alle 24-48h nach Erreichen einer Konzentration von etwa 10×10^5 Zellen/ml passagiert. Hierzu wurde der gesamte Inhalt der T75 Flasche in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden mit auf 37°C vorgewärmtem PBS gewaschen. Anschließend, wurde der Überstand erneut verworfen und die Zellen wurden in 20 ml vorgewärmten Zellkulturmedium resuspendiert und in eine neue T75 Flasche transferiert.

4.6.3 Einfrieren und Auftauen von THP-1 Zellen

Etwa 5×10^6 Zellen/ml wurden zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml 1:10 DMSO/FBS Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden in einem Cryoröhrchen zunächst für 24h bei -20°C gelagert, bevor sie dann bei -80°C für eine längerfristige Lagerung eingefroren wurden.

Zum Auftauen der THP-1 Zellen wurde Zellkulturmedium zunächst im Wasserbad auf 37°C erwärmt und in eine T75 Flasche gegeben. Anschließend wurde eines der bei -80°C gelagerten Cryoröhrchen ebenfalls erwärmt, sodass der Inhalt sich wieder verflüssigte. Die Zellen aus dem Cryoröhrchen wurden nun in die vorbereitete T75 Flasche übertragen, die Flasche wurde anschließend bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. 24 Stunden später erfolgte ein Mediumwechsel.

4.7 Aufbereitung von Thrombozyten aus humanem Vollblut

Um Plättchen aus humanem Vollblut zu isolieren, erfolgte zunächst eine Blutentnahme von peripher venösem Blut gesunder Spender in ein Citrat-Röhrchen. Das Röhrchen wurde bei 120 x g für 20 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand – das plättchenreiche Plasma (PrP) – wurde in ein Reaktionsgefäß transferiert und 10% v/v ACD wurden hinzugegeben. Das PrP wurde für 10 Minuten bei 2000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Waschpuffer für Plättchen (siehe Tabelle 4) resuspendiert und wieder für 10 Minuten bei 2000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert.

4.7.1 Aktivierung von Thrombozyten

Die aufbereiteten Plättchen wurden anschließend in zwei verschiedene Ansätze aufgeteilt und in je 1 ml MACS-Puffer resuspendiert. Einer der beiden Ansätze enthielt zusätzlich 1 μM ADP, der andere wurde als Kontrolle ohne ADP mitgeführt. Beide Ansätze wurden für 5 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend bei 2000 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und abschließend erneut mit dem Waschpuffer für Plättchen gewaschen.

4.7.2 Antikörpermarkierung der Thrombozyten

Die Plättchen wurden, je 1:200 in Waschpuffer verdünnt, gegen CD41, P-Selektin, ICAM-1, CD40L und GPIIb/IIIa markiert. Hierzu wurde je ein unstimulierter Ansatz als Kontrolle, sowie ein mit ADP stimulierter Ansatz (s. Abschnitt 4.7.1) gefärbt und untersucht. Eine ungefärbte, unstimulierte Kontrolle wurde ebenfalls durchflusszytometrisch untersucht.

4.8 Interaktion von THP-1 Zellen mit Thrombozyten

Die THP-1 Zellen sollten nun mit Plättchen zusammengegeben werden, um so die Interaktion der Monozyten mit Thrombozyten zu simulieren und die Aggregatbildung der Zellen durchflusszytometrisch zu untersuchen. Hierzu wurden THP-1 Zellen im 2:1 Verhältnis mit Plättchen nach der in 4.7 beschriebenen Aufbereitung in MACS-Puffer gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden bei 300 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde das THP-1-Plättchen-Gemisch gegen CD41 gefärbt (1:200 in MACS-Puffer verdünnt) und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und abschließend mit dem Lebend-Tot-Marker DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, verdünnt in MACS-Puffer) markiert.

4.8.1 Einfluss des Aktivierungsstatus auf die Interaktion von THP-1 Zellen mit Plättchen

Um den Einfluss des Aktivierungsstatus auf die Aggregatbildung von THP-1 Zellen und Plättchen zu untersuchen, wurden die Zellen bevor sie zusammengegeben wurden mit LPS bzw. ADP stimuliert.

Die LPS-Stimulation der THP-1 Zellen erfolgte mit 1 ng/ml LPS im Kulturmedium der THP-1 Zellen (s. Tabelle 4) für 60 Minuten. Anschließend wurden die Zellen bei 300 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und in MACS-Puffer resuspendiert, um wie in 4.8 beschrieben mit den Plättchen zusammengegeben zu werden.

Die Aktivierung der Plättchen erfolgte mittels 1 μM ADP wie in 4.7.1 beschrieben. Die Zellen wurden wie folgt zusammengegeben und durchflusszytometrisch analysiert:

- THP-1 Zellen unstimuliert & Plättchen unstimuliert
- THP-1 Zellen unstimuliert & Plättchen stimuliert
- THP-1 Zellen stimuliert & Plättchen unstimuliert
- THP-1 Zellen stimuliert & Plättchen stimuliert

4.9 Anfertigung fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von THP-1 Zellen und Plättchen

Neben durchflusszytometrischen Analysen sollte die Interaktion von THP-1 Zellen (als Modell für Monozyten) mit Plättchen auch fluoreszenzmikroskopisch beleuchtet werden. Hierzu wurden Thrombozyten wie in 4.6 beschrieben aus dem Blut gesunder Spender isoliert und mit THP-1 Zellen im 2:1 Verhältnis in MACS-Puffer zusammengegeben (s. 4.8.1). Das Zellgemisch wurde für 15 Minuten inkubiert, bevor 50 µl THP-1-Plättchen auf einen L-Lysin-beschichteten Objektträger aufgetragen wurden. Zur Kontrolle wurden ebenfalls 50 µl THP-1 Zellen ohne Plättchen auf den Objektträger gegeben. Die Proben wurden auf 100 µl mit MACS-Puffer aufgefüllt und für 90 Minuten bei 37°C in feuchter Atmosphäre inkubiert. Im Anschluss wurden je 500 µl MACS-Puffer auf die Proben gegeben, der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden gegen CD41 (Alexa Fluor™ 488, 1:100 in MACS-Puffer verdünnt) gefärbt und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Es wurden erneut je 500 µl MACS-Puffer auf das Zellgemisch gegeben, der Überstand wurde verworfen. Als nächstes erfolgte die Fixierung der Zellen mittels 50 µl Paraformaldehyd, die Objektträger wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurden erneut je 500 µl MACS-Puffer auf die Proben gegeben und der Überstand wurde verworfen. Zum Schluss erfolgte die Färbung der Zellen mit WGA und DAPI (je 1:1000 in MACS-Puffer) zur Kenntlichmachung der Zellmembranen und -kerne. Die Zellen wurden erneut für 20 Minuten bei 4°C inkubiert, anschließend wurden wieder je 500 µl MACS-Puffer auf die Proben gegeben und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden abschließend mit 40 µl Mowiol und einem Deckgläschen eingedeckelt, eine Übersicht über die Anfertigung der Proben findet sich in Abbildung 4. Das Mikroskopieren der Zellen erfolgte am nächsten Tag.

Die Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgte mittels Fiji, wie in 3.6 beschrieben.

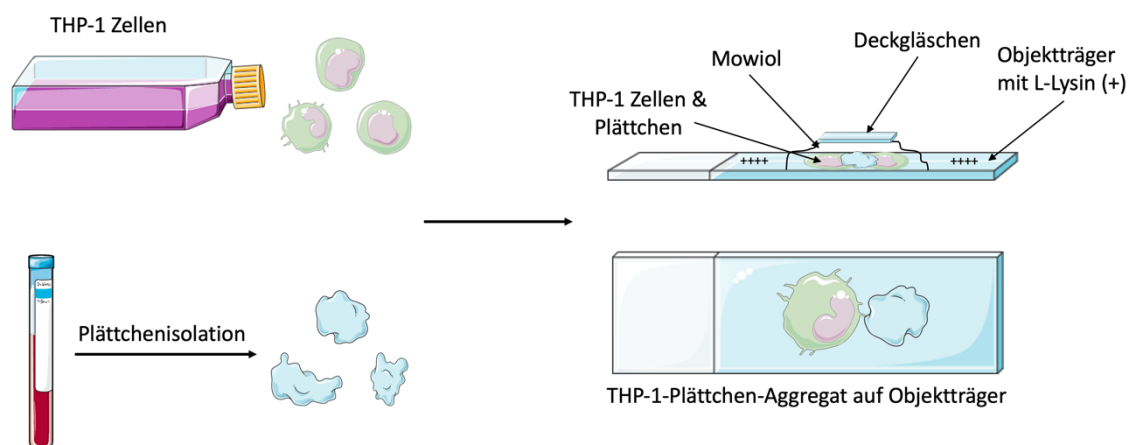


Abbildung 4: Vorbereitung der Zellen zur Fluoreszenzmikroskopie. THP-1 Zellen und Plättchen wurden gemeinsam auf einen L-Lysin-beschichteten Objektträger gegeben und gegen CD41 markiert. Eine Markierung der

Zellmembranen und -kerne erfolgte jeweils mittels WGA und DAPI. Die Zellen wurden mit Mowiol und einem Deckgläschen eingedeckelt. Diese Abbildung wurde mit BioRender (www.biorender.com) erstellt.

4.9.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der PFC-Aufnahme von THP-1 Zellen und Plättchen

Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der PFC-Aufnahme von THP-1 Zellen und Plättchen wurden Plättchen und THP-1 Zellen wie in 4.8 beschrieben aufbereitet und aufeinander gegeben. Das Zellgemisch wurde ein 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen und mit 100 μ l ^{Rho}PFCs inkubiert. Nach 20-minütiger lichtgeschützter, schwankender Inkubation bei 37°C wurden die Zellen bei 300 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und zweimal mit MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen wie in 4.9 erläutert auf die Objektträger aufgenommen. Zusätzlich zur Markierung gegen CD41 wurde auch eine Markierung gegen MHC-I (Alexa Fluor™ 488, 1:100 in MACS-Puffer verdünnt) durchgeführt. Auf eine Färbung mit WGA wurde verzichtet, da diese zu einer spektralen Überlappung mit den ^{Rho}PFCs geführt hätte.

4.10 Stimulation der Monozyten mit LPS

Um eine entzündliche Situation und die Auswirkungen dieser zu simulieren, wurde eine Stimulation der Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregate mit LPS vorgenommen. Die zuvor verwendeten Marker CD16 und CD14 erwiesen sich hierfür als untauglich, da die Inkubation und Stimulation die Expression maßgeblich veränderten. Aus diesem Grund wurde eine alternative Markierung gegen MHC-II und CCR2 untersucht.

Es wurde wie zuvor erläutert Blut gesunder Spender lysiert, aufbereitet und im Kulturmedium der THP-1 Zellen resuspendiert. Der Hälfte der Zellen wurde 1 ng/ml LPS zugesetzt. Eine Kontrolle, die weder inkubiert noch stimuliert wurde, wurde ebenfalls aufbereitet. Die Zellen wurden nach einer einstündigen Inkubation bei 300 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und mit MACS-Puffer gewaschen. Es erfolgte anschließend eine Antikörpermarkierung gegen CD11b, MHC-II und CCR2. Ebenso wurde eine Färbung gegen CD41 durchgeführt, um plättchengebundene Monozyten zu detektieren. Alle Antikörper wurden 1:200 verdünnt in MACS-Puffer. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen zentrifugiert und erneut gewaschen, bevor sie mit DAPI gefärbt wurden. Die Untersuchung der Zellen erfolgte ebenfalls mittels Durchflusszytometrie.

4.10.1 Funktionelle Analyse der Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregate nach LPS-Stimulation

Neben der Detektion der Subpopulationen und der Aggregate, wurden analog zur Analyse im Ruhezustand der Monozyten, auch die Oberflächenrezeptoren und die PFC-Aufnahme beleuchtet.

Die Analyse der Oberflächenrezeptoren erfolgte für die gesamte Monozytenpopulation ohne Einteilung in Subpopulationen. Die Zellen wurden wieder aus dem Blut gesunder Spender gewonnen, lysiert und aufbereitet, es wurden vier Ansätze mit LPS stimuliert, wobei jeweils eine unstimulierte Kontrolle mitgeführt wurde. Ebenso wurde ein Ansatz ganz ohne Inkubation und Stimulation untersucht. Eine durchflusszytometrische Untersuchung wurde je nach einer Stimulationszeit mit 1 μ g/ml LPS von 30, 60, 120 und 180 Minuten durchgeführt. Die

Antikörpermarkierung erfolgte gegen CD11b, CD18, LFA-1, ICAM-1, CD40 und PSGL-1. Nach der 20-minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Zellen zentrifugiert und mit MACS-Puffer gewaschen. Abschließend erfolgte die Markierung mit DAPI.

Die Analyse der PFC-Aufnahme erfolgte analog zum in 4.10 beschriebenen Versuchsaufbau. Jedoch erfolgte vor der Antikörpermarkierung die 20-minütige Inkubation der Monozyten im THP-1 Kulturmedium bei 37°C mit 2 µl ^{A488}PFCs, nach der Inkubationszeit wurden die Zellen dann zentrifugiert und gewaschen, bevor sie gegen CD11b, MHC-II, CCR2 und CD41 markiert wurden. Nach der Zentrifugation und weiteren Waschschritten erfolgte abschließend die Markierung der Zellen mit DAPI zur Lebend-Tot-Differenzierung.

5 Ergebnisse

5.1 Darstellung humaner Monozyten und ihrer Subpopulationen

Im ersten Schritt dieser Arbeit sollte die eindeutige durchflusszytometrische Identifikation von Monozyten und Monozytensubpopulationen aus dem Blut gesunder Spender etabliert werden. Monozyten lassen sich mithilfe von Antikörpern gegen die Oberflächenproteine CD14 und CD16 in drei Subpopulationen - klassische Monozyten ($CD14^{++}/CD16^{-}$), intermediäre Monozyten ($CD14^{+}/CD16^{+}$) und nicht-klassische Monozyten ($CD14^{-}/CD16^{++}$) - unterteilen. Um eine Färbe- und *Gating*-Strategie zu finden, die es ermöglicht Monozyten möglichst präzise von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten abzugrenzen, wurden drei verschiedene Strategien der FACS-Analyse miteinander verglichen.

Im ersten Ansatz (Strategie A) wurden Blutproben lediglich mit Antikörpern gegen CD11b, CD14 und CD16 gefärbt und DAPI wurde zur Markierung der toten Zellen verwendet. Dazu wurden im ersten *Gating*-Schritt die Zellen zunächst mithilfe der FSC-/SSC-Eigenschaften grob anhand ihrer Morphologie selektiert (Abbildung 5A, erste Abbildung). Dieses erste *Gate* wurde sehr großzügig gesetzt, um einen Verlust der Monozyten im weiteren Verlauf des *Gateings* zu minimieren. Aus dieser Population wurden anschließend $CD11b^{+}$ Zellen ausgewählt (Abbildung 5A, zweite Abbildung), um aus diesen Zellen die Monozytensubpopulationen anhand der CD14 und CD16 Expression darzustellen. Wie in Abbildung 1D ersichtlich, beträgt der Anteil der klassischen Monozyten nach Anwendung dieser *Gating*-Strategie 68,9% ($\pm 17,9$), während sich die intermediären und nicht-klassischen Monozyten auf 4,2% ($\pm 12,8$) und 3% ($\pm 2,2$) summieren. Mit dieser Strategie findet sich eine prominente $CD16^{+}/CD14^{-}$ Kontamination die einen Anteil von 12,9% ($\pm 8,4$) einnimmt.

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung von Monozyten bietet die Abgrenzung potenziell kontaminierender Populationen von der Monozyten-Population (Strategie B). Dazu wurden T-, B- und dendritische Zellen mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD3, CD19 und CD209 gefärbt (Abbildung 5B). Auch für diese *Gating*-Strategie wurden die Zellen zunächst grob anhand ihrer Morphologie im FSC und SSC abgegrenzt, daraufhin wurden die lebenden, $DAPI^{-}$ Zellen ausgewählt. Im Anschluss wurden $CD11b^{+}$, und $FITC^{+}$ Zellen gegenübergestellt (Abbildung 5B, zweite Abbildung), um T-, B- und dendritische Zellen von der weiteren Analyse auszuschließen. Auch hier wurden zuletzt von den verbleibenden Zellen die Monozytensubpopulationen durch die Darstellung von CD14 und CD16 abgebildet. Mit dieser *Gating*-Strategie beläuft sich der Anteil der klassischen Monozyten auf 59,1% ($\pm 11,6$). Die intermediären Monozyten betragen 2,6% ($\pm 1,9$) und die nicht-klassischen Monozyten nehmen 3,4% ($\pm 2,6$) ein. Wie auch schon bei Strategie A findet sich hier ein relevanter Anteil an kontaminierenden $CD16^{+}/CD14^{-}$ Zellen mit 18,7% ($\pm 3,9$).

Anhand der Ergebnisse aus Strategie A und B zeigte sich, dass in der CD14/CD16 Darstellung eine $CD11b^{+}$, $CD16^{+}$, aber $CD14^{-}$ Zellpopulation vorhanden ist. Da NK-Zellen zwar teilweise CD11b, aber keine MHC-II Moleküle exprimieren, wurde im nächsten Schritt eine Färbe- und *Gating*-Strategie nach Marimuthu et al. (2018) angewendet, bei der eine Färbung gegen MHC-II genutzt wurde, um natürliche Killerzellen und B-Zellen in zusätzlichen *Gating*-Schritten von den Monozyten zu trennen⁶⁷. Für die dritte Strategie wurde daher die Färbung gegen CD11b, CD14 und CD16

mit einer Färbung gegen MHC-II ergänzt. Die ersten *Gating*-Schritte entsprechen denen der Strategien A und B. Aus den CD11b⁺ Zellen wurden dann mittels CD14 und CD16 die Monozyten identifiziert (Abbildung 5C, dritte Abbildung). Von diesen Zellen wurde anschließend die Expression von CD16 gegen MHC-II gegeneinander überprüft, um so natürlichen Killerzellen (MHC-II⁻) auszuschließen (Abbildung 5C, vierte Abbildung). Im Anschluss wurden die übrigen Zellen zur Kontrolle auch gegen CD14 aufgetragen, sodass restliche B-Zellen ebenfalls ausgeschlossen werden konnten. Zuletzt wurden die Monozyten wieder entsprechend ihrer Subpopulationen mithilfe der Einteilung von CD14 und CD16 dargestellt. Bei der quantitativen Analyse, welche in Abbildung 1D dargestellt ist, ergibt sich ein Anteil der klassischen Monozyten von 87,3% ($\pm 5,9$), die intermediären Monozyten sind mit 6,2% ($\pm 2,8$) vertreten. Den geringsten Anteil nehmen die nicht-klassischen Monozyten mit 4,1% ($\pm 2,3$) ein. Die kontaminierende Zellpopulation beträgt hier lediglich 0,4% ($\pm 0,3$).

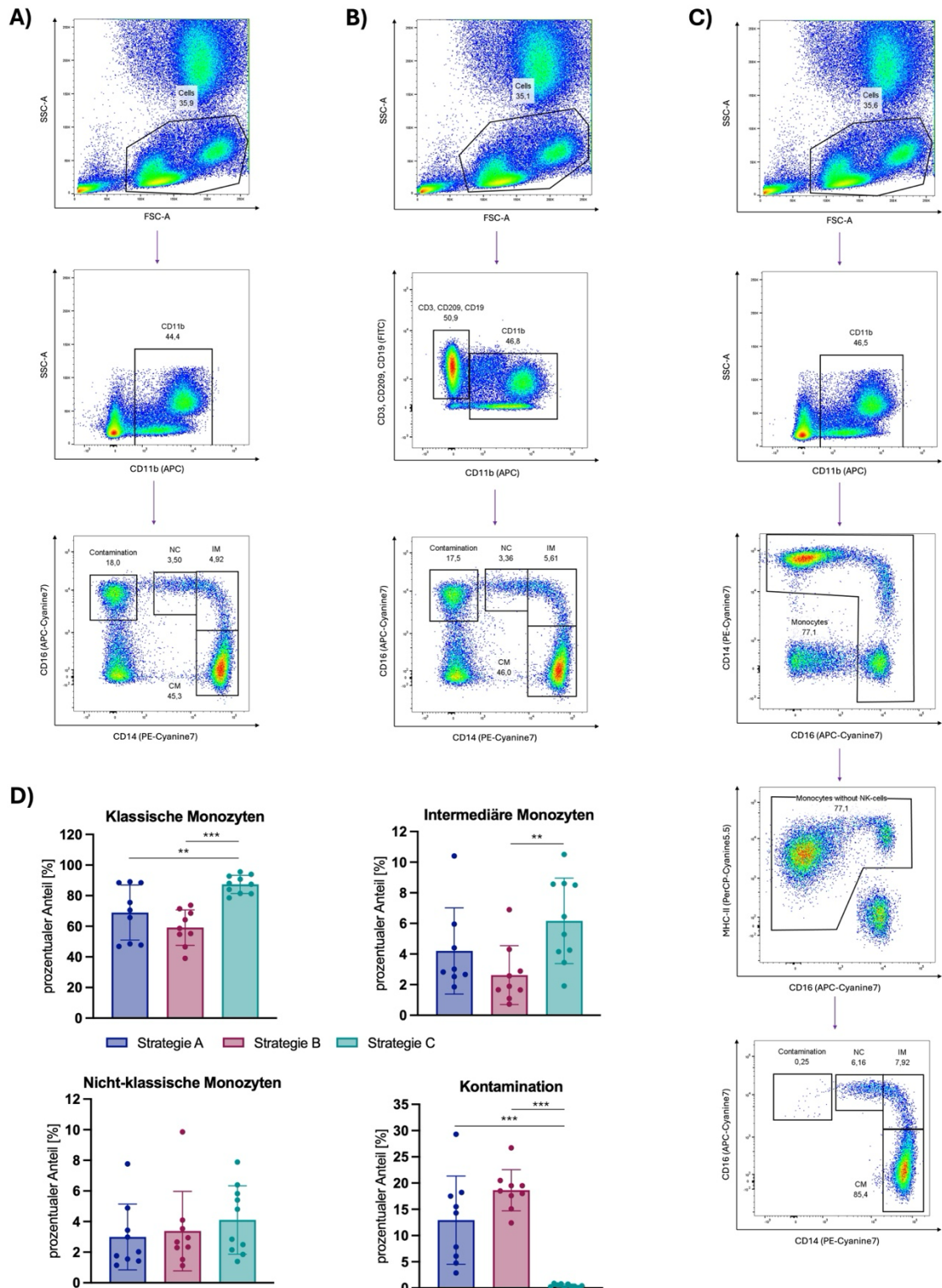


Abbildung 5: Durchflusszytometrische Ansätze zur Identifikation von Monozyten und deren Subpopulationen. Leukozyten aus humanem Vollblut gesunder Spender wurde mit unterschiedlichen Antikörperkombinationen inkubiert. In allen Ansätzen wurden die Zellen zudem mit DAPI gefärbt, um tote, DAPI⁺ Zellen von der Analyse auszuschließen. **A)** Färbung der Immunzellen mit Antikörpern gegen CD11b, CD14, CD16 zur Identifikation der Monozytensubpopulationen (KM = klassische Monozyten, IM = intermediäre Monozyten, NK = nicht-klassische Monozyten). **B)** Inkubation der Zellen mit FITC-markierten Antikörpern gegen CD3, CD19 und CD209 um T-, B- und dendritische Zellen auszuschließen. Die Färbung gegen CD11b, CD14/CD16 wurde anschließend zur Darstellung der Monozyten und deren Subtypen verwendet. **C)** Markierung der Leukozyten mit Antikörpern gegen CD11b zur groben Eingrenzung der Monozyten, CD16/CD14 zur differenzierteren Eingrenzung der Monozyten, MHC-II zum Abgrenzen der NK-Zellen und B-Zellen

von Monozyten und CD14/CD16 zur Einteilung der Monozytensubpopulationen. **D)** Vergleichende quantitative Analyse aller Gating-Strategien mit der relativen Menge aller Subpopulationen und der jeweiligen Kontamination. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=8-10. Aus Gründen der Leserlichkeit sind das DAPI-Gate, sowie die Abgrenzung der B-Zellen, nicht abgebildet. Die Normalverteilung der Werte wurde mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft, bei normalverteilten Werten erfolgte die Signifikanzanalyse mittels Mann-Whitney U Test. Statistische Signifikanz: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Abbildung modifiziert nach Ahrazoglu und Klucny et al. (2024)⁶⁸.

