



Aus der Klinik für Kardiologie und Angiologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Untersuchungen zur Interaktion von Makrophagen
mit Gefäßmuskelzellen unter Hypoxie
mittels *high-content* Bildanalyse

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Matthias Roeper
aus Magdeburg

Magdeburg, 2017

Ist man in kleinen Dingen nicht geduldig,

bringt man die großen Vorhaben zum Scheitern.

Konfuzius

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Roeper, Matthias:

Untersuchungen zur Interaktion von Makrophagen mit Gefäßmuskelzellen unter Hypoxie mittels *high-content* Bildanalyse.

Magdeburg 2017. 85 Bl., 11 Abb., 6 Tab.

Kurzreferat

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der lysosomale LDL-Transfer von Makrophagen auf glatte Gefäßmuskelzellen unter hypoxischen Bedingungen untersucht und eine entsprechende Methodik etabliert.

Glatte Gefäßmuskelzellen einer GFP-Maus wurden für 10 Tage mit Alexa Fluor 594-konjugiertem acetylierten LDL beladenen Makrophagen kokultiviert. Im Anschluss an die Färbung erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie anhand einer Vielzahl vordefinierter Bildpunkte und mithilfe eines automatisierten Mikroskops. Die *high-content* Analyse der Daten erfolgte semiautomatisch unter Verwendung eines eigens entwickelten Algorithmus (*pipeline*) für das *open-source*-Programm *CellProfiler* mit anschließender Validierung durch manuelle Nachkontrolle.

Durch die Automatisierung ließ sich eine beträchtliche Arbeitserleichterung bei gleichzeitig hoher Objektivität, Validität und Reproduzierbarkeit erzielen. In der Auswertung komplexer fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen ist sowohl die Nutzung von *open-source*-Programmen als auch die kombinierte Vorgehensweise mit semiautomatischer Bildsegmentierung und manueller Nachkontrolle anderen Verfahren überlegen.

Es konnte gezeigt werden, dass auch unter hypoxischen Bedingungen der Transport von Lipid-geladenen Lysosomen aus Makrophagen in glatte Gefäßmuskelzellen stattfindet. Die weitere Aufklärung dieses potentiell proatherogenen Mechanismus bietet ein vielversprechendes therapeutisches Potential.

Schlüsselwörter

Atherosklerose, Kokultur, Makrophagen, glatte Gefäßmuskelzellen, Schaumzellen, LDL, Fluoreszenzmikroskopie, Immunzytochemie, Zellmembranpermeabilisierung, Autofluoreszenz, CellProfiler, Automatisierung, Bildsegmentierung, Bildanalyse, *high-content* Analyse

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	4
2. Abkürzungsverzeichnis	7
3. Einführung	
3.1. Die Atherosklerose	8
3.2. Die atherosklerotische Plaque	9
3.3. Zelltypen und ihre Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose	11
3.4. Der interzelluläre Transport Lipid-geladener Lysosomen aus Makrophagen in glatte Gefäßmuskelzellen	14
3.5. Die Bedeutung der Hypoxie in der Atherosklerose	15
3.6. Autofluoreszenz	16
3.7. Bildsegmentierung, grafische Filter und <i>high-content</i> Analysen	18
3.8. Zielstellung der Arbeit	20
4. Material und Methoden	
4.1. Verwendete Geräte und deren Hersteller	21
4.2. Verwendete Chemikalien	21
4.3. Verwendete Kulturmedien, Puffer und Zellkulturlösungen	22
4.4. Verwendete Zellen	22
4.5. Zellkultur	23
4.5.1. Isolation humaner Monozyten durch doppelte Dichtegradientenzentrifugation	23
4.5.2. Isolation glatter Gefäßmuskelzellen aus Nageraorten und humanen Explantaten	24
4.5.3. Kultur glatter Gefäßmuskelzellen	25
4.5.4. Kryopräservierung von Zellen für die Zellkultur	25
4.6. Kokulturen zwischen glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen	26
4.7. Fluoreszenzmarkierung lebender Zellen	27
4.8. Immunzytochemie	27
4.8.1. Immunzytochemische Färbungen an glatten Gefäßmuskelzellen	27