5.2 Analyse von Monozyten-Plättchen-Aggregaten aus dem Blut gesunder Spender

Die präzise Identifikation der Monozyten und ihrer Subpopulation stellt die Grundlage für weiterführende Untersuchungen der Monozyten und Monozytensubpopulationen dar. Dazu gehört unter anderem die Analyse der Monozyten-Plättchen-Aggregate. Diese umfasst zunächst eine Untersuchung der relativen Menge der plättchengebundenen Monozyten im Vergleich zu ungebundenen Monozyten im Blut gesunder Spender. Hierzu wurden die bereits unter 5.1 erläuterten *Gating*-Strategien angewendet. Zusätzlich zu CD11b, CD14, CD16 und MHC-II wurden die Zellen auch gegen den Thrombozytenmarker CD41 gefärbt, um mit Plättchen assoziierte Monozyten (CD41⁺) zu identifizieren.

Das *Gating* erfolgte wie in Abbildung 5 dargestellt, anschließend wurden aus jeder Monozyten-subpopulation die CD41⁺ Monozyten dargestellt. Das CD41-Gate wurde für alle der im folgenden erläuterten Strategien mittels FMO (*fluorescence minus one*)-Kontrollen determiniert. Wie in Abbildung 6 abgebildet, ergibt sich mit dieser *Gating*-Strategie ein Anteil von 12,9% ($\pm$ 5,6) klassischen MPAs. Die intermediären MPAs betragen 17,7% ($\pm$ 8,8) während die nicht-klassischen MPAs 8,7% ($\pm$ 2,7) ausmachen.

Mittels der zweiten Strategie, die CD3, CD209 und CD19 zur Abgrenzung anderer Zelltypen vorsieht, wird mit einer Färbung der Zellen gegen CD41 ein Anteil von 30,4% ($\pm$ 9,1) an klassischen MPAs erreicht, während es bei den intermediären MPAs 40,2% ($\pm$ 13,4) sind. Die nicht-klassischen MPAs summieren sich auf 42% ($\pm$ 23,2).

Infolge der Anwendung von MHC-II für eine kontaminationsfreie Darstellung der Monozyten-subpopulationen im Rahmen der dritten Strategie, wird mit einer Färbung der Zellen gegen CD41 einen Anteil von 31% ($\pm$ 6,2) für die klassischen MPAs erreicht. Die intermediären MPAs betragen ebenfalls 31% ($\pm$ 3,4), während die nicht-klassischen MPAs einen Anteil von 35,2% ($\pm$ 8,3) einnehmen.

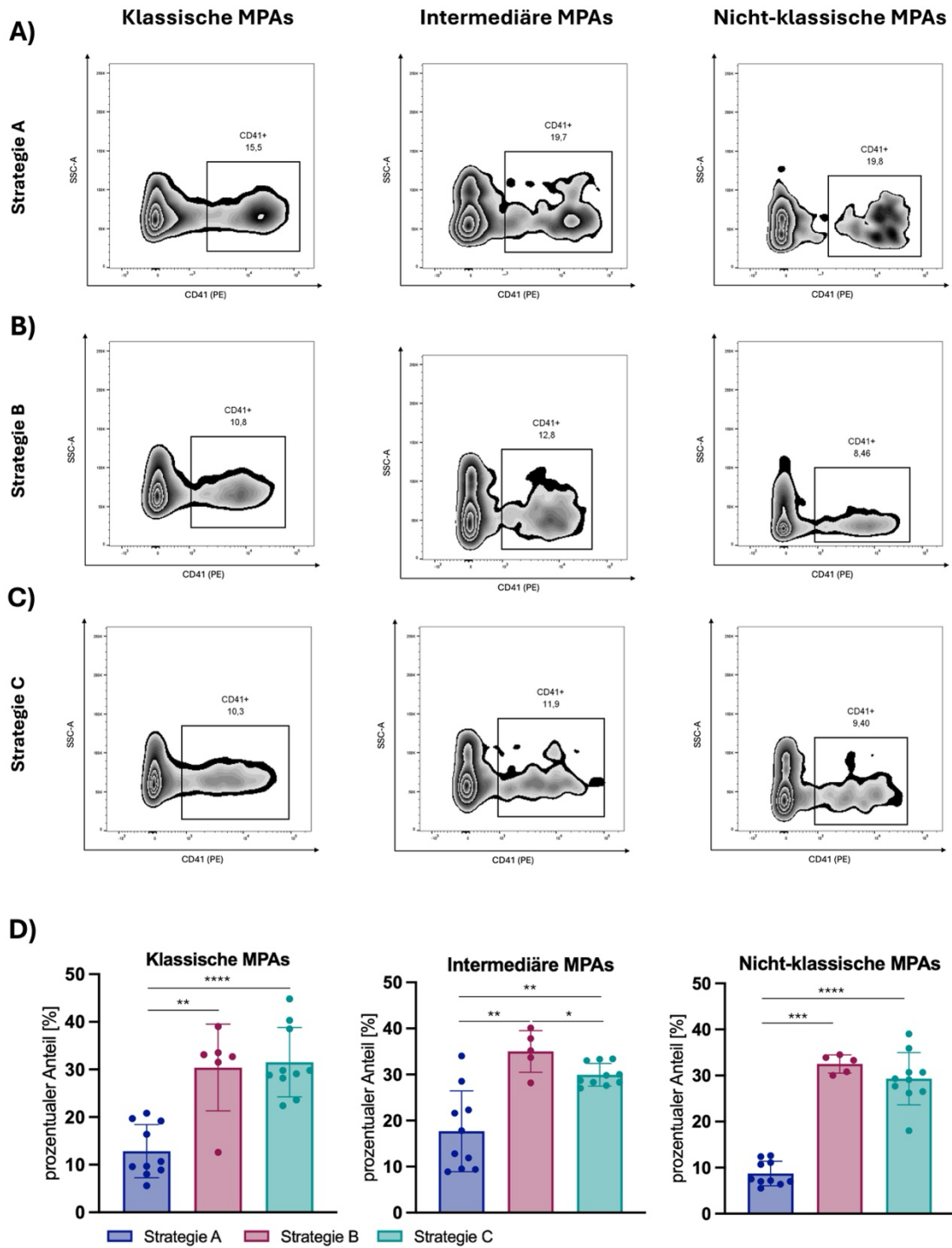


Abbildung 6: Darstellung von Monozyten-Plättchen-Aggregaten von Monozytensubpopulationen. Humane Immunzellen aus dem Blut gesunder Spender wurden mit drei unterschiedlichen Antikörperkombinationen gefärbt, um Monozyten und deren Subtypen zu identifizieren. Zudem wurden die Zellen mit CD41-Antikörpern inkubiert, um assoziierte Plättchen zu identifizieren. **A)** Färbung von CD11b, CD14, CD16 zur Identifikation der Monozytensubpopulationen zur anschließenden Darstellung aller CD41+ Monozyten. **B)** Verwendung FITC-markierter Antikörper gegen CD3-, CD19-, CD209 zur Eliminierung von T-, B-Zellen und dendritischen Zellen. Anschließend wurden Antikörper gegen CD14 und CD16 zur Darstellung von Monozyten-Subpopulationen verwendet, um die CD41+ Monozyten aus den Subpopulationen zu analysieren. **C)** Analyse der Monozyten-Plättchen-Aggregate für alle Monozytensubpopulationen nach Anwendung der MHC-II-Gating-Strategie und zusätzlicher Markierung der Zellen gegen CD41. **D)** Vergleichende quantitative Analyse der Monozyten-Plättchen-Aggregate in allen Monozytensubpopulationen. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=5-10. Die Normalverteilung der Werte wurde mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft, bei

normalverteilten Werten erfolgte die Signifikanzanalyse mittels Mann-Whitney U Test. Statistische Signifikanz: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.3 *In vitro* Interaktion von THP-1 Zellen mit Plättchen

Um die Interaktion zwischen Plättchen und Monozyten näher zu untersuchen, wurden THP-1 Zellen mit isolierten Plättchen inkubiert. Bei den THP-1 Zellen handelt es sich um eine humane monozytäre Zelllinie, die aus dem Blut von Leukämie-Patienten erzeugt wurde⁶⁹. Hierbei sollte analysiert werden, inwieweit der Aktivierungsstatus der THP-1 Zellen bzw. der Plättchen die Bildung der Aggregate beeinflusst. Aus diesem Grund wurden unstimulierte bzw. LPS-stimulierte THP-1 Zellen und unstimulierte bzw. ADP-stimulierte Plättchen aus dem peripher venösen Blut gesunder Spender miteinander kultiviert und durchflusszytometrisch untersucht. Eine Kontrolle, bei der die THP-1 Zellen ohne die Hinzugabe von Plättchen kultiviert wurden, wurde ebenfalls analysiert.

Für das *Gating* wurden die THP-1 Zellen zunächst grob anhand ihrer Morphologie in der FSC/SSC-Darstellung ausgewählt (Abbildung 7A, links), aus dieser Zellpopulation wurden tote Zellen (DAPI⁺) von der weiteren Analyse ausgeschlossen (Abbildung 7A, rechts). Daraufhin wurden diejenigen Zellen identifiziert, die den Plättchenmarker CD41 exprimieren (Abbildung 7A, rechte Reihe).

In Abbildung 7B sind verschiedene Kombinationen an THP-1 Zellen und Plättchen in unterschiedlichen Aktivierungsstadien abgebildet. In der oberen Reihe finden sich THP-1 Zellen mit unstimulierten Plättchen, in der unteren Reihe sind die Plättchen mit ADP aktiviert. Entsprechend sind auf der linken Seite die THP-1 Zellen unstimuliert und auf der rechten Seite mit LPS stimuliert. Der Anteil der CD41⁺ THP-1 Zellen, die je mit unstimulierten und stimulierten Plättchen behandelt wurden, ähnlich und beträgt etwa 37%. Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich auch nach LPS-Stimulation der THP-1 Zellen, nachdem sie mit unstimulierten bzw. stimulierten Plättchen inkubiert wurden.

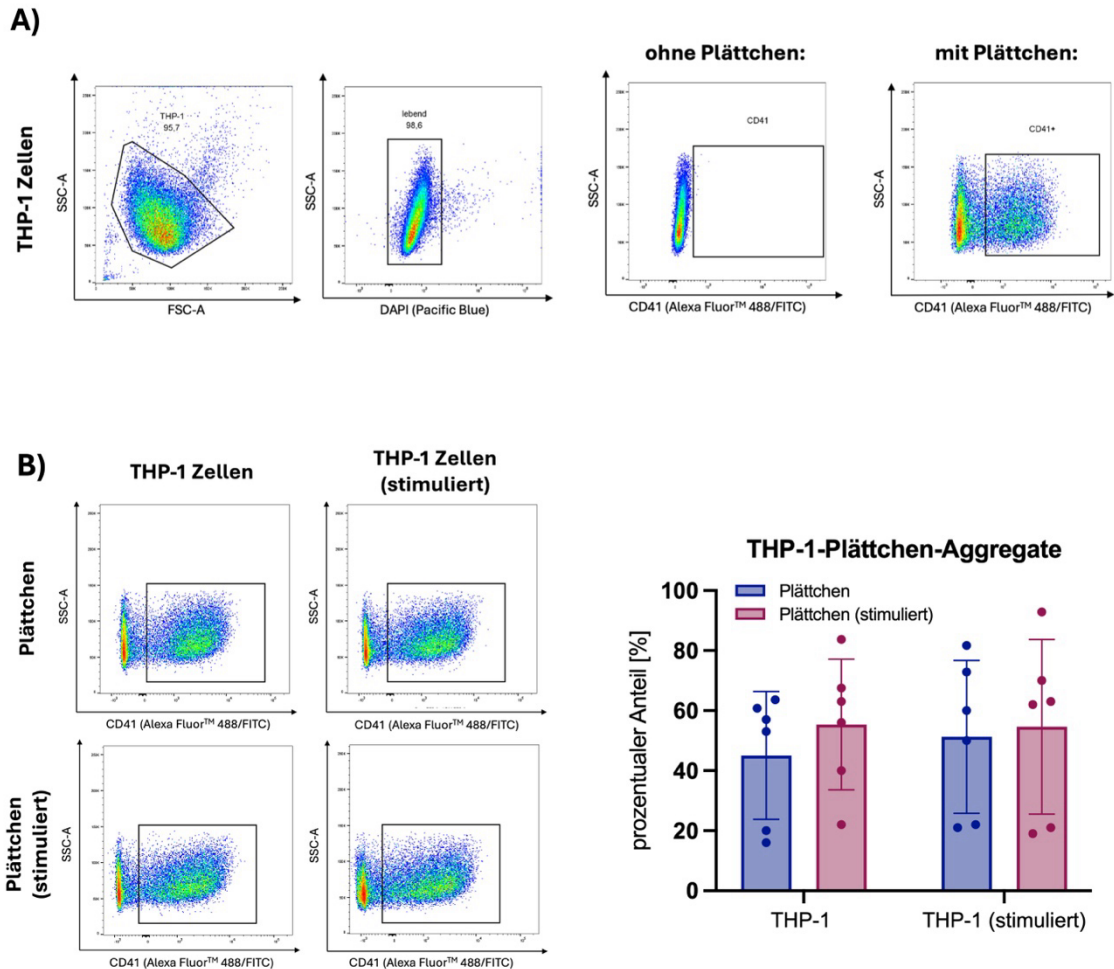


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Untersuchungen der Interaktion von Plättchen und THP-1 Zellen. A) Gating-Strategie zur Identifikation der CD41⁺ THP-1 Zellen. Die Zellen wurden im FSC/SSC vorselektiert, anschließend wurden die toten, DAPI⁺ Zellen ausgeschlossen. Mittels CD41 wurden alle plättchengebundenen THP-1 Zellen detektiert. **B)** THP-1 Zellen wurden mit LPS stimuliert, Plättchen wurden mit ADP aktiviert. Der Einfluss des Aktivierungsstatus auf die Aggregatbildung wurde als *Dot Plots* dargestellt. Die quantitative Auswertung erfolgte durch die Ermittlung der relativen Anteile an Aggregaten. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD, n=6.

Um die Aggregatbildung nicht nur quantitativ, sondern auch morphologisch darzustellen, wurde im nächsten Schritt die Interaktion von THP-1 Zellen mit Plättchen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Da sich in der Interaktion von THP-1 Zellen mit Plättchen kein wesentlicher Unterschied zwischen dem stimulierten und unstimulierten Zustand zeigte, wurde die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung im Folgenden im unstimulierten Zustand durchgeführt.

Dazu wurden Plättchen zu THP-1 Zellen gegeben und auf einen Lysin-beschichteten Objektträger aufgetragen. Die Zellen wurden zunächst mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen CD41 (grün) markiert und anschließend mit Paraformaldehyd fixiert. Zuletzt wurden die Zellen noch mit rot fluoreszierendem WGA behandelt, um die Zelloberfläche zu markieren. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen sind in Abbildung 8 dargestellt.

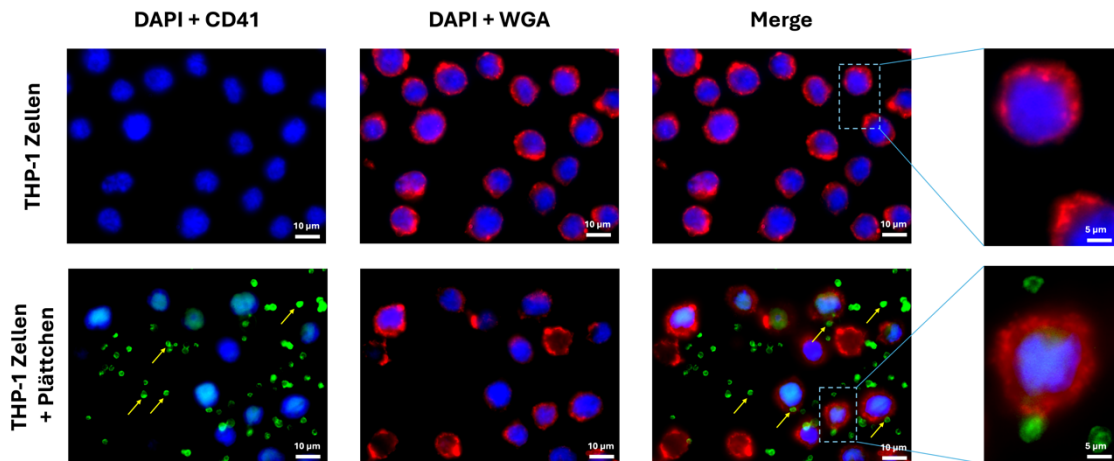


Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von THP-1 Zellen und THP-1-Plättchen-Aggregaten in 100-facher Vergrößerung. In der oberen Reihe sind plättchenungebundene THP-1 Zellen, gefärbt mit DAPI (blau), CD41 (grün) und WGA (rot) abgebildet. Es zeigt sich entsprechend kein CD41-Signal. In der unteren Reihe finden sich THP-1-Plättchen-Aggregate mit einem deutlichen CD41-Signal (grün). Einige Plättchen wurden exemplarisch mit gelben Pfeilen markiert.

5.4 Funktionelle Untersuchungen zu Monozyten-Plättchen-Aggregaten

Die durchflusszytometrische Identifikation von Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregaten bildet die Grundlage für weiterführende Analysen hinsichtlich der funktionellen Relevanz der Aggregatbildung von Monozyten mit Plättchen und den jeweiligen Subpopulationen der Monozyten. Im folgenden Abschnitt werden insbesondere zwei funktionelle Aspekte näher beleuchtet: Um Hinweise auf mögliche Interaktionspartner zu erhalten, wurde zunächst die Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren auf Plättchen und Monozyten untersucht. Zudem wurde die Phagozytosefähigkeit der Monozyten und der Monozyten-Plättchen-Aggregate mithilfe von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen analysiert.

5.4.1 Charakterisierung der Thrombozyten und Monozyten

5.4.1.1 Expression von Oberflächenrezeptoren auf Thrombozyten

Nachdem die Interaktion zwischen THP-1 Zellen und Plättchen analysiert wurde, sollte genauer untersucht werden welche Oberflächenrezeptoren potenziell an dieser Interaktion beteiligt sein könnten. Hierzu wurde die Expression von CD41, P-Selektin, ICAM-1, GPIIb/IIIa und CD40L auf der Oberfläche der Thrombozyten untersucht.

Thrombozyten wurden aus dem venösen Blut gesunder Spender gewonnen (s. Abschnitt 4.7). Anschließend wurde die Hälfte der Thrombozyten mit ADP aktiviert, während die andere Hälfte unstimuliert als Kontrolle mitgeführt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht. Für das *Gating* wurden die Thrombozyten zunächst basierend auf ihren morphologischen Aspekten über die FSC/SSC Eigenschaften eingegrenzt. Im nächsten Schritt wurde der relative Anteil der Plättchen, die den entsprechenden Marker (CD41, P-Selektin, ICAM-1, GPIIb/IIIa und CD40L) exprimieren anhand von ungefärbten Plättchen bestimmt.

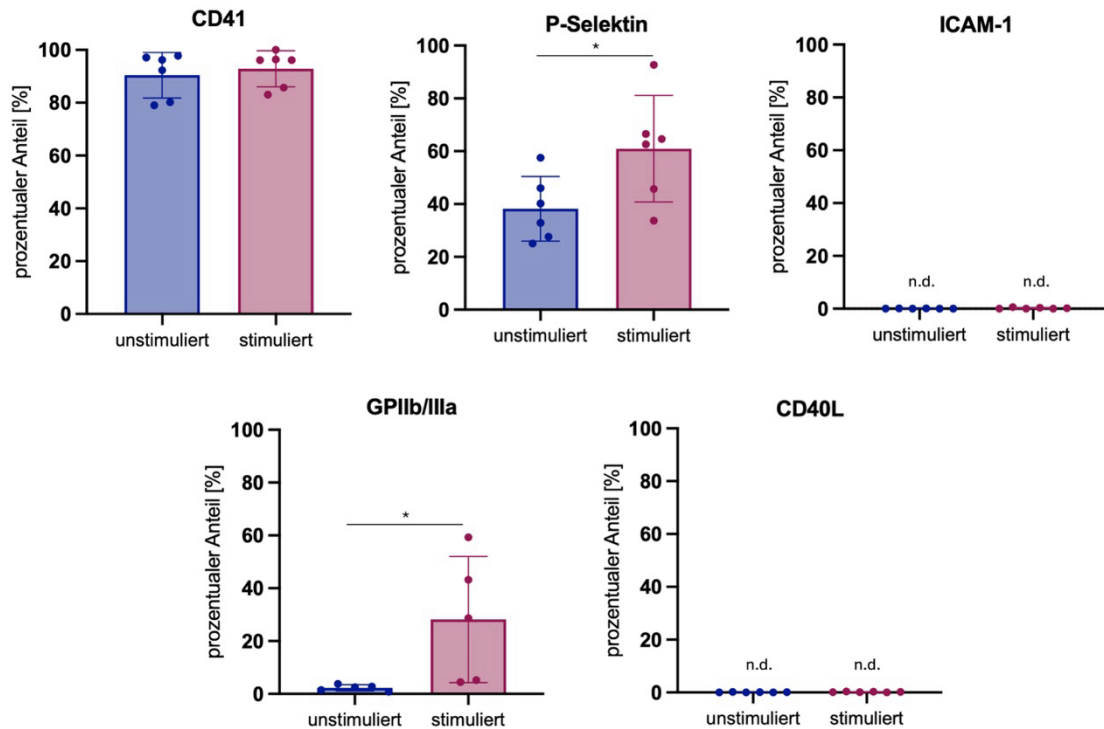


Abbildung 9: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächenrezeptoren auf Thrombozyten. Iso-lierte Plättchen wurden mit ADP stimuliert, eine unstimulierte Kontrolle wurde mitgeführt. Anschließend erfolgte die Färbung gegen CD41, P-Selektin, ICAM-1, CD40L oder GPIIb/IIIa. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD, $n=6$. Die Normalverteilung der Werte wurde mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft, bei normalverteilten Werten erfolgte die Signifikanzanalyse mittels t-Test. Statistische Signifikanz: * $p < 0.05$.

In Abbildung 9 (erstes Bild) wird deutlich, dass der Anteil der CD41⁺-Plättchen sowohl mit als auch ohne ADP-Aktivierung der Thrombozyten jeweils etwa 90% beträgt. P-Selektin⁺ Thrombozyten summieren sich ohne ADP-Aktivierung auf etwa 40% und steigen nach ADP-Aktivierung auf etwa 80%. ICAM-1⁺ und CD40L⁺ Plättchen sind durchflusszytometrisch nicht detektierbar. Der Anteil GPIIb/IIIa⁺ Plättchen beläuft sich ohne ADP-Aktivierung auf etwa 7% und steigt nach ADP-Aktivierung auf ca. 40%. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CD41 konstitutiv auf Thrombozyten exprimiert ist, während ICAM-1 und CD40L nicht detektierbar sind. Die Expression von P-Selektin und GPIIb/IIIa lässt sich infolge einer ADP-Aktivierung deutlich steigern.

5.4.1.2 Expression von Oberflächenrezeptoren auf Monozyten und MPAs

Analog zur Analyse der Oberflächenrezeptoren auf Plättchen, wurde auch die Expression verschiedener Rezeptoren auf der Oberfläche der Monozyten überprüft. Das Ziel hierbei war die Identifikation potenzieller Interaktionspartner auf der Oberfläche der Monozyten in der Interaktion mit Plättchen. Hierzu wurden auch die Monozytensubpopulationen differenziert betrachtet, um etwaige Unterschiede zu analysieren. Die Zellen wurden gegen die entsprechenden Oberflächenmarker (CD11b, CD18, LFA-1, ICAM-1, CD40, PSGL-1) gefärbt, zur Analyse der Aggregate wurde wieder eine Markierung gegen CD41 eingesetzt. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung der Proben, das Gating erfolgte entsprechend der MHC-II-Gating-Strategie, die hierbei genutzten Oberflächenmarker CD14, CD16 und MHC-II wurden auch hinsichtlich ihrer mittleren Fluoreszenzintensität je nach Subpopulation und Bindung an Thrombozyten analysiert.

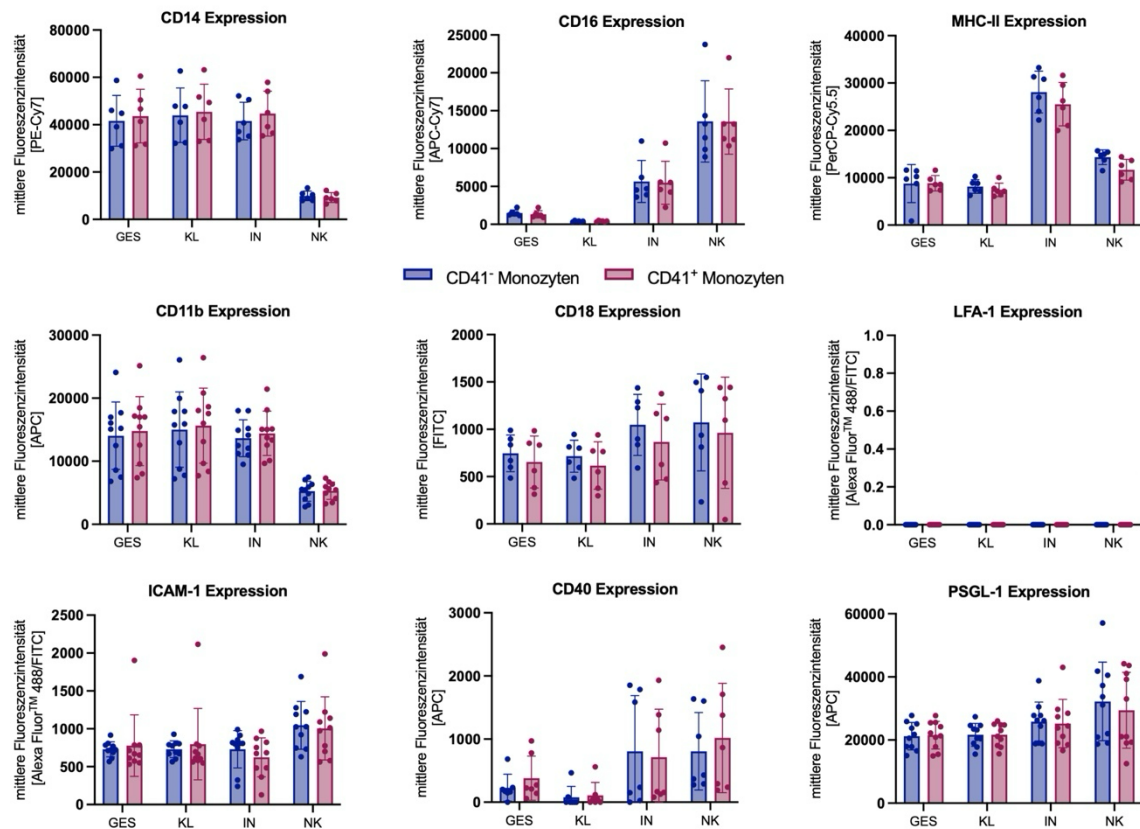


Abbildung 10: Expression von Oberflächenrezeptoren auf Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregaten. Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächenrezeptoren auf Monozyten (blau) und Monozyten-Plättchen-Aggregaten (rot) der jeweiligen Monozytensubpopulationen (KM = klassische Monozyten, IM = intermediäre Monozyten, NK = nicht-klassische Monozyten). Monozyten, sowie plättchengebundene Monozyten, wurden entsprechend der eingangs erläuterten MHC-II-Gating-Strategie mithilfe von CD11b, CD14, CD16 und MHC-II aufbereitet und zusätzlich gegen CD18, LFA-1, ICAM-1, CD40 oder PSGL-1 markiert. Die Expression der einzelnen Oberflächenrezeptoren wurde nach CD41-Status, sowie Monozytensubpopulationen, analysiert. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD, n=6-10.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, ist die Expression von CD14 auf den nicht-klassischen Monozyten geringer ausgeprägt als auf der Oberfläche der klassischen und intermediären Monozyten, mit einer MFI von ca. 10.000 auf den nicht-klassischen Monozyten und ca. 40.000 auf den klassischen und intermediären Monozyten. Es finden sich hierbei in keiner Subpopulation wesentlichen Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zwischen plättchenungebundenen und plättchengebundenen Monozyten. CD16 ist auf den klassischen Monozyten mit einer MFI von etwa 390 deutlich weniger vorhanden als auf den intermediären (ca. 5600) und den nicht-klassischen (ca. 13600) Monozyten. Auch hier findet sich zwischen den CD41⁻ Monozyten und den Monozyten-Plättchen-Aggregaten kein nennenswerter Unterschied. MHC-II ist am deutlichsten auf den intermediären Monozyten exprimiert mit einer MFI von fast 30.000, auf den nicht-klassischen Monozyten ist MHC-II mit einer MFI von etwa 15.000 deutlicher vertreten als auf den klassischen Monozyten (ca. 8000). Wie bei CD14 und CD16 findet sich auch hier kein eindeutiger Unterschied zwischen plättchenungebundenen und plättchengebundenen Monozyten.

Die Expression von CD11b ist auf den nicht-klassischen Monozyten geringer ausgeprägt als auf der Oberfläche der klassischen und intermediären Monozyten, mit einer MFI von ca. 5.000 auf den nicht-klassischen Monozyten und ca. 15.000 auf den klassischen und intermediären

Monozyten. Zwischen CD41⁻ und CD41⁺ Monozyten zeigt sich in keiner der Subpopulationen ein Unterschied hinsichtlich der mittleren Fluoreszenzintensität von CD11b. CD18 ist auf klassischen Monozyten weniger deutlich exprimiert als auf intermediären und nicht-klassischen Monozyten. Die MFI für die klassischen Monozyten beträgt etwa 750, während es für intermediäre und nicht-klassische Monozyten ca. 1.250 sind. Ähnlich wie bei der Expression von CD11b zeigen sich auch hier keine Unterschiede zwischen CD41⁻ und CD41⁺ Monozyten. Die Analyse der Expression von LFA-1 zeigt auf, dass in keiner Subpopulation LFA-1 nachgewiesen werden kann. Dies trifft sowohl für CD41⁻ als auch für CD41⁺ Monozyten zu.

ICAM-1 ist auf allen Subpopulationen etwa gleichmäßig exprimiert, lediglich auf der Oberfläche der nicht-klassischen Monozyten ist geringfügig mehr ICAM-1 vorhanden. Für klassische und intermediäre Monozyten ergibt sich eine MFI von etwa 750, auf nicht-klassischen Monozyten liegt diese bei ca. 1000. Es findet sich auch hier kein Unterschied in der Expression von ICAM-1 zwischen CD41⁻ und CD41⁺ Monozyten. Für die Expression von CD40 zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen klassischen Monozyten, die eine MFI von etwa 150 aufweisen, und intermediären und nicht-klassischen Monozyten, für die jeweils eine MFI von ca. 750 gemessen werden kann. Konform zu der Analyse der anderen Oberflächenrezeptoren ist auch hier kein Unterschied zwischen CD41⁻ und CD41⁺ Monozyten detektierbar. Die Expression von PSGL-1 ist auf den nicht-klassischen Monozyten etwas stärker ausgeprägt als auf den klassischen und intermediären Monozyten. Für die nicht-klassischen Monozyten ergibt sich eine MFI von etwa 30.000, für klassische und intermediäre Monozyten liegt diese bei ca. 20.000. Auch hier ist kein deutlicher Unterschied zwischen CD41⁻ und CD41⁺ Monozyten nachweisbar.

5.4.2 Phagozytose von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs)

Um die Monozyten neben ihrer Morphologie, Verteilung und Fähigkeit zur Aggregatbildung mit Plättchen auch funktionell zu untersuchen, wurde die Phagozytosefähigkeit von Monozyten und ihren Subpopulationen, sowie der Monozyten-Plättchen-Aggregate, mittels fluoreszenzmarkierter Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) durchflusszytometrisch und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Herstellung und Charakterisierung der hier verwendeten PFCs wurde im Abschnitt 4.5 erläutert.

5.4.2.1 Einfluss des Kulturmediums auf die Vitalität von Monozyten

Zunächst sollte herausgefunden werden, welches Medium eine möglichst lange Inkubation der Monozyten ohne ein Absterben der Population gewährleistet. Hierzu wurden aus dem Blut gesunder Spender isolierte Immunzellen entweder in DMEM (ohne Zusätze), oder in RPMI 1640, welches zusätzlich Glucose, Pyruvat, FBS und Penicillin/Streptomycin enthielt, für unterschiedlich lange Zeiträume (5, 10, 15, 20 Minuten) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD11b, MHC-II, CD14, CD16 gefärbt und der Anteil an toten Zellen über DAPI bestimmt. Als Ausgangswert wurden Zellen verwendet, die für 20 min bei 4°C gelagert wurden.

Das *Gating* erfolgte aus Gründen der Übersichtlichkeit nur mittels CD11b zur Lokalisation der Monozyten (Abbildung 11A). Die relative Menge der CD11b⁺ Population wurde nach vier verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Eine Kontrolle, die bei 4°C für 20 Minuten inkubiert wurde, wurde mitgeführt.

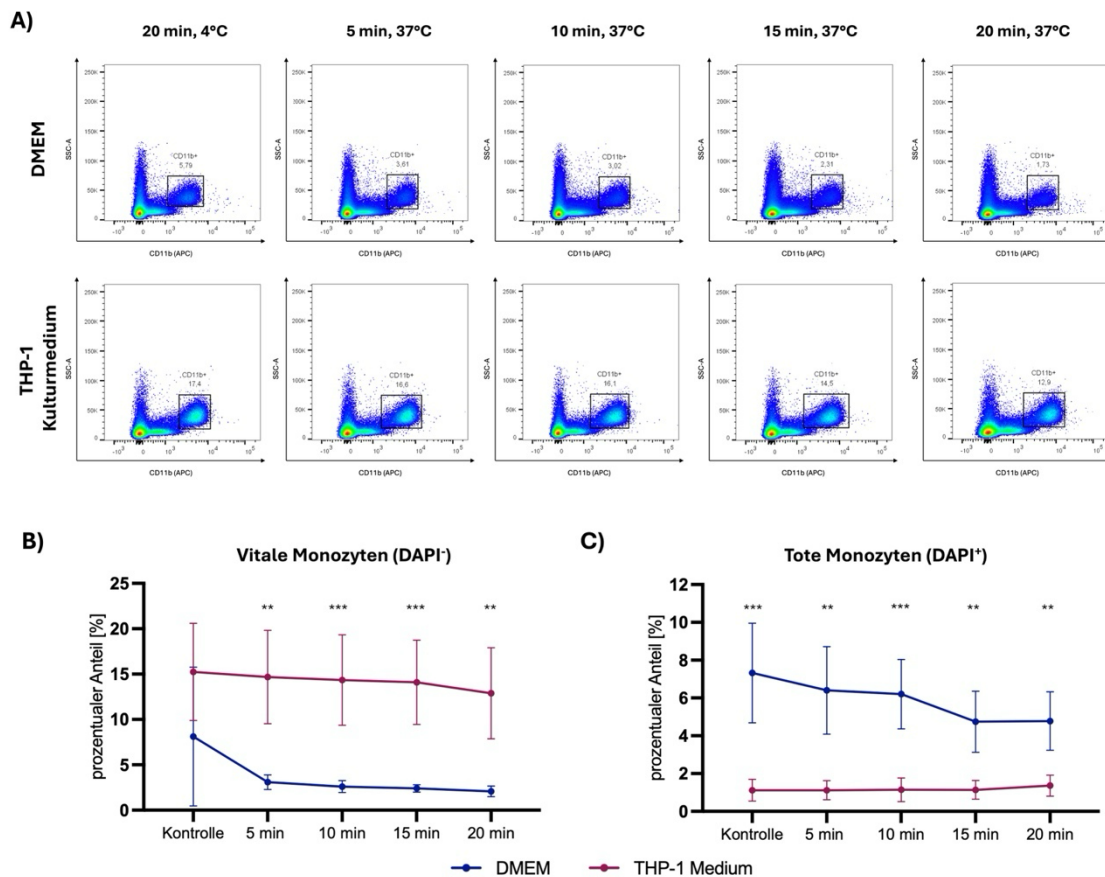


Abbildung 11: Vergleichende Analyse der Vitalität von Monozyten in unterschiedlichen Medien. A) Dot Plots der Monozytenpopulation nach Inkubation in DMEM (obere Reihe) bzw. Kulturmedium der THP-1 Zellen (untere Reihe). **B)** Vergleichende quantitative Auswertung der unterschiedlichen Medien (blau = DMEM, rot = Kulturmedium der THP-1 Zellen) für die gesamte Monozytenpopulation als Anteil der gesamten Zellpopulation. Die Normalverteilung wurde mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests überprüft, bei nicht normalverteilten Werten zeigt sich für alle Zeitpunkte außer 20 Minuten bei 4°C mittels des Mann-Whitney-Tests p-Werte < 0,01. **C)** Untersuchung der toten, DAPI⁺ Monozyten aus der gesamten Monozytenpopulation nach Inkubation in den unterschiedlichen Medien. Die Normalverteilung wurde mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests überprüft, bei normalverteilten Werten zeigten sich im t-Test p-Werte < 0,01 für alle Zeitpunkte. Abgebildet sind jeweils Mittelwerte $\pm$ SD, n=5-6.

Hierbei zeigt sich für die gesamten Monozyten, dass nach Inkubation der Zellen in DMEM der Anteil der Monozyten in der gesamten Zellpopulation von etwa 8% auf etwa 2% nach 20 Minuten Inkubation bei 37°C reduziert wird. Im Kulturmedium der THP-1 Zellen (RPMI + Zusätze) bleibt der Anteil konstant über alle Zeitpunkte bei ca. 15%. Für die Subpopulationen kann ein solcher Effekt nicht beobachtet werden, hier bleibt der Anteil der jeweiligen Monozytenpopulation in etwa konstant über alle Zeitpunkte hinweg.

Der Anteil der toten, DAPI⁺ Monozyten ist in Abbildung 11C dargestellt. Die DAPI⁺ Monozyten wurden nach jedem der o.g. Zeitpunkte für beide Medien vergleichend analysiert. Dabei fällt auf, dass die Inkubation in DMEM bereits nach 20 Minuten bei 4°C einen Anteil von etwa 7% toten Zellen ergibt, dieser Anteil verhält sich im Verlauf der Inkubation bei 37°C annähernd stabil. Im Kulturmedium der THP-1 Zellen ist der Anteil der toten Zellen über die gesamte Zeitreihe hinweg geringer mit etwa 1-2%.

5.4.2.2 Optimierung der PFC-Menge

Da die A^{488} PFCs sich im FITC-Kanal des Durchflusszytometers zeigen und der CD41-Antikörper zur Markierung der Thrombozyten im PE-Kanal dargestellt wird, musste eine spektrale Überlappung der beiden Fluoreszenzen ausgeschlossen werden. Daher wurde zuerst untersucht, bei welcher PFC-Menge eine Interferenz der FITC- und PE-Fluoreszenzen vermieden werden konnte, bei dennoch ausreichender Signalstärke der PFCs. Zu diesem Zweck wurde eine Titration der PFCs angefertigt und jeweils mit und ohne CD41-Antikörper die Menge der CD41⁺ Monozyten, sowie die PFC-Signalstärke, bestimmt.

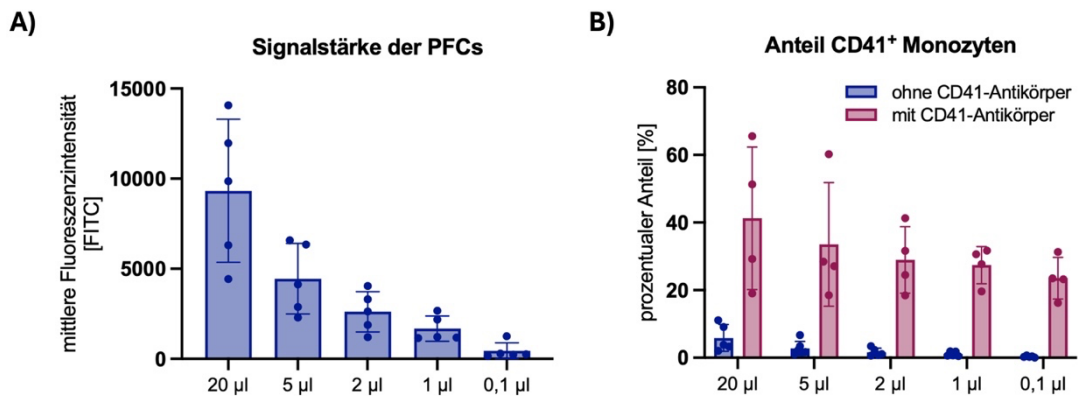


Abbildung 12: Titration der A^{488} PFCs zur Bestimmung der optimalen PFC-Menge. A) Quantitative Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität der PFCs bei Anwendung unterschiedlicher PFC-Mengen. B) Quantitative Darstellung des Anteils CD41⁺ Monozyten bei Verwendung unterschiedlicher PFC-Mengen sowohl ohne (rot) als auch mit (blau) Färbung gegen CD41. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD, n=4-6.

Wie in Abbildung 12A dargestellt, nimmt die Fluoreszenzintensität der PFCs mit absteigender Menge der PFCs ab. Bei einer Menge von 20 µl ergibt sich eine Signalstärke von 9324,4 ($\pm$ 3964), bei 0,1 µl sind es nur noch 439 ($\pm$ 460).

Neben der Signalstärke der PFCs ist auch die Kontamination des FITC-Signals mit dem PE-Signal des CD41 von Relevanz. Der Anteil CD41⁺ Monozyten ohne die Anwendung eines CD41-Antikörpers beträgt bei einer PFC-Menge von 20 µl 5,9% ($\pm$ 4) und bei einer PFC-Menge von 0,1 µl 0,3% ($\pm$ 0,3). Der Anteil der CD41⁺ Monozyten mit Verwendung eines CD41-Antikörpers nimmt ebenfalls ab.

Ein Kompromiss beider Aspekte kann bei einer Anwendung von 2 µl der PFCs gefunden werden. Dabei beträgt die Signalstärke der PFCs 2614 ($\pm$ 1121) und der Anteil der CD41⁺ Monozyten ohne die Anwendung eines CD41-Antikörpers lediglich 1,6% ($\pm$ 1,2). Aus diesem Grund wurden die nachfolgend beschriebenen Versuche mit einer PFC-Menge von 2 µl durchgeführt.