4.8.2. Optimierung der immunzytochemischen Färbeprotokolle	28
4.9. Mikroskopie	29
4.10. Speicherung, Format und Export der Bilder	29
4.11. Hardware	30
4.12. Bildverarbeitung	30
4.13. Bestimmen der Kerngrößen mit <i>ImageJ</i>	30
4.14. Automatisierte Bildsegmentierung und Analyse mit dem <i>CellProfiler</i>	31
4.14.1. <i>CellProfiler</i>	31
4.14.2. Herausforderungen und Probleme bei der Bildverarbeitung	32
4.14.3. <i>Pipeline</i>	33
4.15. Statistische Auswertung und Darstellung der Daten	39
5. Ergebnisse	
5.1. Immunzytochemie, Fluoreszenzmikroskopie und Kernmorphologie	40
5.1.1. Zellmembranpermeabilisierung und Immunzytochemie	40
5.1.2. Autofluoreszenz humaner glatter Gefäßmuskelzellen	43
5.1.3. Differenzierung zwischen glatten Gefäßmuskelzellen der Maus und Makrophagen anhand der Zellkernmorphologie	45
5.2. <i>CellProfiler</i>	46
5.2.1. Automatische Segmentierung glatter Gefäßmuskelzellen und Makrophagen	46
5.2.2. Detektion AcLDL-positiver glatter Gefäßmuskelzellen und manuelle Nachkontrolle	48
5.3. Nachweis des Transports Lipid-geladener Lysosomen aus Makrophagen in glatte Gefäßmuskelzellen unter Hypoxie	50
6. Diskussion	
6.1. Zellmembranpermeabilisierung	51
6.2. Autofluoreszenz	52
6.3. Halbautomatische Bildsegmentierung mit der <i>open-source</i>-Software <i>CellProfiler</i>	53
6.4. Der LDL-Transfer von Makrophagen auf glatte Gefäßmuskelzellen	59

6.5. Fehlerbetrachtung, Vergleichbarkeit der Ergebnisse und Anwendbarkeit der Methode	62
6.5.1. Zellkultur	62
6.5.2. Bildsegmentierung mit dem <i>CellProfiler</i>	64
6.5.3. Manuelle Nachkontrolle	65
7. Zusammenfassung	66
8. Literaturverzeichnis	67
9. Danksagungen	82
10. Ehrenerklärung	83
11. Darstellung des Bildungsweges	84

2. Abkürzungsverzeichnis

AcLDL	Alexa Fluor 594-konjugiertes acetyliertes <i>Low Density Lipoprotein</i>
AGE	<i>Advanced glycation end products</i>
AK	Antikörper
CP	<i>CellProfiler</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
D10F+	Zellkulturmedium für glatte Gefäßmuskelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein(isothiocyanat)
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GMZ	Gefäßmuskelzellen
iPACs	<i>Inter-pseudopodial axis connections</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MeOH	Methanol
MMC	Mitomycin C
MP	Makrophagen
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
OSAS	Obstruktives Schlafapnoesyndrom
OSEs	<i>Oxidation-specific epitopes</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular pattern molecules</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Formaldehydlösung (in PBS gelöstes Paraformaldehyd)
rcf	<i>Relative centrifugal force</i> , relative Zentrifugalkraft
RGB	Rot-Grün-Blau-Farbraum
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
TIF(F)	<i>Tagged Image File Format</i>
TNT	<i>Tunneling nanotubes</i>
ZVI	<i>Zeiss Vision Image</i>

3. Einführung

3.1. Die Atherosklerose

Die Atherosklerose bezeichnet eine chronisch entzündliche Erkrankung der Intima von Blutgefäßen, welche pathogenetisch verantwortlich für eine Vielzahl ischämischer Ereignisse ist. Hierzu gehören unter anderem die Angina pectoris, Herzinfarkte oder ischämische Schlaganfälle.¹ Seit den 1960er Jahren konnte die Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen durch wissenschaftliche Erkenntnisse und Fortschritte in Bereichen der Prävention, invasiven Kardiologie, Chirurgie sowie gerätegebundenen und medikamentösen Therapie ständig gesenkt werden.² Dennoch waren kardiovaskuläre Erkrankungen im Jahr 2010 für etwa 15,6 von 52,8 Millionen Todesfälle weltweit verantwortlich. Damit stellen diese mit circa 29,6% die häufigste Todesursache dar. Betrachtet man lediglich die ischämische Herzerkrankung, den ischämischen Schlaganfall, Aortenaneurysmen und die periphere arterielle Verschlusskrankheit, so verstirbt jährlich noch immer fast ein Fünftel aller Menschen (10,1 Millionen) an Erkrankungen, welche zum überwältigenden Teil direkt auf die Atherosklerose zurückzuführen sind.³ Obwohl die zunehmende Verbreitung des westlichen Lebensstils mit einer erhöhten Prävalenz der Atherosklerose einhergeht,⁴ konnten entsprechende Gefäßwandveränderungen bereits an ägyptischen Mumien nachgewiesen werden.⁵ Allein die Lebenszeitprävalenz für die koronare Herzerkrankung bei 40- bis 79-Jährigen beträgt laut der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland von 2013 etwa 9,3% (Frauen: 6,4%; Männer: 12,3%) und ist mit denen anderer Industrieländer vergleichbar.⁶ Der Atherosklerose kommt aufgrund ihrer hohen Prävalenz eine enorme wirtschaftliche Bedeutung zu. Im Jahr 2010 betrug die geschätzte Summe aller direkten und indirekten Kosten aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen in den Vereinigten Staaten von Amerika etwa 503,2 Milliarden US-Dollar. Dagegen waren die Gesamtkosten für benigne und maligne Neoplasien mit 228 Milliarden US-Dollar im Jahr 2008 nicht einmal halb so hoch.⁷