5.4.2.3 PFC-Aufnahme von Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregaten

Nachdem die optimale Menge an zu verwendenden PFCs in 5.4.2.2 etabliert wurde, sollte im nächsten Schritt die PFC-Aufnahme von humanen Monozyten gesunder Spender, jeweils plättchenungebunden und plättchengebunden untersucht werden. Hierbei wurden auch die Monozytensubpopulationen differenziert betrachtet.

Hierzu wurden die humanen Monozyten mit 2 μ l PFCs inkubiert und anschließend gegen MHC-II, CD11b, CD14, CD16 und CD41 markiert. Das *Gating* erfolgte nach der in Abbildung 5C dargestellten Strategie mittels MHC-II und CD11b. Im Anschluss wurde die mittlere Fluoreszenzintensität des FITC-Signals für CD41⁻ und CD41⁺ Monozyten entsprechend ihrer Subpopulationen bestimmt.

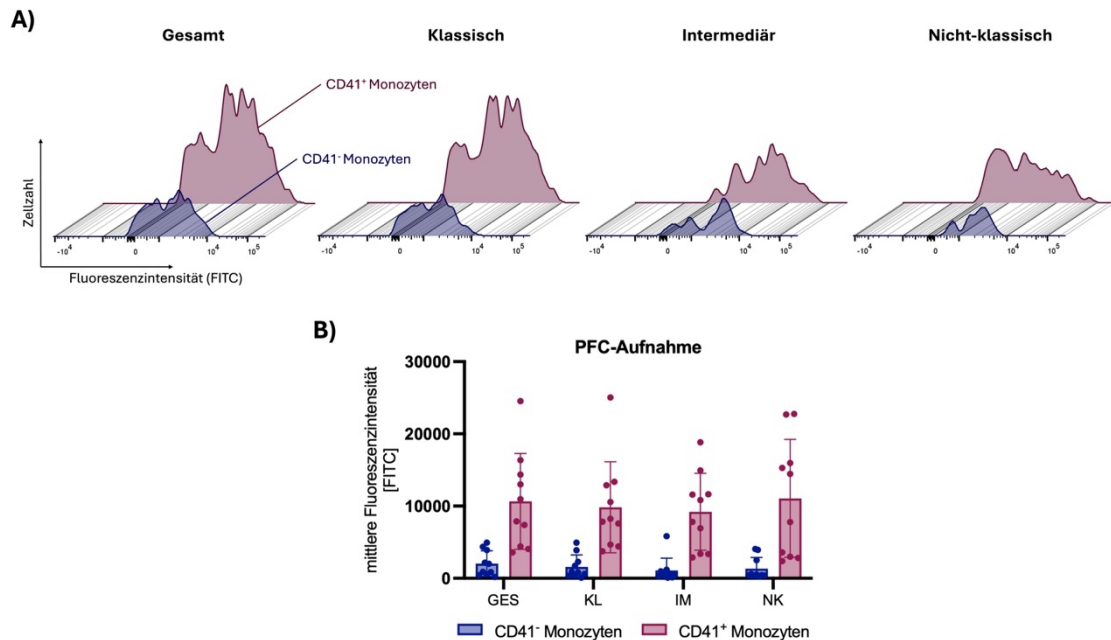


Abbildung 13: Aufnahme von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFC) von CD41⁻ und CD41⁺ Monozyten. A) Darstellung der PFC-Aufnahme für die gesamte Monozytenpopulation, sowie für die jeweiligen Subpopulationen, als Histogramme (blau = CD41⁻; rot = CD41⁺). **B)** Quantitative Auswertung der PFC-Aufnahme plättchenungebundener Monozyten (blau) und Monozyten-Plättchen-Aggregate (rot), jeweils dargestellt für die gesamte Monozytenpopulation (GES) und für die einzelnen Subpopulationen (KM = klassische Monozyten, IM = intermediäre Monozyten, NK = nicht-klassische Monozyten). Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD, n=6-10.

In Abbildung 13 wird ersichtlich, dass sich für die gesamten Monozyten, sowie auch für die jeweiligen Subpopulationen, je eine mittlere Fluoreszenzintensität von etwa 1500 ohne Bindung an Thrombozyten abzeichnet. Infolge der Aggregatbildung mit Plättchen steigt dieser Wert sowohl für die gesamten Monozyten, als auch für die Subpopulationen, auf etwa 10.000.

5.4.2.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der PFC-Aufnahme

Um die PFC-Aufnahme von Monozyten noch differenzierter zu betrachten, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der THP-1 Zellen und THP-1-Plättchen-Aggregate nach Inkubation mit ^{Rho}PFCs angefertigt.

Hierzu wurden Plättchen auf THP-1 Zellen gegeben und mit Rhodamin-markierten PFCs inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Lysin-beschichtete Objektträger fixiert und mit Antikörpern gegen CD41 und MHC-I inkubiert, um sowohl die Membran der Thrombozyten als auch der THP-1 Zellen zu markieren. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert und zuletzt mit DAPI zur Markierung der Zellkerne gefärbt.

Die $RhoPFCs$ präsentierten sich rot fluoreszierend, CD41 und MHC-I hingegen leuchteten grün, während DAPI blau fluoreszierte. Es wurden ebenfalls Kontrollen ohne Hinzugabe von PFCs bzw. Plättchen angefertigt.

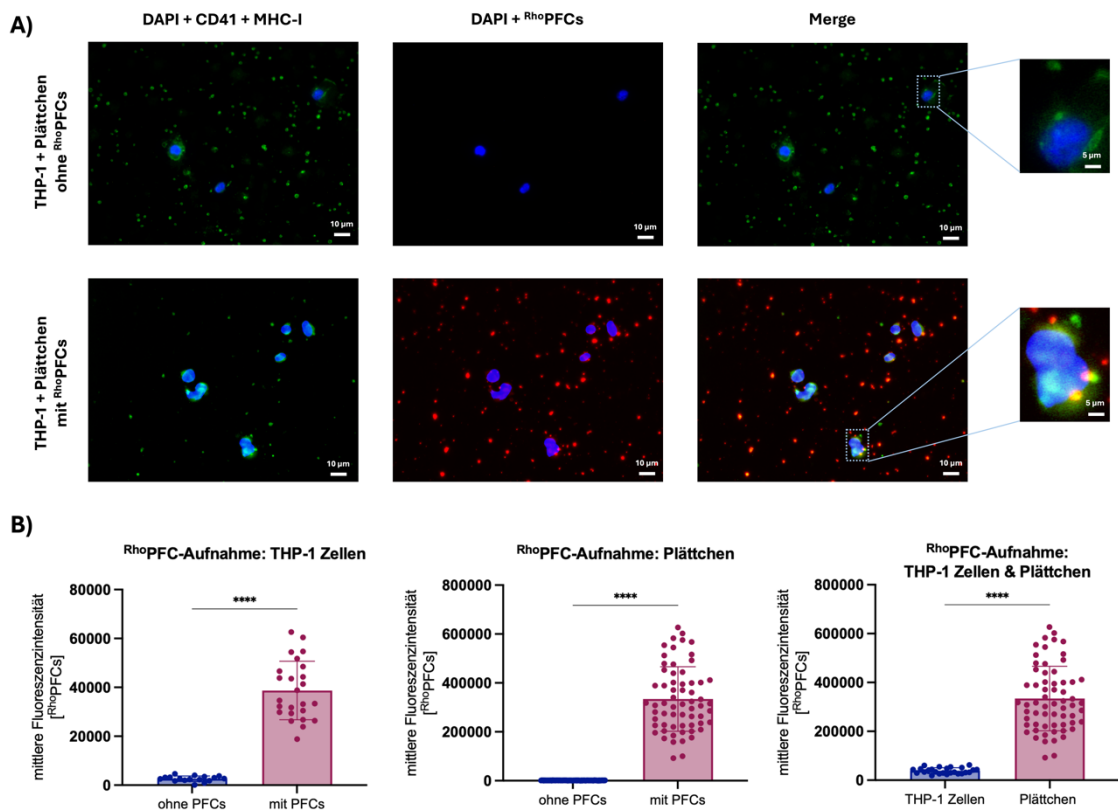


Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der $RhoPFC$ -Aufnahme von THP-1 Zellen und Plättchen. A) Die Zellkerne der THP-1 Zellen wurden mittels DAPI blau dargestellt, Alexa Fluor™ 488-gebundenes CD41 und MHC-I stellt die Membranen der THP-1 Zellen und Plättchen grün da, während die $RhoPFCs$ rot leuchten. In der oberen Reihe ist eine Kontrolle ohne die Anwendung von PFCs abgebildet, in der unteren Reihe (mit PFC-Inkubation) ist ein deutliches rotes Signal, insbesondere in den Membranen der THP-1 Zellen und Plättchen, zu erkennen. **B)** Vergleichende quantitative Auswertung der fluoreszenzmikroskopisch gemessenen PFC-Aufnahme von THP-1 Zellen und Plättchen. Links: PFC-Aufnahme der THP-1 Zellen, in rot ist eine Kontrolle ohne Inkubation der Zellen mit $RhoPFCs$ abgebildet. Die Normalverteilung wurde mittels des Shapiro-Wilk-Tests geprüft, bei normalverteilten Werten ergab der t-Test einen p-Wert < 0,0001. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD, n=17-25. Mitte: PFC-Aufnahme der Plättchen, in die Kontrolle ohne Inkubation der Zellen mit $RhoPFCs$ ist nicht detektierbar. Die Normalverteilung wurde mittels des Shapiro-Wilk-Tests geprüft. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD, n=63-99. Rechts: Vergleichende Analyse der PFC-Aufnahme von THP-1 Zellen (blau) und Plättchen (rot). Die Normalverteilung wurde mittels des Shapiro-Wilk-Tests geprüft, bei normalverteilten Werten ergab der t-Test einen p-Wert < 0,0001. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD, n=25-63.

Wie in Abbildung 14A dargestellt, präsentierten sich die $RhoPFCs$ rot fluoreszierend. Ohne eine Inkubation der Zellen mit PFCs (obere Reihe) fehlt das rote Signal. Nach einer halbstündigen Inkubation mit 100 µl $RhoPFCs$ zeigten sich, neben unphagozytierten, frei vorkommenden PFCs, deutliche rote Signale in den Membranen der THP-1 Zellen und Plättchen.

Zur genaueren Analyse der PFC-Aufnahme wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der $RhoPFCs$ in den entsprechenden *regions of interest* determiniert. Hierbei sollte die PFC-Aufnahme zwischen THP-1 Zellen und Plättchen verglichen werden.

In Abbildung 14B (links, Mitte) sind Kontrollen abgebildet, aus diesen wird deutlich, dass die RhoPFC -Aufnahme der THP-1 Zellen und Plättchen gelingt. Die vergleichende Analyse in Abbildung 14B (rechts) verdeutlicht, dass durch die RhoPFC -Aufnahme der THP-1 Zellen lediglich eine mittlere Fluoreszenzintensität von etwa 50.000 erreicht wird, während diese für die Plättchen ca. 300.000 beträgt.

5.5 LPS-Stimulation zur Simulation entzündlicher Bedingungen

Nachdem die *in vivo* Situation der Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregate nun bei gesunden Spendern evaluiert wurde, sollen im nächsten Schritt mittels LPS (Lipopolysaccharid)-Stimulation entzündliche Bedingungen simuliert werden. Hierzu wurden die Zellen bevor sie mit Antikörpern markiert wurden, für unterschiedlich lange Zeiträume mit LPS in RPMI mit den zuvor genannten Zusätzen inkubiert.

5.5.1 Grenzen der Inkubation von Monozyten im Kulturmedium der THP-1 Zellen

Während sich das Kulturmedium der THP-1 Zellen dem DMEM für eine kurzfristige Inkubation der humanen Monozyten als überlegen erwiesen hat, sollte nun erprobt werden, ob es für eine längerfristige Inkubation, insbesondere unter der Einwirkung eines Stimulus wie LPS, ebenso geeignet ist. Hierzu wurde eine Zeitreihe angefertigt, das Blut gesunder Spender wurde nach Erythrozytenlyse für 30, 60, 120 und 180 Minuten mit und ohne LPS inkubiert. Die Monozyten wurden lediglich grob basierend auf ihren morphologischen Eigenschaften im FSC/SSC selektiert. Anschließend wurden die Zellen mit DAPI markiert, um den Anteil toter Zellen durchflusszytometrisch zu messen.

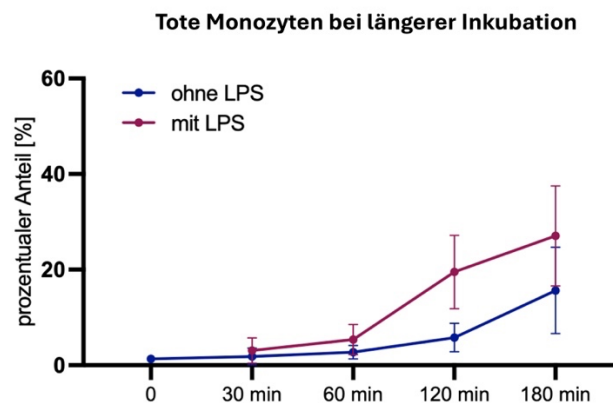


Abbildung 15: Anteil toter Monozyten nach Inkubation bei 37°C ohne (blau) und mit (rot) der Einwirkung von LPS. Analysiert wurden die DAPI+ Monozyten nach 0, 30, 60, 120 und 180 Minuten. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD, n=4.

Hierbei zeigt sich, wie in Abbildung 15 dargestellt, dass der Anteil der DAPI⁺ Monozyten ohne LPS im Verlauf der drei Stunden auf insgesamt 20% steigt. Unter Einfluss von LPS liegt dieser Wert am Ende der drei Stunden bei etwa 30%, dabei liegt der Anteil der DAPI⁺ Monozyten unter LPS-Stimulation die ganze Zeitreihe über durchweg höher.

5.5.2 Verteilung der Monozytensubpopulationen nach LPS-Stimulation

Weiterhin wurde untersucht, inwiefern die LPS-Stimulationen einen Einfluss auf die Verteilung der Monozytensubpopulationen bei gesunden Spendern nimmt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die CD16-Expression infolge einer LPS-Stimulation abnimmt⁷⁰. Die CD14-Expression

unterliegt ebenfalls starken Veränderungen, die eine Darstellung der Monozytensubpopulationen mit der klassischen CD14/CD16-Einteilung unmöglich machen. Aus diesem Grund wurde für die Analyse der Monozytensubpopulationen nach LPS-Stimulation eine alternative Kombination an Oberflächenrezeptoren mittels CCR2 und MHC-II erprobt. Hierbei wurde eine MHC-II^{low}/CCR2^{high} und eine MHC-II^{high}/CCR2^{low} Population definiert (Abbildung 16). Die Monozyten wurden zuvor weiterhin mittels CD11b präselektiert. Die MHC-II^{low} Population entspricht den CD16⁻ klassischen Monozyten, während die MHC-II^{high} Population am ehesten den CD16⁺ intermediären und nicht-klassischen Monozyten entspricht.

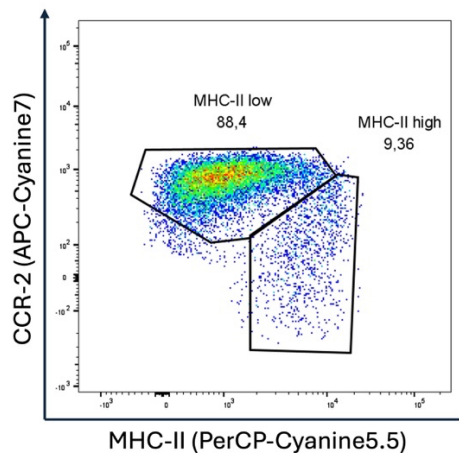


Abbildung 16: Darstellung einer alternativen *Gating*-Strategie zur Vermeidung der LPS-instabilen CD14/CD16 Einteilung von Monozytensubpopulationen über CCR2 und MHC-II. Nachdem die lebenden Monozyten mittels DAPI identifiziert wurden, wurde CD11b zur Präselektion der Monozyten angewandt. Im Anschluss wurden die Zellen basierend auf ihrer MHC-II und CCR-2 Expression in zwei Subpopulationen (MHC-II^{low} und MHC-II^{high}) eingeteilt.

Die alternative *Gating*-Strategie bietet somit eine Möglichkeit für durchflusszytometrische Untersuchungen der Monozyten und ihrer Subpopulationen unter LPS-Einwirkung. Im ersten Schritt sollte die Verteilung der Monozytensubpopulationen nach einer einstündigen Inkubation mit 1 ng/ml LPS analysiert werden. Hierzu wurden die Zellen nach der Erythrozytenlyse mit LPS bei 37°C inkubiert, anschließend wurden sie gegen CD11b, MHC-II und CCR-2 markiert und analysiert. Dabei wurden zwei Kontrollen mitgeführt: Ein Ansatz wurde direkt ohne Inkubation analysiert, ein zweiter Ansatz wurde 60 Minuten ohne LPS inkubiert.

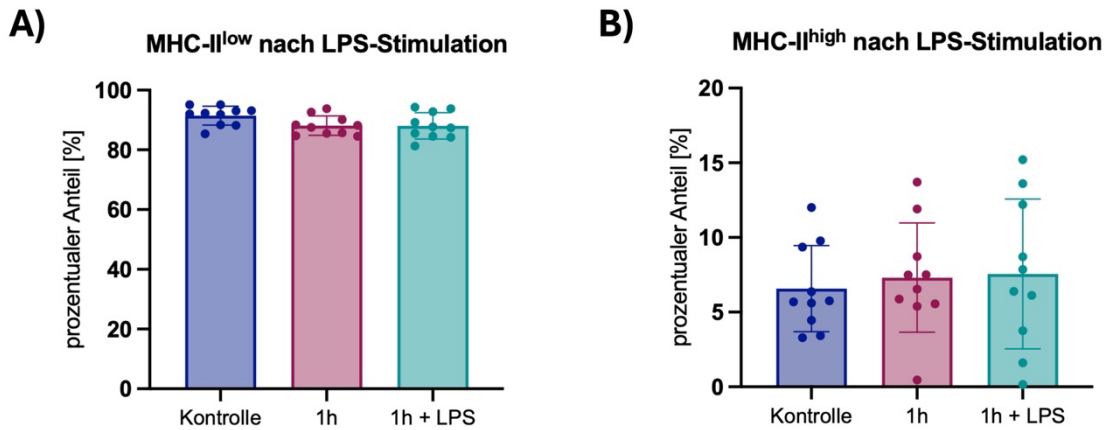


Abbildung 17: Verteilung der Monozytensubpopulationen nach LPS-Stimulation. **A)** Anteil der MHC-II^{low} Monozyten ohne Inkubation (blau), nach 1h Inkubation ohne LPS (rot) und nach 1h Inkubation mit LPS (grün). **B)** Anteil der MHC-II^{high} Monozyten ohne Inkubation (blau), nach 1h Inkubation ohne LPS (rot) und nach 1h Inkubation mit LPS (grün). Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD, n=10.

In Abbildung 17A wird deutlich, dass sich der Anteil der MHC-II^{low} Monozyten von initial etwa 90% im Verlauf der Inkubation nicht ändert. Für die MHC-II^{high} Monozyten (Abbildung 17B) sieht man nur einen geringfügigen Anstieg der Monozyten von etwa 6% auf ca. 7%.

5.5.3 Analyse der Monozyten-Plättchen-Aggregate nach LPS-Stimulation

An die Analyse der Verteilung der Monozytensubpopulationen nach LPS-Stimulation anknüpfend, wurden im nächsten Schritt die Monozyten-Plättchen-Aggregate infolge einer LPS-Stimulation untersucht. Hierzu wurden die Monozyten aufbereitet und zusätzlich gegen CD41 zur Analyse der plättchengebundenen Monozyten markiert. Es erfolgte auch hier die durchflusszytometrische Analyse ohne jegliche Inkubation, nach einstündiger Inkubation und nach einstündiger Inkubation mit LPS.

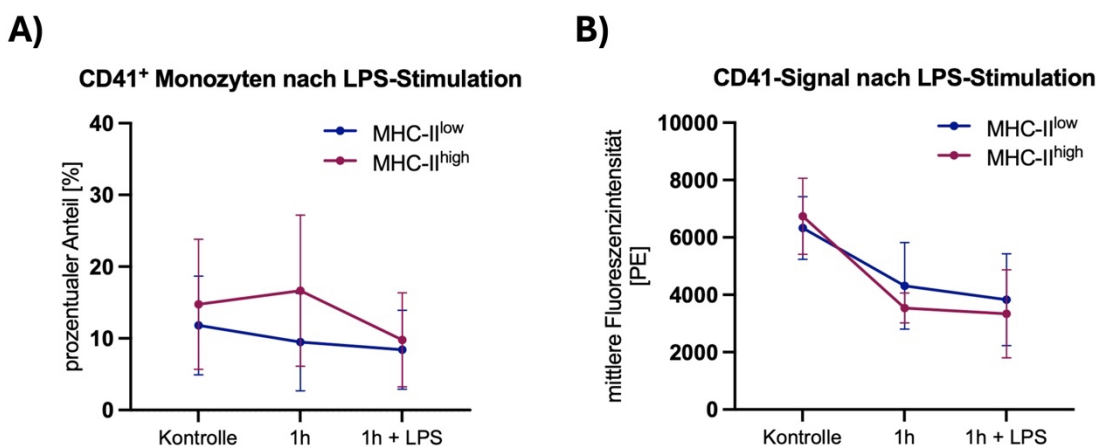


Abbildung 18: Analyse von Monozyten-Plättchen-Aggregate nach Stimulation der Zellen mit LPS. **A)** Quantitative Auswertung des prozentualen Anteils der Aggregate für MHC-II^{low} (blau) und MHC-II^{high} (rot) Monozyten. **B)** Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität des CD41-Signals der MHC-II^{low} (blau) und MHC-II^{high} (rot) Monozyten. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD, n=10.

Bei der Analyse der prozentualen Anteile der Aggregate (Abbildung 18A) zeigte sich anfänglich für die MHC-II^{low} Population ein Wert von 11,8% ($\pm$ 6,9), dieser fiel nach 1h Inkubation mit LPS

auf 8,4% ($\pm 5,5$). Für die MHC-II^{high} Population betrug der Anteil der Aggregate anfangs 14,8% ($\pm 9,1$) und fiel nach einstündiger Inkubation mit LPS auf 9,8% ($\pm 6,6$).

In Abbildung 18B ist die mittlere Fluoreszenzintensität für CD41 ohne Inkubation, nach einstündiger Inkubation ohne und mit LPS abgebildet. Für beide Populationen beträgt das Signal ohne Inkubation etwa 6500. Nach der LPS-Stimulation fällt es sowohl für die MHC-II^{low} als auch für die MHC-II^{high} Monozyten, auf ca. 4000.

5.5.4 Expression von Oberflächenrezeptoren nach LPS-Stimulation

Für weiterführende funktionelle Analysen der Monozyten unter entzündlichen Bedingungen, wurden die bereits durchgeführten Untersuchungen zur den Oberflächenrezeptoren nach LPS-Stimulation wiederholt. Die Zellen wurden hierzu nach Erythrozytenlyse mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS für 30, 60, 120 und 180 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Antikörperfärbung gegen CD11b, CD18, LFA-1, ICAM-1, CD40 oder PSGL-1 zur durchflusszytometrischen Analyse. Für das *Gating* wurden die Monozyten lediglich grob anhand ihrer Eigenschaften im FSC und SSC selektiert.

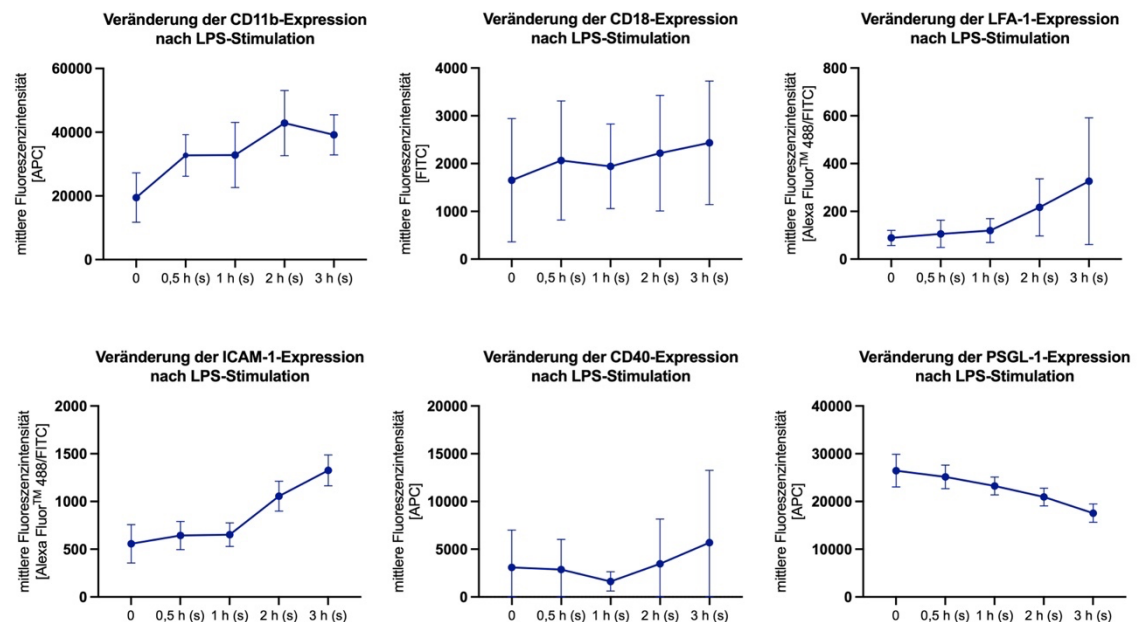


Abbildung 19: Quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse der Expression von verschiedenen Oberflächenrezeptoren auf Monozyten nach LPS-Stimulation. Die Zellen wurden für je 30, 60, 120 und 180 Minuten mit LPS stimuliert (s = stimuliert) und anschließend gegen CD11b, CD18, LFA-1, ICAM-1, CD40 oder PSGL-1 markiert und analysiert. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD, n=6.

Für CD11b zeigte sich in der unstimulierten Kontrolle eine Signalintensität von etwa 20.000, diese stieg im Verlauf der Stimulation an und erreichte nach zwei Stunden einen Wert von 40.000, bevor das Signal dann nach drei Stunden wieder schwächer (ca. 35.000) wurde. Auch für CD18 ließ sich ein Anstieg von anfänglich ca. 1.600 auf etwa 2.200 nach dreistündiger Stimulation verzeichnen. LFA-1 wies in der Kontrolle ein niedriges Signal von etwa 100 auf, nach drei Stunden Stimulation mit LPS stieg dieser Wert auf ca. 350 an. Die Signalintensität für ICAM-1 betrug initial etwa 500 und stieg im Laufe der Stimulation auf fast 1.500 an. Der größte Anstieg lässt sich hier bei etwa 90 Minuten finden. CD40 zeigte anfänglich eine mittlere Fluoreszenzintensität von etwa 3.500 auf, nach einstündiger Inkubation fiel diese auf etwa 2.000 und stieg

nach drei Stunden Inkubation mit LPS wieder auf etwa 5.000. Für PSGL-1 zeigte sich in der Kontrolle eine Signalintensität von etwa 27.000, dieser Wert fiel kontinuierlich im Laufe der Stimulation, sodass er nach drei Stunden nur noch 20.000 betrug.

Daher lässt sich zusammenfassen, dass insbesondere die Expression von CD11b, CD18 und ICAM-1 durch eine Stimulation mit LPS gesteigert werden kann. Auch die Signalintensität von LFA-1 und CD40 nimmt zu, allerdings nur geringfügig. Für PSGL-1 kann eine kontinuierliche Abnahme der Intensität beobachtet werden.

5.5.5 Analyse der PFC-Aufnahme nach LPS-Stimulation

Abschließend wurde die PFC-Aufnahme der Monozytensubpopulationen und Monozyten-Plättchen-Aggregate nach LPS-Stimulation näher beleuchtet. Hierzu wurden die Zellen aufbereitet, aber vor der Antikörperfärbung mit 5 μ l A^{488} PFCs für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal der PFCs durchflusszytometrisch analysiert.

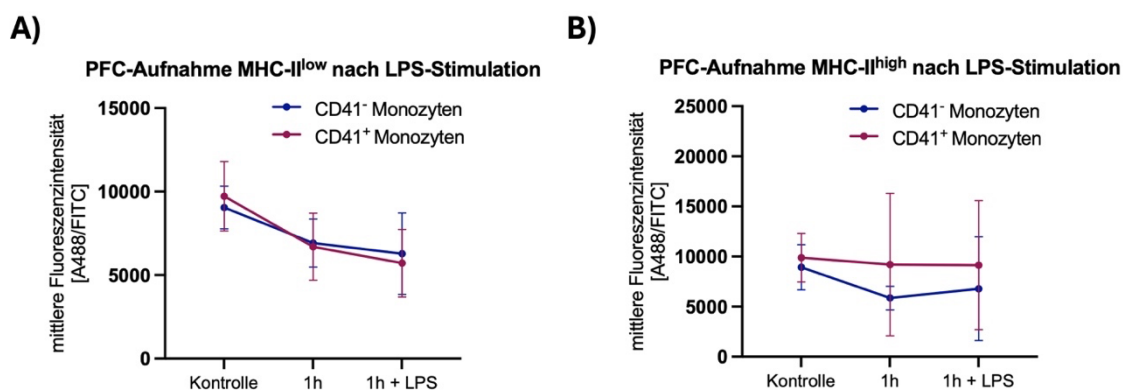


Abbildung 20: A^{488} PFC-Aufnahme der plättchenungebundenen Monozyten (blau) und Monozyten-Plättchen-Aggregate (rot) nach LPS-Stimulation. **A)** PFC-Aufnahme der MHC-II^{low} Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregate nach LPS-Stimulation. **B)** PFC-Aufnahme der MHC-II^{high} Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregate nach LPS-Stimulation. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD, n=10.

In beiden Subpopulationen zeigt sich in der Kontrolle eine höhere Signalintensität der PFC-Aufnahme für CD41⁺ Monozyten. In Abbildung 20A wird deutlich, dass das Fluoreszenzsignal der MHC-II^{low} in beiden Populationen (CD41⁻ und CD41⁺) von anfänglich etwa 10.000 auf fast 6.000 infolge der LPS-Stimulation sinkt, dabei lässt sich nach einstündiger Stimulation für die CD41⁺ Monozyten eine geringere Signalintensität als für die CD41⁻ Monozyten feststellen.

Für MHC-II^{high} Monozyten (Abbildung 20B) kann dieser Effekt lediglich in der CD41⁻ Population beobachtet werden, hier sinkt das Signal von anfänglich etwa 9.000 auf ca. 6.800. In der CD41⁺ Population der MHC-II^{high} Monozyten kann diese Beobachtung nicht gemacht werden.

6 Diskussion

Monozyten sind essenziell für die initiale Immunabwehr bei diversen Entzündungssituationen. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Immunabwehr beinhaltet die Bildung von Monozyten-Plättchen-Aggregaten, welche die Funktionen beider Interaktionspartner wechselseitig verstärkt⁴⁷. Eine zuverlässige Methode zur morphologischen und funktionellen Analyse der Interaktion zwischen Monozyten und Plättchen ist daher unerlässlich. Um dies zu ermöglichen wurden drei verschiedene Ansätze zur durchflusszytometrischen Untersuchung von Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregaten untersucht. Hierbei konnte eine Färbe- und *Gating*-Strategie, die CD11b und MHC-II zur Differenzierung der Immunzellen vorsieht, hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit, Reproduzierbarkeit und kontaminationsfreien Darstellung der Monozytensubpopulationen als optimal identifiziert werden. In diesem Rahmen wurde auch ein *in vitro* Modell mit THP-1 Zellen und isolierten Plättchen aus humanem Blut etabliert, welches neben durchflusszytometrischen Analysen auch zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Komplexbildung diene.

Die im Vorfeld beschriebene *Gating*-Strategie zur durchflusszytometrischen Darstellung der humanen Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregate wurde anschließend als Grundlage für weiterführende funktionelle Analysen genutzt. Diese umfasste zum einen die Untersuchung der an der Aggregatbildung potenziell beteiligten Oberflächenrezeptoren. Hier zeigten sich auf den Monozyten für CD11b, CD14, CD16, MHC-II, CD18, LFA-1, ICAM-1, CD40 und PSGL-1 lediglich Unterschiede zwischen den jeweiligen Monozytensubpopulationen, jedoch aber nicht zwischen plättchengebundenen und plättchenungebundenen Monozyten. Seitens der Thrombozyten konnte nach ADP-Aktivierung ein Anstieg der Expression von P-Selektin und GPIIb/IIIa beobachtet werden. Der zweite Teil der funktionellen Analyse umfasste sich mit der PFC-Aufnahme der Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregate zur Quantifizierung der Phagozytosefähigkeit dieser. Bei dieser Analyse wurde deutlich, dass die plättchengebundenen Monozyten deutlich mehr Nanopartikel aufnahmen. Diese Beobachtung konnte für alle Monozytensubpopulationen nachvollzogen werden. Die PFC-Aufnahme wurde ebenfalls am THP-1 Modell fluoreszenzmikroskopisch untersucht und quantifiziert, hier zeigte sich, dass interessanterweise Plättchen eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität für PFCs aufweisen als THP-1 Zellen.

Zum Schluss wurden humane Monozyten für eine Stunde mit LPS stimuliert, um eine entzündliche Situation zu simulieren. Es erfolgte die erneute Analyse der Monozytensubpopulationen, Monozyten-Plättchen-Aggregate, Expression von Oberflächenrezeptoren und PFC-Aufnahme. Ein Problem stellte hier die instabile Expression von CD14 und CD16 nach LPS-Stimulation da, sodass das ursprüngliche *Gating*-Schema nicht verwendet werden konnte. Es wurde eine Alternative mittels MHC-II und CCR2 etabliert und eine Differenzierung der Monozyten in zwei Subpopulationen vorgenommen (MHC-II^{low}/CCR2^{high} und MHC-II^{high}/CCR2^{low}). Infolge der LPS-Stimulation konnten keine wesentlichen Unterschiede in der Einteilung der Subpopulationen beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch nach LPS-Stimulation ein abgeschwächtes CD41-Signal der plättchengebundenen Monozyten. Zudem fand sich nach mehrstündiger LPS-Stimulation ein Anstieg der Expression von CD11b, CD18, LFA-1, ICAM-1 und CD40 auf Monozyten, sowie eine Abnahme der Expression von PSGL-1. Ebenso konnte auch eine Abnahme der PFC-Fluoreszenzintensität für MHC-II^{low} Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregate beobachtet werden, dies konnte für die MHC-II^{high} Population nicht repliziert werden.

Zusammengefasst konnte im Rahmen dieser Arbeit eine kompakte, aber zuverlässige Methode zur durchflusszytometrischen Detektion humaner Monozyten und ihrer Subpopulationen etabliert werden. Diese diente als Basis für weitere, umfassende Analysen der Monozyten, inklusive ihrer Interaktion mit Plättchen und die Untersuchung der Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren, welche zur Interaktion mit Plättchen beitragen. Weiterhin wurde die Phagozytosefähigkeit der Monozyten untersucht, diese zeigte sich erhöht nach Interaktion mit Plättchen. Diese Untersuchungen wurden anschließend an LPS-stimulierten Zellen wiederholt, um potenzielle Unterschiede zu detektieren. Da die ursprüngliche *Gating*-Strategie für Monozyten sich unter LPS nicht bewährte, konnten keine eindeutigen Aussagen diesbezüglich getroffen werden.

6.1 Durchflusszytometrische Darstellung von Monozyten und ihren Subpopulationen

Durch eine Optimierung der durchflusszytometrischen Analyse von Monozyten und Monozyten-subpopulationen kann die Forschung bedeutend profitieren, da es sich um eine sehr heterogene Zellpopulation handelt, deren Funktion jedoch unerlässlich im Rahmen der Immunabwehr ist. Um diese komplexen Funktionsvorgänge konkret zu untersuchen, braucht es eine zuverlässige Methode, um Monozyten präzise und kontaminationsfrei darzustellen.

Die gängigste technische Methode der Wahl zur Darstellung und Analyse von Immunzellen ist die Durchflusszytometrie^{71,72}. Hierbei wird das von den Zellen ausgehende Streu- und Fluoreszenzlicht gemessen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*) geht mit der Größe der Zelle einher, während das Seitwärtsstreulicht (SSC, *side scatter*) Auskunft über die Granularität der Zellen gibt⁶². Die Zellen können anschließend basierend auf ihrer Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker, welche zuvor mit einem fluoreszenzgebundenen Antikörper markiert wurden, genauer eingegrenzt werden⁶². Jedoch existieren diverse unterschiedliche Herangehensweisen bei der durchflusszytometrischen Identifikation von Monozyten und ihren Subpopulationen. So nutzen Thomas et al. (2017) eine ausführliche *Gating*-Strategie, die sich auf CD14, CD16, CCR2, CD36, MHC-II und CD11b stützt⁷³. Eine solch umfangreiche Methode zur Darstellung von Monozyten ist oftmals aufgrund von Durchflusszytometern mit weniger Laserkapazitäten nicht möglich. Zudem nimmt mit der Anzahl der *Gating*-Schritt auch die potenzielle Rate an Fehlerquellen, sowohl in der Probenaufbereitung als auch in der durchflusszytometrischen Auswertung zu. Ähnlich verhält es sich auch mit der von Ong et al. (2019) beschriebenen *Gating*-Strategie, welche zur Detektion von Monozyten CD33, CD86, CD64, MHC-II und CCR2 vorsieht⁷⁰.

Andere Arbeitsgruppen nutzen wiederum sehr kompakte *Gating*-Strategien, so beispielsweise auch Merah-Mourah et al. (2020) – hier wurde die Identifikation der Monozyten alleine mittels CD14 und CD16 bewerkstelligt⁷⁴. Eine ähnliche Herangehensweise wurde auch im Rahmen dieser Dissertation mittels *Gating*-Strategie A (Abbildung 5A) erprobt. Hier wurde neben CD14 und CD16 auch CD11b zur ersten groben Identifikation der Leukozyten genutzt. Bei CD11b handelt es sich um ein Integrin, welches auf neutrophilen Granulozyten, Monozyten, natürlichen Killerzellen und einigen Lymphozyten exprimiert wird^{75,76} und daher zur ersten Differenzierung der Leukozyten während des *Gating*-Prozesses genutzt werden kann. Die Herausforderung hierbei ist jedoch die Positionierung des entsprechenden *Gates*, denn ein zu großzügiges *Gate* bedingt

eine Kontamination der Monozytenpopulation mit anderen Zellen, während bei einem zu kleinen *Gate* ein Verlust der Monozytenpopulation im Verlauf riskiert wird.

Einen Ansatz, um die Kontamination der Monozytenpopulation trotz der limitierten Kapazitäten des Durchflusszytometers zu minimieren stellte *Gating*-Strategie B da. Hier wurden CD3, CD209 und CD19 verwendet um respektive T-Zellen⁷⁷, dendritische Zellen⁷⁸ und B-Zellen⁷⁹ zu markieren. Alle drei genutzten Antikörper stellten sich im FITC-Kanal da, sodass die FITC⁺ Zellen gegen die CD11b⁺ Zellen aufgetragen werden konnten, um eine Abgrenzung der kontaminierenden Zellen zu ermöglichen. Bei der Darstellung der Subpopulationen zeigte sich jedoch weiterhin die bei *Gating*-Strategie A gesehene Kontamination der Monozytenpopulation. Hieraus folgte die Schlussfolgerung, dass die Kontamination durch CD11b⁺/CD16⁺ aber CD14⁻/CD3⁻/CD209⁻/CD19⁻ Zellen bewerkstelligt werden muss. Diese Konstellation an Oberflächenmarkern findet sich mitunter auf NK-Zellen^{80,81}, sodass *Gating*-Strategie C sich folglich auf die Eliminierung von NK-Zellen fokussierte. Dazu wurde die von Marimuthu et al. (2018) beschriebene *Gating*-Strategie, welche mit CD14, CD16 und MHC-II NK-Zellen aus der Monozytenpopulation eliminiert⁶⁷, modifiziert und durch CD11b zur initialen konkreten Abgrenzung der Leukozytenpopulation, sowie zur Eliminierung potentiell überbleibender B-Zellen⁷⁶ ergänzt. Die Anwendung dieser Strategie bietet einen guten Kompromiss zwischen einer zuverlässigen und ausführlichen *Gating*-Strategie, die jedoch dennoch kompakt genug ist, um auch bei Durchflusszytometern mit geringeren Laserkapazitäten genutzt zu werden. Bei Nutzung der *Gating*-Strategie C zeigte sich eine erhebliche Reduktion der zuvor beschriebenen Kontamination in der Population der Monozyten (Abbildung 5D).

Die Kontamination zeigte sich in ausgeprägter Nähe zur Population der CD16⁺ nicht-klassischen Monozyten, sodass annehmbar ist, dass die gängigen Literaturwerte hinsichtlich der relativen Verteilung der Monozytensubpopulationen durch die beschriebene Kontamination nicht präzise sind. Dies spiegelt sich auch in den starken Abweichungen der angegebenen Werte wider. So fassten Sampath et al. (2018) die abweichenden Angaben für die Menge der nicht-klassischen Monozyten als eine Spanne von 2-11% aller Monozyten zusammen⁵. Die Undurchsichtigkeit bezüglich der Menge der nicht-klassischen Monozyten wird durch die von Yona et al. (2010) genutzte vage Beschreibung der „seltener als klassischen Monozyten vorkommenden nicht-klassischen Monozyten“ weiter untermauert⁸². Infolge der in dieser Dissertation beschriebenen *Gating*-Strategie C stellte sich ein Anteil der nicht-klassischen Monozyten von etwa 4% dar. Die geringe Standardabweichung von etwa $\pm 2\%$ wirkt der in der Literatur beschriebenen großen Spanne unterschiedlicher Angaben für die Menge der nicht-klassischen Monozyten entgegen und reduziert diese infolge einer verlässlichen und stets reproduzierbaren *Gating*-Strategie maßgeblich.

Zur besseren Bewertung der in dieser Arbeit beschriebenen *Gating*-Strategien wurden drei Kriterien definiert, die die Qualität der jeweiligen Strategie abbilden sollen. Die Annäherung an die Literaturwerte wird für jede Subpopulation einzeln bewertet. Mit Reproduzierbarkeit wird beschrieben, wie akkurat die Monozyten von anderen Populationen abgegrenzt werden können. Diese ist neben der Spendervariabilität und der Strategie selbst auch vom Experimentator abhängig und geht mit der in Abbildung 5D dargestellten Standardabweichung einher. Die Kontamination ist teilweise an die Reproduzierbarkeit gebunden, denn sie beschreibt das

Vorhandensein anderer Zellpopulationen in der Monozyten-Population. Für jeden Kriterium werden maximal 5 Punkte vergeben. Je höher die vergebene Punktzahl, desto idealer ist die betroffene *Gating*-Strategie hinsichtlich des entsprechenden Kriteriums. Dementsprechend bedeutet eine Punktzahl von 5, dass die betroffene Strategie für das definierte Kriterium nahezu ideal ist. Die maximal erreichbare Punktzahl liegt folglich bei 25.

Tabelle 10: Bewertung der verschiedenen *Gating*-Strategien zur idealen Identifikation von Monozyten und ihren Subpopulationen. Maßgeblich zur Beurteilung der Strategien sind neben der Annäherung an die Literaturwerte auch die Reproduzierbarkeit und Kontamination.

	Annäherung an Literaturwerte			Reproduzierbarkeit ($\pm$ SD)	Kontamination	Summe
	klassisch	intermediär	nicht-klassisch			
Strategie A	4	2	3	3	2	14
Strategie B	3	3	1	3	1	11
Strategie C	5	4	4	5	5	22

Die Überlegenheit der Methode, die eine Markierung gegen MHC-II-Moleküle zur Elimination interferierender Populationen vorsieht, spiegelt sich auch im direkten Vergleich der quantitativen Analysen wider. Insbesondere bei Strategie B fällt ein geringerer Anteil der klassischen und intermediären Monozyten auf, welcher am ehesten durch die hohe Kontamination durch NK-Zellen bedingt ist. Ein ähnlicher Effekt kann auch bei Strategie A, jedoch in geringerer Ausprägung, beobachtet werden. Lediglich die Verwendung von MHC-II ergibt eine bestmögliche Annäherung an die bekannten Literaturwerte für die Monozytensubpopulationen und garantiert dabei die Darstellung der Monozyten ohne nennenswerte Kontamination. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die weiteren Proben, die in dieser Arbeit ausgewertet werden, entsprechend der *Gating*-Strategie C bearbeitet.