Pathophysiologisch liegt der Atherosklerose eine hochgradig komplexe chronische Entzündung innerhalb der Gefäßwand zu Grunde. Als Risikofaktoren für die Entwicklung und das Fortschreiten der Erkrankung sind unter anderem erhöhte Konzentrationen von *low density lipoprotein* (LDL) sowie Homocystein im Blut, freie Sauerstoffradikale bzw. Nikotinabusus, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, eine genetische Prädisposition, infektiöse Mikroorganismen wie Herpesviren und *Chlamydia pneumoniae* als auch *advanced glycation end products* (AGE) identifiziert worden, wobei dem LDL hierbei die wichtigste Rolle zukommt.^{8,9} In den letzten Jahrzehnten wurden enorme Fortschritte bei der Erforschung der Atherosklerose erzielt. Dennoch werden bis heute fundamentale Abläufe in

der Pathogenese dieser bedeutenden Erkrankung nur unzureichend verstanden, wodurch sich die Entwicklung zielgerichteter therapeutischer Strategien schwierig gestaltet.^{8,10,11}

3.2. Die atherosklerotische Plaque

Das Vorschreiten der Atherosklerose kann vereinfacht in mehrere Phasen unterteilt werden. Initial kommt es zu einer Retention von cholesterinreichem Apolipoprotein B im subendothelialen Raum. Prädilektionsstellen sind insbesondere Regionen, an welchen aufgrund von Verzweigungen oder Biegungen von Arterien Turbulenzen und verminderte Scherkräfte wirken und somit eine endotheliale Dysfunktion begünstigt wird.¹²

Durch Modifizierung des LDL durch Oxidation,¹³ Glykierung,¹⁴ Aggregation,¹⁵ Integration in Immunkomplexe¹⁶ oder Verbindung mit Proteoglycanen¹⁷ ähnelt es sowohl *pathogen-associated molecular pattern molecules* (PAMPs) als auch *damage-associated molecular pattern molecules*, sogenannten DAMPs, wodurch eine lokale Entzündungsreaktion hervorgerufen wird.¹¹ Es kommt zu einer Aktivierung von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen (GMZ). Unter Expression diverser Adhäsionsmoleküle¹⁸ und Chemokine¹⁹ sammelt sich eine Vielzahl proinflammatorischer Zellen innerhalb der Intima an, welche mitunter auch eine wichtige antiinflammatorische Rolle spielen können.²⁰ Neben Monozyten bzw. aus Monozyten gereiften Makrophagen (MP) beteiligen sich T-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen, Mastzellen und die glatten GMZ selbst an der allgemeinen Entzündungsreaktion. Zusätzlich akkumulieren sowohl Lipide als auch extrazelluläre Bestandteile.

Die ersten sichtbaren Läsionen werden als sogenannte *fatty streaks* bezeichnet und sind seit langem bekannt.^{21,22} Sie finden sich bereits in jungen, prinzipiell gesunden Individuen²³ und bestehen vor allem aus Lipid-beladenen Makrophagen, welche aufgrund ihrer Morphologie auch als Schaumzellen bezeichnet werden. Die Genese der Schaumzellen ist nicht hinreichend geklärt. Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass vor allem die Transmigration von Monozyten die primäre Quelle von Schaumzellen darstellt. Es sollen jedoch auch glatte GMZ als Quelle von Schaumzellen in Frage kommen, indem sie einerseits aus der Media in die Intima migrieren und dort LDL aufnehmen,²⁴ andererseits möglicherweise aus Makrophagen transdifferenzieren können.²⁵ Das Ausbilden von schaumzelltypischen Eigenschaften in glatten GMZ nach Aufnahme Lipid-geladener Lysosomen aus MP konnte durch frühere Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden und ist auch Bestandteil dieser Arbeit.²⁶ Neuere Untersuchungen postulieren, dass die lokale Proliferation von MP bei der Entstehung von Schaumzellen im Vordergrund steht.²⁷ Im Rahmen der voranschreitenden Atherosklerose und protektiver antiinflammatorischer Prozesse bildet sich durch Migration und Proliferation von glatten GMZ eine fibröse Kappe