6.2 Identifizierung potenzieller Interaktionspartner in der Bildung von Monozyten-Plättchen-Aggregaten

Die optimale durchflusszytometrische Identifikation von Monozyten und Monozytensubpopulationen bildet die Grundlage für weiterführende morphologische und funktionelle Analysen. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist die Untersuchung von Monozyten-Plättchen-Aggregaten. Bereits 1991 beschrieben Rinder et al., dass sowohl aktivierte wie inaktivierte Plättchen mit Leukozyten interagieren⁸³. Seither konnte eine verstärkte Interaktion von Plättchen mit Leukozyten bei diversen, insbesondere kardiovaskulären, Erkrankungen festgestellt werden⁸⁴. Die Mechanismen, die bei der Interaktion von Relevanz sein könnten, sind jedoch bis heute nicht vollständig geklärt. Rolling et al. (2023) fassten drei Mechanismen der Monozyten-Plättchen-Interaktion zusammen: die Freisetzung von Granula, welche Chemokine und Zytokine beinhalten, die Freisetzung von Vesikeln sowie die direkte Bindung von Plättchen an Monozyten⁵⁵. Letzteres wurde auch im Rahmen dieser Dissertation genauer analysiert. Hierzu wurden verschiedene Oberflächenrezeptoren auf der Oberfläche von Monozyten und Plättchen untersucht, um herauszufinden welche dieser an der Aggregatbildung beteiligt sein könnten.

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass PSGL-1 auf der Oberfläche der Monozyten mit P-Selektin auf den Plättchen als primäre Interaktionspartner bei der Bildung von Monozyten-Plättchen-Aggregaten gelten und diese Bindung erst die Interaktion weiterer Rezeptoren mit ihren Liganden ermöglicht^{83,85}. So zum Beispiel interagiert CD40 auf den Monozyten mit CD40L auf den Plättchen im Anschluss an die initiale Bindung von P-Selektin an PSGL-1^{83,85}. Außerdem beschrieben Kral et al. eine Bindung von Mac-1, einem Integrin bestehend aus CD11b und CD18, an P-Selektin⁵², sowie die Interaktion von ICAM-1 auf den Monozyten mit plättchengebundenem Fibrinogen⁵². Zudem ist beschrieben, dass LFA-1 auf der Oberfläche von Leukozyten mit endothelgebundenem ICAM-1 interagieren kann⁸⁶. Die Übertragbarkeit dieser Bindung auf eine Interaktion mit Plättchen wurde ebenfalls im Rahmen dieser Dissertation geprüft. Bei GPIIb/IIIa, auch bekannt als CD41/CD61, handelt es sich um ein auf den Thrombozyten lokalisiertes Integrin, welches für seine Rolle im Rahmen der Plättchenaktivierung bei der Blutgerinnung bekannt ist⁸⁷, die Relevanz für die Interaktion mit Leukozyten ist jedoch bislang unklar, aber Scholz et al. konnten feststellen, dass die Anwendung des GPIIb/IIIa-Antagonisten Eptifibatid in einer Erhöhung der Menge von Plättchen-Leukozyten-Komplexen resultiert⁸⁸.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Expression von Oberflächenrezeptoren auf Thrombozyten wurden CD41, P-Selektin, ICAM-1, GPIIb/IIIa und CD40L näher beleuchtet. Die Oberflächenrezeptoren wurden zunächst im inaktiven Zustand der Plättchen und anschließend im ADP-stimulierten Zustand analysiert. Für CD41, dem Fibrinogenrezeptor der Plättchen⁸⁹, zeigte sich eine konstitutive Expression bereits im stimulierten Zustand, sodass durch Stimulation keine Hochregulation des Oberflächenrezeptors mehr möglich ist. Daher eignet sich CD41 auch als ein zuverlässiger Marker zur Detektion plättchengebundener Leukozyten.

Für P-Selektin konnte eine eindeutige Hochregulation der Expression des Markers durch ADP-Stimulation verzeichnet werden. Bei Stimulation der Plättchen fusionieren Granula mit der Plasmamembran, sodass P-Selektin an die Zelloberfläche transportiert wird⁹⁰ und in einer durchflusszytometrisch messbaren erhöhten Expression von P-Selektin resultiert. Dies könnte folglich auch mit einer vermehrten Bildung von Monozyten-Plättchen-Aggregaten einhergehen, da die erhöhte Expression von P-Selektin auch eine vermehrte Bindung von PSGL-1 – den primären Interaktionspartnern in der Bildung von Monozyten-Plättchen-Aggregaten^{83,85} – bedingen könnte.

CD40L konnte in dieser Arbeit durchflusszytometrisch nicht auf humanen Plättchen nachgewiesen werden. Nach Cognasse et al. (2022) ist CD40L in inaktiven Plättchen lediglich intrazellulär vorhanden, nach Aktivierung gelangt dieses dann an die Oberfläche⁹¹ und kann anschließend mitunter zur Differenzierung von Monozyten in dendritische Zellen beitragen⁹².

Für GPIIb/IIIa zeigte sich ein Anstieg der Expression nach ADP-Aktivierung, dieser Effekt einer ADP-Stimulation ist bereits im Rahmen der Hämostase bekannt. Die vermehrte Expression kommt durch eine Konformationsänderung des Komplexes zustande⁹³, die Relevanz von GPIIb/IIIa für die Monozyten-Plättchen-Interaktion ist jedoch nicht bekannt.

ICAM-1 stellte sich in dieser Dissertation als durchflusszytometrisch nicht messbar auf humanen Plättchen dar. In der Literatur finden sich auch keine eindeutigen Hinweise auf eine Expression

von ICAM-1 auf humanen Plättchen. Armstrong et al. beschrieben jedoch, dass ICAM-1 auf murinen Plättchen über Fibrinogen an der Interaktion mit Monozyten beteiligt ist⁹⁴. Kral et al. analysierten dies in humanem Blut und fanden, umgekehrt zu den murinen Analysen, die Fibrinogen-vermittelte Interaktion von Plättchen und Monozyten über monozytengebundenes ICAM-1⁵². Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde ICAM-1 auf humanen Monozyten analysiert, hier zeigte sich eine mäßige Expression von ICAM-1 auf der Oberfläche der Monozyten in allen Subpopulationen, welche für CD41⁻ und CD41⁺ Monozyten nahezu identisch ist. Folglich ist keine eindeutige Aussage über die Relevanz von ICAM-1 bei der Interaktion von Monozyten und Plättchen möglich.

Neben ICAM-1 wurden auch multiple andere Oberflächenrezeptoren auf den Monozyten untersucht. CD14, CD16 und MHC-II – als wichtige Bestandteile der in dieser Arbeit präferierten *Gating*-Strategie – wurden hinsichtlich ihrer Verteilung auf den Monozytensubpopulationen untersucht. Hier zeigte sich eine geringe Expression von CD14 auf den nicht-klassischen Monozyten, während CD16 sich primär auf intermediären und nicht-klassischen Monozyten zeigte. MHC-II ist am deutlichsten auf intermediären und auch auf nicht-klassischen Monozyten vorhanden. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen CD41⁻ und CD41⁺ Monozyten in allen Subpopulationen für alle hier beschriebenen Oberflächenrezeptoren. Diese Ergebnisse sind auch konform mit der unter 6.1 beschriebenen durch CD16⁺ NK-Zellen verursachte Kontamination der CD16⁺ intermediären und insbesondere nicht-klassischen Monozyten. Die effiziente Beseitigung der Kontamination mittels MHC-II wird weiter untermauert durch die primäre Expression von MHC-II auf CD16⁺ Monozyten.

CD11b und CD18, als Bestandteile von Mac-1, wurden jeweils einzeln untersucht. CD11b wird primär auf klassischen und intermediären Monozyten exprimiert, dies wurde auch 2021 von Rasmussen et al. beschrieben⁹⁵. Die vermehrte Expression von CD11b auf klassischen Monozyten wurde auch 2023 von Williams et al. verifiziert⁹⁶. CD18 ist währenddessen vermehrt auf intermediären und nicht-klassischen Monozyten vorhanden. Dies suggeriert eine leicht unterschiedliche Zusammensetzung von Mac-1 je nach Monozytensubpopulation und damit potenziell einhergehend auch ein unterschiedliches Bindungsverhalten an Thrombozyten. Interessanterweise konnten Rasmussen et al. eine Veränderung der CD11b-Verteilung bei alkoholischer Hepatitis beobachten, mit einer Abnahme der Expression auf klassischen Monozyten und einer Zunahme der Expression auf intermediären und nicht-klassischen Monozyten, sodass davon auszugehen ist, dass auch im Rahmen von Erkrankungen potenziell eine Veränderung des Bindungsverhaltens an Thrombozyten zu beobachten wäre⁹⁵.

LFA-1, bestehend aus CD11a und CD18⁹⁷, konnte trotz des eindeutigen Nachweises von CD18 alleine in dieser Arbeit auf keiner Monozytensubpopulation, plättchenungebunden sowie plättchengebunden, durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Dies ist am ehesten auf die Einstellung des Durchflusszytometers zurückzuführen. In der Literatur ist insbesondere die Relevanz von LFA-1 für die endotheliale Adhäsion beschrieben. Malik et al. beschrieben eine Abnahme der endothelialen Adhäsion im Gehirn bei erniedrigter LFA-1 Expression⁹⁸ während Rains et al. eine erhöhte endotheliale Adhäsion bei erhöhter LFA-1 Expression im Rahmen einer Hyperketonämie untersuchten⁹⁹. Die Rolle von LFA-1 bei der Interaktion mit Plättchen bleibt

jedoch ungeklärt. Eine Interaktion über Fibrinogen mittels ICAM-1, wie oben beschrieben, ist dennoch nicht auszuschließen.

Für CD40 zeigte sich eine vermehrte Expression auf CD16⁺ intermediären und nicht-klassischen Monozyten, hier konnten ebenfalls keine eindeutigen Unterschiede zwischen CD41⁺ und CD41⁻ Monozyten festgestellt werden. Das Verteilungsmuster wurde bereits von Mužinić et al. beschrieben, es wurde auch eine Zunahme der Expression von CD40 bei multipler Sklerose beobachtet, was für eine proinflammatorische Wirkung des Rezeptors spricht¹⁰⁰. Der Ligand des Rezeptors, CD40L, wird bekanntermaßen auf Plättchen exprimiert¹⁰¹. Auch wenn dies im Rahmen dieser Dissertation nicht nachgewiesen werden konnte, ist somit vorstellbar, dass über die Interaktion von CD40 und CD40L insbesondere CD16⁺ Monozyten mit Plättchen interagieren. Da CD16⁺ nicht-klassische Monozyten vermehrt inflammatorische Zytokine produzieren¹², ist dies auch mit dem von Mužinić et al. beobachteten Effekt im Rahmen der multiplen Sklerose vereinbar.

PSGL-1 stellte sich vermehrt auf den nicht-klassischen Monozyten dar, allerdings ist der Unterschied zwischen den Monozytensubpopulationen, wie auch zwischen den plättchengebundenen und plättchenungebundenen Monozyten, geringfügig. In Mäusen ist PSGL-1 vermehrt auf Ly-6C^{high} Monozyten¹⁰², entsprechend den humanen klassischen Monozyten^{103,104}, vertreten und beteiligt sich da an der Pathogenese der Artherosklerose¹⁰². Da es sich bei PSGL-1 und P-Selektin um die primären Interaktionspartner bei der Formation von Monozyten-Plättchen-Aggregaten handelt ist also anzunehmen, dass diese Bindung insbesondere mit nicht-klassischen Monozyten von statten geht.

6.3 Phagozytose von Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregaten

Um auch funktionelle Aspekte der Interaktion von Monozyten mit Plättchen zu beleuchten, wurde die Phagozytosefähigkeit dieser näher untersucht. Hierzu wurden Perfluorkarbon-Nanoemulsionen genutzt, bei welchen es sich um fluoreszierende Nanopartikel handelt. Diese wurden gemeinsam mit aus dem Blut gewonnenen Monozyten und Plättchen inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch bzw. fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Ein wesentliches Ergebnis dieser Untersuchungen ist die verbesserte Phagozytosefunktion der Monozyten nach Bindung an Plättchen. Die mittlere Fluoreszenzintensität der phagozytierten PFCs ist für die Monozyten-Plättchen-Aggregate aller Subpopulationen deutlich höher als für ungebundene Monozyten. Vergleichbare Untersuchungen bestätigen diesen Effekt auch für plättchengebundene neutrophile Granulozyten¹⁰⁵. Bereits 1999 erkannten Peters et al. die Zunahme der Phagozytose von plättchengebundenen neutrophilen Granulozyten¹⁰⁶ und schon drei Jahre zuvor analysierten Zalavary et al. den dahinterstehenden Mechanismus: Plättchen verstärken die Fcγ-Rezeptor vermittelte Phagozytose und auch den oxidativen Burst über einen ATP-abhängigen Mechanismus¹⁰⁷. Für Monozyten ist der Mechanismus der Phagozytose im Rahmen einer Bindung an Plättchen weniger gut untersucht. Mariscal et al. bestätigten die verstärkte Phagozytose plättchengebundener Monozyten, insbesondere wenn die Plättchen sich in einem aktivierten Zustand befinden¹⁰⁸. Insbesondere konnte die vermehrte Phagozytose bei der Aufnahme von Bakterien beobachtet werden, der hier vermutete Mechanismus beruht auf der

Expression von TLR-4 auf Plättchen, welches an das LPS der Bakterien binden und es somit phagozytieren kann^{109,110}.

Die Funktion der Monozyten im Rahmen der Phagozytose findet große Relevanz bei Erkrankungen aus nahezu jedem Spektrum der Medizin. Bei rheumatisch-entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis konnte eine verstärkte Phagozytose von *Staphylococcus aureus* und *Proteus mirabilis* verzeichnet werden¹¹¹. Auch beim systemischen Lupus Erythematoses konnten Katsiari et al. eine erhöhte Phagozytose durch Monozyten messen³². Ebenso zeigt sich auch eine erhöhte phagozytotische Aktivität der Monozyten bei neurologischen Erkrankungen, so konnten Wijeyekoon et al. bereits in den frühen Stadien des Morbus Parkinson eine vermehrte Phagozytose nachweisen¹¹². Auch bei gastroenterologischen Erkrankungen, wie beispielsweise Morbus Crohn – eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung – zeigt sich eine erhöhte phagozytotische Aktivität der Monozyten, welche sogar mit entsprechenden genetischen Varianten von ATG16L1 und NOD2 assoziiert wird¹¹³. Sogar im Laufe der 40 Wochen einer Schwangerschaft zeigt sich eine zunehmend erhöhte Phagozytose durch Monozyten¹¹⁴. Im Rahmen der Krebsforschung konnte schon vor über 40 Jahren eine vermehrte Phagozytoseaktivität der Monozyten festgestellt werden¹¹⁵. Neuere Untersuchung jedoch zeigen eine Abnahme der phagozytotischen Aktivität von Monozyten im fortgeschrittenen Stadium des Mammakarzinoms¹¹⁶. 2017 schlüsselten Gorden et al. den zugrunde liegenden Mechanismus für Makrophagen auf: Die Expression von PD-1, einem Immuncheckpoint-Rezeptor, auf tumor-assoziierten Makrophagen, inhibiert ihre phagozytotische Funktion¹¹⁷. Der therapeutische Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren kann dem entgegenwirken¹¹⁷. Die Sepsis, als Maximalform von Inflammation, ist wie nahezu alle zuvor genannten Erkrankungen auch, mit einer Erhöhung der phagozytotischen Funktion von Monozyten vergesellschaftet^{36,118,119}.

Interessanterweise zeigte sich bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Phagozytosefähigkeit von Plättchen und THP-1 Zellen, als Modell für Monozyten, eine stärkere phagozytotische Aktivität der Plättchen als der THP-1 Zellen. Die hierfür genutzten Rhodamin-PFCs wurden von aus humanem Blut isolierten Plättchen stärker aufgenommen als von den THP-1 Zellen. Bereits 1965 wurden Plättchen eine phagozytotische Fähigkeit zugeschrieben, als Movat et al. beobachteten, wie sie Latex-Partikel phagozytierten¹²⁰. Genauer beschrieben wurde der Mechanismus von Zucker-Franklin et al. im Jahre 1981, hier wurde eine Endozytose der Plättchen ohne Fusion der Granula zur Aufnahme von Partikeln in das offene kanalikuläre System beobachtet¹²¹. Nagasawa et al. konnten einen relevanten Anteil der phagozytotischen Vorgänge in niederen Vertebraten auf die Plättchen zurückführen, sodass die Relevanz der phagozytotischen Funktion von Plättchen auch *in vivo* nachvollzogen werden konnte¹²². Der konkrete Mechanismus der Endo- und Phagozytose von Plättchen bleibt bis heute jedoch weitestgehend unverstanden. Es findet sich ebenso kein Nachweis, dass Plättchen quantitativ mehr Phagozytose betreiben als Leukozyten. Bei dem Mechanismus, der bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen in dieser Arbeit aber potenziell stattgefunden haben könnte, könnte es sich jedoch vermehrt um Endo- statt Phagozytose handeln. Die große Diskrepanz bezüglich der Phagozytosefähigkeit von THP-1 Zellen und Plättchen ist womöglich auf technische Details zurückzuführen. Eine molekulare Divergenz der THP-1 Zellen unterschiedlicher Biorepositorien wurde von Noronha et al. beschrieben, daher ist anzunehmen, dass die unterschiedlichen funktionellen Kapazitäten der THP-1 Zellen in unterschiedlichen Artikeln mitunter hiervon beeinflusst wurden¹²³.

6.4 Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregate unter entzündlichen Bedingungen

Nachdem die Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregate ausgiebig unter normalen Bedingungen analysiert wurden, wurden dieselben Analysen auch unter entzündlichen Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurden die Monozyten mit LPS stimuliert, um eine unspezifische Entzündung des Körpers zu simulieren. Hier zeigte sich jedoch eine Instabilität der CD14- und CD16-Expression auf der Oberfläche der Monozyten. Infolge der LPS-Stimulation nahm die CD16-Expression maßgeblich ab, während die CD14-Expression ebenfalls starken Schwankungen unterlag. Diese Veränderungen wurden auch von Ong et al. beschrieben⁷⁰. Aus diesen Gründen wurde eine alternative Einteilung der Monozytensubpopulationen etabliert, welche auf den Untersuchungen von Ong et al. basierten: Es wurde eine MHC-II^{low}/CCR2^{high} und eine MHC-II^{high}/CCR2^{low} Population definiert. Die Monozyten wurden zuvor weiterhin mittels CD11b präselektiert. Die MHC-II^{low} Population ist vereinbar mit den CD16⁻ klassischen Monozyten, während die MHC-II^{high} Population am ehesten den CD16⁺ intermediären und nicht-klassischen Monozyten entspricht⁷⁰. Diese alternative *Gating*-Strategie bietet eine Möglichkeit für durchflusszytometrische Untersuchungen der Monozyten und ihrer Subpopulationen unter LPS-Einwirkung und stellt somit die Grundlage für die darauffolgenden Analysen dar. Dennoch ist zu bedenken, dass die Vergleichbarkeit zwischen den Untersuchungen der vorherigen Abschnitte und diesem Abschnitt dementsprechend nur eingeschränkt möglich ist.

In den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte sich allenfalls ein geringer Anstieg der MHC-II^{high} Monozyten infolge einer Stimulation der Zellen mit LPS. Dies entspricht einem Anstieg der CD16⁺ Monozyten, also nicht-klassischer und intermediärer Monozyten. Tak et al. beschrieben einen gegenteiligen Effekt, hier wurde eine Abnahme aller Subpopulationen durch LPS-Stimulation beobachtet¹²⁴. Thaler et al. wiederum konnten – wie auch in dieser Dissertation – eine deutliche Zunahme der CD16⁺, intermediären Monozyten durch Stimulation mit LPS beobachten¹²⁵. Die Diskrepanz der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse ist am ehesten auf die instabile Expression der Oberflächenmarker infolge einer LPS-Exposition zurückzuführen.

Infolge einer Stimulation mit LPS konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass sowohl der relative Anteil der Monozyten-Plättchen-Aggregate als auch die Fluoreszenzintensität von monozytengebundenem CD41, in beiden Subpopulationen abnimmt. Allerdings tritt dieser Effekt auch ohne Zugabe von LPS nach einstündiger Inkubation auf, sodass es durchaus möglich ist, dass die Zellen in dieser Inkubationszeit absterben. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit auch ausgiebig analysiert und in Abbildung 15 dargelegt. Jedoch beschrieben Guessous et al. 2005 schon, dass die Stimulation monozytischer Zellen mit LPS oder Shigatoxin zur Freisetzung von Chemokinen wie IL-8 führt, wodurch die Bildung von Monozyten-Plättchen-Aggregaten eigentlich gefördert wird¹²⁶. Es ist also anzunehmen, dass das hohe Absterben der Zellen im Rahmen der Inkubation und LPS-Stimulation den eigentlich zu erwartenden Effekt der Zunahme von Monozyten-Plättchen-Aggregaten maskiert. Das Absterben der Zellen wurde ebenfalls von Ponath et al. beobachtet, diese führten den Tod der Monozyten auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch aktivierte Makrophagen und neutrophile Granulozyten während der Inkubation zurück¹²⁷.

Ein weiterer Aspekt, der unter entzündlichen Bedingungen untersucht wurde, ist die Expression von Oberflächenrezeptoren auf der Oberfläche der Monozyten. Hier wurde keine Differenzierung der Subpopulationen vorgenommen. Wie auch von Lichte et al. und Juffermans et al. schon beobachtet, führt eine LPS-Stimulation der Monozyten zu einer Zunahme der Expression von CD11b auf ihren Oberflächen^{128,129}. CD11b initiiert die Produktion von TNF- α , sodass eine LPS-Stimulation mit einer vermehrten TNF- α -Produktion einhergeht¹³⁰. So zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit auch eine vermehrte Expression von CD18 nach LPS-Stimulation. Da CD11b und CD18 ein gemeinsames Integrin darstellen, ist auch hier auf eine vermehrte TNF- α -Produktion zu schließen¹³⁰. LFA-1 zeigte sich auch nach LPS-Stimulation vermehrt exprimiert, dies konnte zwar in der Literatur nicht bestätigt werden, jedoch konnten Mentzer et al. eine vermehrte LFA-1 Expression durch IFN- γ nachweisen¹³¹, sodass sich möglicherweise schlussfolgern lässt, dass LFA-1 infolge eines unspezifischen proinflammatorischen Stimulus vermehrt exprimiert wird. LFA-1 beteiligt sich unter anderem an der Bindung von Monozyten an T-Zellen und der T-Zell-Aktivierung¹³² und trägt mit diesem Mechanismus zur Bekämpfung von pathogenen Erregern bei. ICAM-1 wird ebenfalls durch LPS-Stimulation verstärkt exprimiert, dies wurde bereits 1997 von Heinzelmann et al. beobachtet¹³³. ICAM-1 ist an der Zell-Adhäsion von Monozyten an endotheliale Zellen – und somit an der Zellmigration – beteiligt^{134,135}. Somit lässt sich schlussfolgern, dass unter entzündlichen Bedingungen eine verstärkte ICAM-1-vermittelte Zelladhäsion und -migration stattfindet. Für CD40 ließ sich in dieser Arbeit kein konkreter Effekt unter einer LPS-Stimulation verzeichnen. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass eine LPS-Stimulation eine vermehrte CD40-Expression bewerkstelligen kann^{136,137}. CD40 kann eine T-Zell-Aktivierung ermöglichen, es ist aber auch an der Sekretion von IL-12 beteiligt, wodurch z.B. die Differenzierung der T-Zellen zu CD4⁺ T-Zellen aktiviert wird¹³⁸. Somit ist auch CD40 von essenzieller Bedeutung in einer entzündlichen Situation des Körpers. Die Expression von PSGL-1 nimmt nach LPS-Stimulation deutlich ab, hier korreliert die Dauer der Exposition mit LPS auch mit der Abnahme von PSGL-1. Wie zuvor schon erläutert ist PSGL-1 der Hauptmediator in der Bindung von Monozyten und Plättchen. Die Abnahme der Expression von PSGL-1 ist womöglich damit zu begründen, dass die Bindungsstellen durch P-Selektin der Plättchen infolge einer vermehrten Bindung von Monozyten an Plättchen bereits besetzt sind. Ein anderer Erklärungsansatz wurde von Davenpeck et al. im Jahre 2000 vorgeschlagen. Hier wird suggeriert, dass die verminderte Expression von PSGL-1 an einer Ablösung der Oberflächenrezeptoren von der Oberfläche der Monozyten liegt¹³⁹. Dem würde jedoch entgegenstehen, dass in der Literatur eine vermehrte Bindung von Monozyten and Plättchen unter LPS-Stimulation nachgewiesen wurde, diese wäre ohne PSGL-1 gar nicht erst möglich.

Zuletzt wurde untersucht, ob es nach LPS-Stimulation zu einer vermehrten Phagozytose durch Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregate kommt. Diese Analyse für beide Monozyten-subpopulationen getrennt durchgeführt. Eine verstärkte Phagozytose nach LPS-Stimulation konnte hier nicht festgestellt werden, es zeigte sich im Gegenteil eher eine Abnahme der Phagozytose von PFCs, welche jedoch auch schon nach einstündiger Inkubation ohne LPS ersichtlich war und so womöglich erneut auf das starke Absterben der Zellen zurückzuführen ist. Die phagozytotische Funktion von Monozyten unter entzündlichen Bedingungen ist auch in der Literatur weitgehend unerforscht, Karsulovic et al. beschrieben 2021 eine vermehrte Phagozytose der klassischen Monozyten nach LPS-Stimulation¹⁴⁰. Es ist jedoch auch erwähnenswert, dass Baran

et al. schon 1996 beobachteten, dass Monozyten nach der Phagozytose von Bakterien nach 2-4 Stunden eine Apoptose durchlaufen¹⁴¹ und somit nicht auszuschließen ist, dass es sich nach der Phagozytose von anderen Partikeln und Substanzen ähnlich verhält. Zudem ist das zur Stimulation genutzt LPS ebenfalls ein Bestandteil bakterieller Zellwände¹⁴² und wird womöglich ebenso von den Monozyten phagozytiert¹⁴³, dies könnte auch den Tod der Zellen *in vitro* induzieren und erschwert eine eindeutige Aussage über die funktionellen Kapazitäten von Monozyten unter entzündlichen Bedingungen.

6.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit wurden umfangreiche Untersuchungen zu Monozyten-Plättchen-Aggregaten hinsichtlich ihrer Morphologie und Funktion unter gesunden und entzündlichen Bedingungen durchgeführt. Zuerst wurde ein Protokoll zur zuverlässigen, kontaminationsfreien Darstellung der drei Monozytensubpopulationen entwickelt. Die Nutzung von CD11b, CD14, CD16 und MHC-II erlaubt eine verlässliche Methode zur durchflusszytometrischen Untersuchung der Monozytensubpopulationen, welche eine essenzielle Grundlage für weiterführende Analysen zur weiteren Erforschung der Relevanz und Funktion dieser ist. Eine zusätzliche Färbung der Zellen gegen CD41 erlaubt die Darstellung der Monozyten-Plättchen-Aggregate für jeweils jede Subpopulation. Die Interaktion konnte auch anhand eines Modells mittels THP-1 Zellen *in vitro* sowohl durchflusszytometrisch als auch fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Hier konnte nicht abschließend nachgewiesen werden, ob ein stimulierter Zustand der THP-1 Zellen oder Plättchen für die Aggregatbildung von größerer Relevanz ist. Außerdem wurden die Oberflächenrezeptoren beider Interaktionspartner untersucht, hier zeigte sich insbesondere ein Anstieg von P-Selektin auf der Oberfläche der Thrombozyten nach Aktivierung dieser mittels ADP. CD40L und ICAM-1 konnten gar nicht nachgewiesen werden, während CD41 konstitutiv nachweisbar war. GPIIb/IIIa konnte durch ADP-Aktivierung der Plättchen hochreguliert werden. Für die Monozyten wurden die Oberflächenrezeptoren nach ihren Subpopulationen getrennt untersucht, hier konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen plättchenungebundenen und plättchengebundenen Monozyten detektiert werden. Weiterhin wurde die Phagozytosefähigkeit der Zellen untersucht, es zeigte sich hierbei ein Anstieg der Phagozytose von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen plättchengebundener Monozyten in allen drei Subpopulationen. Die Aufnahme von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen konnte auch fluoreszenzmikroskopisch im THP-1-Zell-Modell nachgewiesen werden, hier stellte sich eine stärkere Phagozytose seitens der Plättchen als der THP-1 Zellen dar. Dies sollte künftig auch quantitativ verifiziert werden. Abschließend wurden die Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregate unter entzündlichen Bedingungen nach LPS-Stimulation betrachtet, diese Untersuchungen gestalteten sich aufgrund einer Veränderung in der Expression von CD14 und CD16 nach LPS-Stimulation äußerst schwierig. Zukünftig sollte ein Protokoll etabliert werden, welches die Expression dieser beiden Oberflächenrezeptoren aufrechterhalten kann, sodass vergleichbare Analysen zwischen normalen und entzündlichen Bedingungen ermöglicht werden können. Es wurde eine alternative Methode, die CCR2 und MHC-II zur Detektion der Subpopulationen vorsieht, genutzt. Hier konnten keine relevanten Unterschiede in der Verteilung der Subpopulationen detektiert werden, es wurde lediglich eine Abnahme der Aggregatbildung und Aufnahme von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen beobachtet, welche sicherlich mitunter auf das starke Absterben der Zellen während der Inkubation zurückzuführen ist. Seitens der Monozyten zeigte sich eine Zunahme der Expression von CD11b,

CD18, LFA-1 und ICAM-1 nach LPS-Stimulation, während PSGL-1 – passend zur zunehmenden Expression von P-Selektin auf den Thrombozyten – abnahm. Die Relevanz und Übertragbarkeit der Ergebnisse einer *in vitro* Stimulation auf die *in vivo* Situation des Organismus, wie z.B. im Rahmen einer akuten Sepsis, bleibt unbeantwortet und bedarf weiterer Untersuchungen. Es lässt sich jedoch zusammenfassend sagen, dass Monozyten-Plättchen-Aggregate im entzündlichen Zustand sowohl morphologischen als auch funktionellen Veränderungen insbesondere im Hinblick auf die Phagozytose und Expression verschiedenster Oberflächenmarker unterliegen.

7 Literaturverzeichnis

1. Ożańska A, Szymczak D, Rybka J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2020;92(1):e12883. doi:10.1111/sji.12883
2. Spahn JH, Kreisel D. Monocytes in Sterile Inflammation: Recruitment and Functional Consequences. *Arch Immunol Ther Exp*. 2014;62(3):187-194. doi:10.1007/s00005-013-0267-5
3. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):762-774. doi:10.1038/nri3070
4. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:421-452. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326
5. Sampath P, Moideen K, Ranganathan UD, Bethunaickan R. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Frontiers in Immunology*. 2018;9.
6. Germic N, Frangez Z, Yousefi S, Simon HU. Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation. *Cell Death Differ*. 2019;26(4):715-727. doi:10.1038/s41418-019-0297-6
7. Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C. Antigen Presentation by Monocytes and Monocyte-derived Cells. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(1):52-60. doi:10.1016/j.coi.2007.10.010
8. Xiu F, Jeschke MG. Perturbed mononuclear phagocyte system in severely burned and septic patients. *Shock*. 2013;40(2):81-88. doi:10.1097/SHK.0b013e318299f774
9. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HWL. Identification and Characterization of a Novel Monocyte Subpopulation in Human Peripheral Blood. *Blood*. 1989;74(7):2527-2534. doi:10.1182/blood.V74.7.2527.2527
10. Vinci R, Pedicino D, Bonanni A, et al. A Novel Monocyte Subset as a Unique Signature of Atherosclerotic Plaque Rupture. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9. doi:10.3389/fcell.2021.753223
11. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, et al. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2019;10.
12. Wong KL, Tai JJY, Wong WC, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*. 2011;118(5):e16-e31. doi:10.1182/blood-2010-12-326355
13. Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, et al. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J Exp Med*. 2017;214(7):1913-1923. doi:10.1084/jem.20170355
14. Wong KL, Yeap WH, Tai JJY, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res*. 2012;53(1):41-57. doi:10.1007/s12026-012-8297-3
15. Chu HX, Arumugam TV, Gelderblom M, Magnus T, Drummond GR, Sobey CG. Role of CCR2 in inflammatory conditions of the central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014;34(9):1425-1429. doi:10.1038/jcbfm.2014.120
16. Park YM. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med*. 2014;46(6):e99-e99. doi:10.1038/emm.2014.38
17. Huh H, Pearce S, Yesner L, Schindler J, Silverstein R. Regulated expression of CD36 during

monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood*. 1996;87(5):2020-2028. doi:10.1182/blood.V87.5.2020.2020

18. Luo Q, Xiao P, Li X, et al. Overexpression of CD64 on CD14⁺⁺CD16⁻ and CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes of rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018;16(3):2703-2711. doi:10.3892/etm.2018.6452

19. Abd-Elhamid YA, Eltanawy RM, Fawzy RM, Fouad NA, Atlm AM. Expression of CD64 on Surface of Circulating Monocytes in Systemic Lupus Erythematosus Patients: Relation to Disease Activity and Lupus Nephritis. *Egypt J Immunol*. 2017;24(1):67-78.

20. Wolk K, Höflich C, Zuckermann-Becker H, Döcke WD, Volk HD, Sabat R. Reduced monocyte CD86 expression in postinflammatory immunodeficiency. *Crit Care Med*. 2007;35(2):458-467. doi:10.1097/01.CCM.0000254724.54515.2F

21. Castanheira FVES, de Lima KA, Cebinelli GCM, et al. CCR5-Positive Inflammatory Monocytes are Crucial for Control of Sepsis. *Shock*. 2019;52(5):e100-e106. doi:10.1097/SHK.0000000000001301

22. Leng L, Metz CN, Fang Y, et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med*. 2003;197(11):1467-1476. doi:10.1084/jem.20030286

23. Kumar AHS, Martin K, Turner EC, et al. Role of CX3CR1 Receptor in Monocyte/Macrophage Driven Neovascularization. *PLOS ONE*. 2013;8(2):e57230. doi:10.1371/journal.pone.0057230

24. McComb JG, Ranganathan M, Liu XH, et al. CX3CL1 up-regulation is associated with recruitment of CX3CR1⁺ mononuclear phagocytes and T lymphocytes in the lungs during cigarette smoke-induced emphysema. *Am J Pathol*. 2008;173(4):949-961. doi:10.2353/ajpath.2008.071034

25. Werner Y, Mass E, Ashok Kumar P, et al. Cxcr4 distinguishes HSC-derived monocytes from microglia and reveals monocyte immune responses to experimental stroke. *Nat Neurosci*. 2020;23(3):351-362. doi:10.1038/s41593-020-0585-y

26. Evren E, Ringqvist E, Tripathi KP, et al. Distinct developmental pathways from blood monocytes generate human lung macrophage diversity. *Immunity*. 2021;54(2):259-275.e7. doi:10.1016/j.immuni.2020.12.003

27. Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and Macrophage Dynamics During Atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011;31(7):1506-1516. doi:10.1161/ATVBAHA.110.221127

28. Pardali E, Waltenberger J. Monocyte function and trafficking in cardiovascular disease. *Thromb Haemost*. 2012;108(5):804-811. doi:10.1160/TH12-04-0276

29. Rahman MS, Murphy AJ, Woollard KJ. Effects of dyslipidaemia on monocyte production and function in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(7):387-400. doi:10.1038/nrcardio.2017.34

30. Ruder AV, Wetzels SMW, Temmerman L, Biessen EAL, Goossens P. Monocyte heterogeneity in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*. 2023;119(11):2033-2045. doi:10.1093/cvr/cvad069

31. Nicholson LB, Raveney BJE, Munder M. Monocyte dependent regulation of autoimmune inflammation. *Curr Mol Med*. 2009;9(1):23-29. doi:10.2174/156652409787314499

32. Katsiari CG, Liossis SNC, Sfrikakis PP. The Pathophysiologic Role of Monocytes and Macrophages in Systemic Lupus Erythematosus: A Reappraisal. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2010;39(6):491-503. doi:10.1016/j.semarthrit.2008.11.002
33. Cutolo M. Macrophages as effectors of the immunoendocrinologic interactions in autoimmune rheumatic diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;876:32-41; discussion 41-42. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb07620.x
34. Fleischmann-Struzek C, Rudd K. Challenges of assessing the burden of sepsis. *Med Klin Intensivmed Notfmed*. 2023;118(2):68-74. doi:10.1007/s00063-023-01088-7
35. Lupu F. "Crossroads in Sepsis Research" Review Series Overview of the pathophysiology of sepsis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2008;12(4):1072-1073. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00366.x
36. Shalova IN, Lim JY, Chittezhath M, et al. Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1 α . *Immunity*. 2015;42(3):484-498. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.001
37. Repsold L, Joubert AM. Platelet Function, Role in Thrombosis, Inflammation, and Consequences in Chronic Myeloproliferative Disorders. *Cells*. 2021;10(11):3034. doi:10.3390/cells10113034
38. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(2):195-198. doi:10.1007/s10555-017-9677-x
39. Welsh JD, Muthard RW, Stalker TJ, Taliaferro JP, Diamond SL, Brass LF. A systems approach to hemostasis: 4. How hemostatic thrombi limit the loss of plasma-borne molecules from the microvasculature. *Blood*. 2016;127(12):1598-1605. doi:10.1182/blood-2015-09-672188
40. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Reviews*. 2011;25(4):155-167. doi:10.1016/j.blre.2011.03.002
41. Dib PRB, Quirino-Teixeira AC, Merij LB, et al. Innate immune receptors in platelets and platelet-leukocyte interactions. *Journal of Leukocyte Biology*. 2020;108(4):1157-1182. doi:10.1002/JLB.4MR0620-701R
42. Koupenova M, Vitseva O, MacKay CR, et al. Platelet-TLR7 mediates host survival and platelet count during viral infection in the absence of platelet-dependent thrombosis. *Blood*. 2014;124(5):791-802. doi:10.1182/blood-2013-11-536003
43. Maouia A, Rebetz J, Kapur R, Semple JW. The Immune Nature of Platelets Revisited. *Transfus Med Rev*. 2020;34(4):209-220. doi:10.1016/j.tmr.2020.09.005
44. Limb GA, Webster L, Soomro H, Janikoun S, Shilling J. Platelet expression of tumour necrosis factor-alpha (TNF- α), TNF receptors and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Clin Exp Immunol*. 1999;118(2):213-218. doi:10.1046/j.1365-2249.1999.01067.x
45. Brown GT, Narayanan P, Li W, Silverstein RL, McIntyre TM. Lipopolysaccharide stimulates platelets through an IL-1 β autocrine loop. *J Immunol*. 2013;191(10):10.4049/jimmunol.1300354. doi:10.4049/jimmunol.1300354
46. Mandel J, Casari M, Stepanyan M, Martyanov A, Deppermann C. Beyond Hemostasis: Platelet Innate Immune Interactions and Thromboinflammation. *Int J Mol Sci*. 2022;23(7):3868. doi:10.3390/ijms23073868

47. Mansour A, Roussel M, Gaussem P, et al. Platelet Functions During Extracorporeal Membrane Oxygenation. Platelet–Leukocyte Aggregates Analyzed by Flow Cytometry as a Promising Tool to Monitor Platelet Activation. *J Clin Med*. 2020;9(8):2361. doi:10.3390/jcm9082361
48. Cognasse F, Laradi S, Berthelot P, et al. Platelet Inflammatory Response to Stress. *Front Immunol*. 2019;10:1478. doi:10.3389/fimmu.2019.01478
49. Li N, Yang H, Wang M, Lü S, Zhang Y, Long M. Ligand-specific binding forces of LFA-1 and Mac-1 in neutrophil adhesion and crawling. *Mol Biol Cell*. 2018;29(4):408-418. doi:10.1091/mbc.E16-12-0827
50. Graham SM, Liles WC. Platelets in sepsis: beyond hemostasis. *Blood*. 2016;127(24):2947-2949. doi:10.1182/blood-2016-03-706168
51. Kullaya V, van der Ven A, Mpagama S, et al. Platelet-monocyte interaction in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis*. 2018;111:86-93. doi:10.1016/j.tube.2018.05.002
52. Kral JB, Schrottmaier WC, Salzmann M, Assinger A. Platelet Interaction with Innate Immune Cells. *Transfus Med Hemother*. 2016;43(2):78-88. doi:10.1159/000444807
53. Hottz ED, Quirino-Teixeira AC, Merij LB, et al. Platelet–leukocyte interactions in the pathogenesis of viral infections. *Platelets*. 2022;33(2):200-207. doi:10.1080/09537104.2021.1952179
54. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest*. 2012;122(7):2661-2671. doi:10.1172/JCI61303
55. Rolling CC, Barrett TJ, Berger JS. Platelet-monocyte aggregates: molecular mediators of thromboinflammation. *Front Cardiovasc Med*. 2023;10. doi:10.3389/fcvm.2023.960398
56. Ren F, Mu N, Zhang X, et al. Increased Platelet-leukocyte Aggregates Are Associated With Myocardial No-reflow in Patients With ST Elevation Myocardial Infarction. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2016;352(3):261-266. doi:10.1016/j.amjms.2016.05.034
57. Kamińska J, Lisowska A, Koper-Lenkiewicz OM, et al. Differences in Monocyte Subsets and Monocyte-Platelet Aggregates in Acute Myocardial Infarction—Preliminary Results. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2019;357(5):421-434. doi:10.1016/j.amjms.2019.02.010
58. Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ. Increased circulating platelet–leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *British Journal of Haematology*. 2001;115(2):451-459. doi:10.1046/j.1365-2141.2001.03101.x
59. Ashman N, Macey MG, Fan SL, Azam U, Yaqoob MM. Increased platelet–monocyte aggregates and cardiovascular disease in end-stage renal failure patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2003;18(10):2088-2096. doi:10.1093/ndt/gfg348
60. Gawaz MP, Mujais SK, Schmidt B, Gurland HJ. Platelet-leukocyte aggregation during hemodialysis. *Kidney International*. 1994;46(2):489-495. doi:10.1038/ki.1994.299
61. El-Hajjar L, Ali Ahmad F, Nasr R. A Guide to Flow Cytometry: Components, Basic Principles, Experimental Design, and Cancer Research Applications. *Curr Protoc*. 2023;3(3):e721. doi:10.1002/cpz1.721
62. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and

- applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2017;37(2):163-176. doi:10.3109/07388551.2015.1128876
63. Nunez R. Flow cytometry: principles and instrumentation. *Current issues in molecular biology*. Published online April 1, 2001.
 64. Noble-Wang J, Zhang S, Price D, Ahearn D. Viability of amoebae, fungal conidia, and yeasts: rapid assessment by flow cytometry. *Methods in molecular biology*. Published online 2004.
 65. Jorgensen JL. State of the Art Symposium: Flow cytometry in the diagnosis of lymphoproliferative disorders by fine-needle aspiration. *Cancer Cytopathology*. 2005;105(6):443-451. doi:10.1002/cncr.21455
 66. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
 67. Marimuthu R, Francis H, Dervish S, Li SCH, Medbury H, Williams H. Characterization of Human Monocyte Subsets by Whole Blood Flow Cytometry Analysis. *J Vis Exp*. 2018;(140):57941. doi:10.3791/57941
 68. Ahrazoglu T, Kluczny JI, Kleimann P, et al. Design of a Robust Flow Cytometric Approach for Phenotypical and Functional Analysis of Human Monocyte Subsets in Health and Disease. *Biomolecules*. 2024;14(10):1251. doi:10.3390/biom14101251
 69. Mohd Yasin ZN, Mohd Idrus FN, Hoe CH, Yvonne-Tee GB. Macrophage polarization in THP-1 cell line and primary monocytes: A systematic review. *Differentiation*. 2022;128:67-82. doi:10.1016/j.diff.2022.10.001
 70. Ong SM, Teng K, Newell E, et al. A Novel, Five-Marker Alternative to CD16–CD14 Gating to Identify the Three Human Monocyte Subsets. *Frontiers in Immunology*. 2019;10.
 71. Spasic M, Ogayo ER, Parsons AM, Mittendorf EA, van Galen P, McAllister SS. Spectral Flow Cytometry Methods and Pipelines for Comprehensive Immunoprofiling of Human Peripheral Blood and Bone Marrow. *Cancer Res Commun*. 2024;4(3):895-910. doi:10.1158/2767-9764.CRC-23-0357
 72. Liechti T, Roederer M. OMIP-051 – 28-color flow cytometry panel to characterize B cells and myeloid cells. *Cytometry Part A*. 2019;95(2):150-155. doi:10.1002/cyto.a.23689
 73. Thomas GD, Hamers AA, Nakao C, et al. Human blood monocyte subsets: a new gating strategy defined using cell surface markers identified by mass cytometry. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(8):1548-1558. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309145
 74. Merah-Mourah F, Cohen SO, Charron D, Mooney N, Haziot A. Identification of Novel Human Monocyte Subsets and Evidence for Phenotypic Groups Defined by Interindividual Variations of Expression of Adhesion Molecules. *Sci Rep*. 2020;10(1):4397. doi:10.1038/s41598-020-61022-1
 75. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990;346(6283):425-434. doi:10.1038/346425a0
 76. Kawai K, Tsuno NH, Matsushashi M, et al. CD11b-mediated migratory property of peripheral blood B cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005;116(1):192-197. doi:10.1016/j.jaci.2005.03.021
 77. Menon AP, Moreno B, Meraviglia-Crivelli D, et al. Modulating T Cell Responses by

Targeting CD3. *Cancers (Basel)*. 2023;15(4):1189. doi:10.3390/cancers15041189

78. Park KT, ElNaggar MM, Abdellrazeq GS, et al. Phenotype and Function of CD209+ Bovine Blood Dendritic Cells, Monocyte-Derived-Dendritic Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS One*. 2016;11(10):e0165247. doi:10.1371/journal.pone.0165247

79. Seckin AN, Ozdemir H, Ceylan A, Artac H. Age-related alterations of the CD19 complex and memory B cells in children with Down syndrome. *Clin Exp Med*. 2018;18(1):125-131. doi:10.1007/s10238-017-0457-2

80. Fu B, Wang F, Sun R, Ling B, Tian Z, Wei H. CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells. *Immunology*. 2011;133(3):350-359. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03446.x

81. Romee R, Foley B, Lenvik T, et al. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood*. 2013;121(18):3599-3608. doi:10.1182/blood-2012-04-425397

82. Yona S, Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Current Opinion in Hematology*. 2010;17(1):53. doi:10.1097/MOH.0b013e3283324f80

83. Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR. Dynamics of Leukocyte-Platelet Adhesion in Whole Blood. *Blood*. 1991;78(7):1730-1737. doi:10.1182/blood.V78.7.1730.1730

84. Glezeva N, Gilmer JF, Watson CJ, Ledwidge M. A Central Role for Monocyte-Platelet Interactions in Heart Failure. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2016;21(3):245-261. doi:10.1177/1074248415609436

85. Fu G, Deng M, Neal MD, Billiar TR, Scott MJ. PLATELET-MONOCYTE AGGREGATES: UNDERSTANDING MECHANISMS AND FUNCTIONS IN SEPSIS. *Shock*. 2021;55(2):156-166. doi:10.1097/SHK.0000000000001619

86. Ehlers R, Ustinov V, Chen Z, et al. Targeting Platelet-Leukocyte Interactions: Identification of the Integrin Mac-1 Binding Site for the Platelet Counter Receptor Glycoprotein Iba. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003;198(7):1077. doi:10.1084/jem.20022181

87. Zheng L, Duan Z, Tang D, et al. GP IIb/IIIa-Mediated Platelet Activation and Its Modulation of the Immune Response of Monocytes Against *Candida albicans*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11. doi:10.3389/fcimb.2021.783085

88. Scholz T, Zhao L, Temmler U, Bath P, Heptinstall S, Lösche W. The GPIIb/IIIa antagonist eptifibatide markedly potentiates platelet-leukocyte interaction and tissue factor expression following platelet activation in whole blood in vitro. *Platelets*. 2002;13(7):401-406. doi:10.1080/0953710021000024367

89. Debili N, Robin C, Schiavon V, et al. Different expression of CD41 on human lymphoid and myeloid progenitors from adults and neonates. *Blood*. 2001;97(7):2023-2030. doi:10.1182/blood.V97.7.2023

90. Yang H, Lang S, Zhai Z, et al. Fibrinogen is required for maintenance of platelet intracellular and cell-surface P-selectin expression. *Blood*. 2009;114(2):425-436. doi:10.1182/blood-2008-03-145821

91. Cognasse F, Duchez AC, Audoux E, et al. Platelets as Key Factors in Inflammation: Focus on CD40L/CD40. *Front Immunol*. 2022;13:825892. doi:10.3389/fimmu.2022.825892

92. Rosenzweig M, Jourquin F, Tailleux L, Gluckman JC. CD40 ligation and phagocytosis

differently affect the differentiation of monocytes into dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2002;72(6):1180-1189.

93. Frelinger III AL. Using flow cytometry to monitor glycoprotein IIb-IIIa activation. *Platelets.* 2018;29(7):670-676. doi:10.1080/09537104.2018.1478073

94. Armstrong PCJ, Kirkby NS, Chan MV, et al. Novel whole blood assay for phenotyping platelet reactivity in mice identifies ICAM-1 as a mediator of platelet-monocyte interaction. *Blood.* 2015;126(10):e11-e18. doi:10.1182/blood-2015-01-621656

95. Rasmussen E, Eriksen L, Greisen S, et al. Diminished Non-Classical Monocytes in the Blood Associate with Disease Severity in Alcoholic Hepatitis. *Clinical and Experimental Gastroenterology.* 2021;14:259-267. doi:10.2147/CEG.S299775

96. Williams H, Mack C, Baraz R, et al. Monocyte Differentiation and Heterogeneity: Inter-Subset and Interindividual Differences. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023;24(10):8757. doi:10.3390/ijms24108757

97. Asai A, Okajima F, Nakagawa K, et al. Phosphatidylcholine hydroperoxide-induced THP-1 cell adhesion to intracellular adhesion molecule-1. *Journal of lipid research.* 2009;50:957-965. doi:10.1194/jlr.M800582-JLR200

98. Malik M, Chen YY, Kienzle MF, Tomkowicz BE, Collman RG, Ptasznik A. Monocyte migration and LFA-1 mediated attachment to brain microvascular endothelia is regulated by SDF-1 α through Lyn kinase. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2008;181(7):4632. doi:10.4049/jimmunol.181.7.4632

99. Rains JL, Jain SK. Hyperketonemia increases monocyte adhesion to endothelial cells and is mediated by LFA-1 expression in monocytes and ICAM-1 expression in endothelial cells. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism.* 2011;301(2):E298. doi:10.1152/ajpendo.00038.2011

100. Mužinić NR, Markotić A, Pavelin S, et al. Expression of CD40 and CD192 in Classical Monocytes in Multiple Sclerosis Patients Assessed with Transcranial Magnetic Stimulation. *Biomedicines.* 2023;11(10):2870. doi:10.3390/biomedicines11102870

101. Jin R, Xiao AY, Song Z, et al. Platelet CD40 Mediates Leukocyte Recruitment and Neointima Formation after Arterial Denudation Injury in Atherosclerosis-Prone Mice. *The American Journal of Pathology.* 2018;188(1):252. doi:10.1016/j.ajpath.2017.09.007

102. An G, Wang H, Tang R, et al. P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Is Highly Expressed on Ly-6Chi Monocytes and a Major Determinant for Ly-6Chi Monocyte Recruitment to Sites of Atherosclerosis in Mice. *Circulation.* 2008;117(25):3227-3237. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.771048

103. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLOS ONE.* 2017;12(4):e0176460. doi:10.1371/journal.pone.0176460

104. Miyake K, Ito J, Takahashi K, et al. Single-cell transcriptomics identifies the differentiation trajectory from inflammatory monocytes to pro-resolving macrophages in a mouse skin allergy model. *Nat Commun.* 2024;15(1):1666. doi:10.1038/s41467-024-46148-4

105. Page C, Pitchford S. Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. *International Immunopharmacology.* 2013;17(4):1176-1184. doi:10.1016/j.intimp.2013.06.004

106. Peters MJ, Dixon G, Kotowicz KT, Hatch DJ, Heyderman RS, Klein NJ. Circulating platelet–neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *British Journal of Haematology*. 1999;106(2):391-399. doi:10.1046/j.1365-2141.1999.01553.x
107. Zalavary S, Grenegård M, Stendahl O, Bengtsson T. Platelets enhance Fcγ receptor-mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role of purinergic modulation and actin polymerization. *Journal of Leukocyte Biology*. 1996;60(1):58-68. doi:10.1002/jlb.60.1.58
108. Mariscal A, Zamora C, Magallares B, et al. Phenotypic and Functional Consequences of PLT Binding to Monocytes and Its Association with Clinical Features in SLE. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):4719. doi:10.3390/ijms22094719
109. Semple JW, Aslam R, Kim M, Speck ER, Freedman J. Platelet-bound lipopolysaccharide enhances Fc receptor–mediated phagocytosis of IgG-opsonized platelets. *Blood*. 2007;109(11):4803-4805. doi:10.1182/blood-2006-12-062695
110. Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KVJ, Patel KD, Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*. 2005;106(7):2417-2423. doi:10.1182/blood-2005-03-0916
111. Steven MM, Lennie SE, Sturrock RD, Gemmell CG. Enhanced bacterial phagocytosis by peripheral blood monocytes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1984;43(3):435-439.
112. Wijeyekoon RS, Kronenberg-Versteeg D, Scott KM, et al. Monocyte Function in Parkinson's Disease and the Impact of Autologous Serum on Phagocytosis. *Front Neurol*. 2018;9. doi:10.3389/fneur.2018.00870
113. Wolfkamp SC, Verseyden C, Vogels EW, et al. ATG16L1 and NOD2 polymorphisms enhance phagocytosis in monocytes of Crohn's disease patients. *World J Gastroenterol*. 2014;20(10):2664-2672. doi:10.3748/wjg.v20.i10.2664
114. Koumandakis E, Koumandaki I, Kaklamani E, Sparos L, Aravantinos D, Trichopoulos D. Enhanced phagocytosis of mononuclear phagocytes in pregnancy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 1986;93(11):1150-1154. doi:10.1111/j.1471-0528.1986.tb08636.x
115. Ruco LP, Procopio A, Uccini S, Baroni CD. Increased monocyte phagocytosis in cancer patients. *European Journal of Cancer (1965)*. 1980;16(10):1315-1320. doi:10.1016/0014-2964(80)90288-1
116. Baskić D, Aćimović LD, Arsenijević N. [The phagocytic activity of monocytes in different stages of breast cancer]. *Med Pregl*. 2003;56 Suppl 1:103-107.
117. Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature*. 2017;545(7655):495-499. doi:10.1038/nature22396
118. Santos SS, Carmo AM, Brunialti MKC, et al. Modulation of monocytes in septic patients: preserved phagocytic activity, increased ROS and NO generation, and decreased production of inflammatory cytokines. *Intensive Care Medicine Experimental*. 2016;4(1):5. doi:10.1186/s40635-016-0078-1
119. Ferreira da Mota NV, Brunialti MKC, Santos SS, et al. Immunophenotyping of Monocytes During Human Sepsis Shows Impairment in Antigen Presentation: A Shift Toward Nonclassical Differentiation and Upregulation of FCγR1-Receptor. *Shock*. 2018;50(3):293-300. doi:10.1097/SHK.0000000000001078

120. Movat HZ, Weiser WJ, Glynn MF, Mustard JF. PLATELET PHAGOCYTOSIS AND AGGREGATION. *Journal of Cell Biology*. 1965;27(3):531-543. doi:10.1083/jcb.27.3.531
121. Zucker-Franklin D. Endocytosis by human platelets: metabolic and freeze-fracture studies. *Journal of Cell Biology*. 1981;91(3):706-715. doi:10.1083/jcb.91.3.706
122. Nagasawa T, Nakayasu C, Rieger AM, Barreda DR, Somamoto T, Nakao M. Phagocytosis by Thrombocytes is a Conserved Innate Immune Mechanism in Lower Vertebrates. *Front Immunol*. 2014;5:445. doi:10.3389/fimmu.2014.00445
123. Noronha N, Ehx G, Meunier MC, Laverdure JP, Thériault C, Perreault C. Major multilevel molecular divergence between THP-1 cells from different biorepositories. *International Journal of Cancer*. 2020;147(7):2000-2006. doi:10.1002/ijc.32967
124. Tak T, van Groenendaal R, Pickkers P, Koenderman L. Monocyte Subsets Are Differentially Lost from the Circulation during Acute Inflammation Induced by Human Experimental Endotoxemia. *J Innate Immun*. 2017;9(5):464-474. doi:10.1159/000475665
125. Thaler B, Hohensinner PJ, Krychtiuk KA, et al. Differential in vivo activation of monocyte subsets during low-grade inflammation through experimental endotoxemia in humans. *Sci Rep*. 2016;6(1):30162. doi:10.1038/srep30162
126. Guessous F, Marcinkiewicz M, Polanowska-Grabowska R, Keepers TR, Obrig T, Gear ARL. Shiga toxin 2 and lipopolysaccharide cause monocytic THP-1 cells to release factors which activate platelet function. *Thromb Haemost*. 2005;94(5):1019-1027. doi:10.1160/TH05-02-0115
127. Ponath V, Kaina B. Death of Monocytes through Oxidative Burst of Macrophages and Neutrophils: Killing in Trans. *PLOS ONE*. 2017;12(1):e0170347. doi:10.1371/journal.pone.0170347
128. Lichte P, Grigoleit JS, Steiner EM, et al. Low dose LPS does not increase TLR4 expression on monocytes in a human in vivo model. *Cytokine*. 2013;63(1):74-80. doi:10.1016/j.cyto.2013.04.014
129. Juffermans NP, Dekkers PEP, Verbon A, Speelman P, van Deventer SJH, van der Poll T. Concurrent Upregulation of Urokinase Plasminogen Activator Receptor and CD11b during Tuberculosis and Experimental Endotoxemia. *Infection and Immunity*. 2001;69(8):5182-5185. doi:10.1128/iai.69.8.5182-5185.2001
130. Fan ST, Edgington TS. Integrin regulation of leukocyte inflammatory functions. CD11b/CD18 enhancement of the tumor necrosis factor-alpha responses of monocytes. *The Journal of Immunology*. 1993;150(7):2972-2980. doi:10.4049/jimmunol.150.7.2972
131. Mentzer SJ, Faller DV, Burakoff SJ. Interferon-gamma induction of LFA-1-mediated homotypic adhesion of human monocytes. *The Journal of Immunology*. 1986;137(1):108-113. doi:10.4049/jimmunol.137.1.108
132. Dougherty GJ, Hogg N. The role of monocyte lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) in accessory cell function. *European Journal of Immunology*. 1987;17(7):943-947. doi:10.1002/eji.1830170708
133. Heinzelmann M, Mercer-Jones MA, Gardner SA, Wilson MA, Polk HC. Bacterial Cell Wall Products Increase Monocyte HLA-DR and ICAM-1 without Affecting Lymphocyte CD18 Expression. *Cellular Immunology*. 1997;176(2):127-134. doi:10.1006/cimm.1997.1089
134. Kevil CG, Patel RP, Bullard DC. Essential role of ICAM-1 in mediating monocyte adhesion

- to aortic endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2001;281(5):C1442-C1447. doi:10.1152/ajpcell.2001.281.5.C1442
135. Shang XZ, Issekutz AC. Contribution of CD11a/CD18, CD11b/CD18, ICAM-1 (CD54) and -2 (CD102) to human monocyte migration through endothelium and connective tissue fibroblast barriers. *European Journal of Immunology*. 1998;28(6):1970-1979. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199806)28:06<1970::AID-IMMU1970>3.0.CO;2-H
136. Katsiari CG, Liossis SNC, Souliotis VL, Dimopoulos AM, Manoussakis MN, Sfikakis PP. Aberrant expression of the costimulatory molecule CD40 ligand on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2002;103(1):54-62. doi:10.1006/clim.2001.5172
137. Wu W, Alexis NE, Bromberg PA, Jaspers I, Peden DB. Mechanisms of LPS-induced CD40 expression in human peripheral blood monocytic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;379(2):573-577. doi:10.1016/j.bbrc.2008.12.082
138. O'Sullivan B, Thomas R. CD40 and dendritic cell function. *Crit Rev Immunol*. 2003;23(1-2):83-107. doi:10.1615/critrevimmunol.v23.i12.50
139. Davenpeck KL, Brummet ME, Hudson SA, Mayer RJ, Bochner BS. Activation of Human Leukocytes Reduces Surface P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1, CD162) and Adhesion to P-Selectin In Vitro¹. *The Journal of Immunology*. 2000;165(5):2764-2772. doi:10.4049/jimmunol.165.5.2764
140. Karsulovic C, Tempio F, Lopez M, Guerrero J, Goecke A. In vitro Phenotype Induction of Circulating Monocytes: CD16 and CD163 Analysis. *J Inflamm Res*. 2021;14:191-198. doi:10.2147/JIR.S292513
141. Baran J, Guzik K, Hryniewicz W, Ernst M, Flad HD, Pryjma J. Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria. *Infect Immun*. 1996;64(10):4242-4248. doi:10.1128/iai.64.10.4242-4248.1996
142. Schultz C. Lipopolysaccharide, structure and biological effects. *Gen Int Med Clin Innov*. 2018;3(1). doi:10.15761/GIMCI.1000152
143. Kang YH, Dwivedi RS, Lee CH. Ultrastructural and Immunocytochemical Study of the Uptake and Distribution of Bacterial Lipopolysaccharide in Human Monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 1990;48(4):316-332. doi:10.1002/jlb.48.4.316

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung der Monozytensubpopulationen sowie ihre spezifischen Oberflächenrezeptoren und ihre Rolle im Organismus.....	5
Abbildung 2: Interaktion zwischen Plättchen und Leukozyten.	7
Abbildung 3: Graphische Darstellung des hydrodynamischen Durchmessers der ^{A488} PFCs (A) und ^{Rho} PFCs (B).....	15
Abbildung 4: Vorbereitung der Zellen zur Fluoreszenzmikroskopie.....	18
Abbildung 5: Durchflusszytometrische Ansätze zur Identifikation von Monozyten und deren Subpopulationen.....	23

Abbildung 6: Darstellung von Monozyten-Plättchen-Aggregaten von Monozytensubpopulationen.	25
Abbildung 7: Durchflusszytometrische Untersuchungen der Interaktion von Plättchen und THP-1 Zellen.	27
Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von THP-1 Zellen und THP-1-Plättchen-Aggregaten in 100-facher Vergrößerung.	28
Abbildung 9: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächenrezeptoren auf Thrombozyten.	29
Abbildung 10: Expression von Oberflächenrezeptoren auf Monozyten und Monozyten-Plättchen-Aggregaten.	30
Abbildung 11: Vergleichende Analyse der Vitalität von Monozyten in unterschiedlichen Medien.	32
Abbildung 12: Titration der ^{A488} PFCs zur Bestimmung der optimalen PFC-Menge.	33
Abbildung 13: Aufnahme von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFC) von CD41 ⁻ und CD41 ⁺ Monozyten.	34
Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der ^{Rho} PFC-Aufnahme von THP-1 Zellen und Plättchen.	35
Abbildung 15: Anteil toter Monozyten nach Inkubation bei 37°C ohne (blau) und mit (rot) der Einwirkung von LPS.	36
Abbildung 16: Darstellung einer alternativen <i>Gating</i> -Strategie zur Vermeidung der LPS-instabilen CD14/CD16 Einteilung von Monozytensubpopulationen über CCR2 und MHC-II.	37
Abbildung 17: Verteilung der Monozytensubpopulationen nach LPS-Stimulation.	38
Abbildung 18: Analyse von Monozyten-Plättchen-Aggregate nach Stimulation der Zellen mit LPS.	38
Abbildung 19: Quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse der Expression von verschiedenen Oberflächenrezeptoren auf Monozyten nach LPS-Stimulation.	39
Abbildung 20: ^{A488} PFC-Aufnahme der plättchenungebundenen Monozyten (blau) und Monozyten-Plättchen-Aggregate (rot) nach LPS-Stimulation.	40

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Apparaturen.....	9
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	9
Tabelle 3: Chemikalien	10
Tabelle 4: Puffer und Medien.....	11
Tabelle 5: Verwendete Antikörper	12
Tabelle 6: Unterschiedliche Antikörperkombinationen zur Detektion von Monozytensubpopulationen.	13
Tabelle 7: Zusammensetzung der ^{A488} PFCs.....	14
Tabelle 8: Zusammensetzung der ^{Rho} PFCs.	15
Tabelle 9: Charakterisierung der PFCs mittels dynamischer Lichtstreuung.	15
Tabelle 10: Bewertung der verschiedenen <i>Gating</i> -Strategien zur idealen Identifikation von Monozyten und ihren Subpopulationen.....	44

10 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. rer. nat. Sebastian Temme bedanken für die Möglichkeit, die Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und für die gute Betreuung sowie die konstante Unterstützung und Ermunterung über die letzten 3 Jahre hinweg, insbesondere wenn die Dinge im Labor mal nicht gleich funktionierten.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Norbert Gerdes für die Übernahme der Zweitbetreuung und seiner Abteilung, der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie, für die Bereitstellung des Durchflusssytometers und die gute Einarbeitung bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitenden des Instituts für Molekulare Kardiologie und der Klinik für Anästhesiologie für die fachliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und die allseits gute Zusammenarbeit.

Vor allem meinen Laborgenossen Patricia, Jennifer, Büsra, Chima, Clara, Lea und Anna danke ich für das oft notwendige Entertainment an langen Tagen im Labor.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die sich mehr als nur einmal meine Verzweiflung während dieser Promotion anhören mussten und mich auch beim zehnten Mal noch enthusiastisch aufgemuntert haben. Mein allergrößter Dank gilt meinen Eltern, die mich mein gesamtes Leben lang unterstützt haben und mich auf meinem Weg begleitet haben. Ohne Euch wäre gar nichts möglich gewesen. Ich kann Euch niemals genug danken.