heraus, welche als schützende Schicht zwischen Blutgefäßlumen und thrombogenem Material innerhalb der Plaque fungiert.²⁸ Aufgrund von weiteren Umbauprozessen innerhalb der Gefäßwand (*outward remodeling*) und Erweiterung des Lumens kann meist über lange Zeit eine ausreichende Perfusion der nachfolgenden Organe bzw. Gewebe trotz zunehmender Dicke der Läsion aufrechterhalten werden. Die sogenannte stabile Plaque verursacht in der Regel keine akuten ischämische Ereignisse.²⁹ Ein hoher Anteil an glatten GMZ korreliert dabei mit einem erhöhten Maß an Stabilität.³⁰

Trotz Abschirmung durch die fibröse Kappe kann es zu einem Fortschreiten der Erkrankung und Ausbildung vulnerabler Plaques kommen. Die sich selbst erhaltende Entzündungsreaktion bedingt einen kontinuierlichen Einstrom von Monozyten und deren Differenzierung in MP, welche wiederum im Übermaß LDL phagozytieren und nekrotisch werden. Aufgrund fehlerhafter Efferozytose, dem Entfernen apoptotischer Zellen, wie auch primärer Nekrose entsteht ein nekrotischer Kern in der Plaque.^{10,31} Dieser zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Leukozyten bzw. Schaumzellen im Randbereich und modifiziertem LDL sowie Zelltrümmern im Zentrum aus.⁸ Insbesondere hier herrschen hypoxische Bedingungen. Eine erhöhte Aktivität von Matrixmetalloproteinasen, unzureichende Kollagenproduktion glatter GMZ sowie die Reduktion der Menge glatter GMZ durch Zelltod³² bedingen ein Ausdünnen der fibrösen Kappe.^{11,30} Vulnerable Läsionen zeichnen sich daher durch eine relativ verminderte Anzahl an glatten GMZ und einen erhöhten Anteil von Leukozyten aus.^{11,33}

Die chronische Entzündungsreaktion begünstigt zudem die Aggregation von oxidiertem LDL, Fettsäuren, Kalziumphosphat sowie extrazellulären Matrixproteinen und bewirkt eine zunehmende Kalzifikation der Plaque. Neuere Untersuchungen weisen hierbei auf regulierte Prozesse hin, welche Ähnlichkeiten zur physiologischen Kalzifikation im Rahmen der Knochenbildung aufweisen.³⁴⁻³⁶ In der Plaque können glatte GMZ mitunter eine osteoblastische Aktivität entwickeln,³⁷ während sich MP durch eine verminderter osteoklastische Aktivität auszeichnen.³⁸

Reißt die fibröse Kappe im Verlauf ein, so wird thrombogenes Material in das Gefäßlumen freigesetzt. Durch teilweise oder komplette Okklusion der Arterie kommt es dabei zu einem akuten ischämischen Ereignis, wie z. B. einem Herzinfarkt oder Schlaganfall.³⁰ Eine derartige Plaqueruptur findet sich in der Mehrzahl der Fälle eines akuten Koronarsyndroms. Seltener und insbesondere bei jungen Patienten und Frauen treten jedoch auch oberflächliche Erosionen von proteoglykan- und gefäßmuskelzellreichen Plaques auf, in denen kein nekrotischer Kern vorliegt bzw. zum Lumen hin exponiert wird.³⁹ Der Pathomechanismus der Endothelerosion ist noch nicht hinreichend geklärt.⁴⁰ Möglicherweise spielen sowohl endogene Mechanismen als auch bakterielle Strukturen eine Rolle, welche über eine Aktivierung des *Toll-like* Rezeptor-2 Apoptose in Endothelzellen induzieren können.⁴¹

Schließlich können Einblutungen in die Plaque infolge von Neovaskularisation oder Ruptur eine schnelle Größenzunahme und damit eine relevante Stenose bzw. eine komplette Okklusion verursachen.⁴² Die wichtigsten Stadien der Atherogenese sind in Abbildung 1 zusammengefasst.

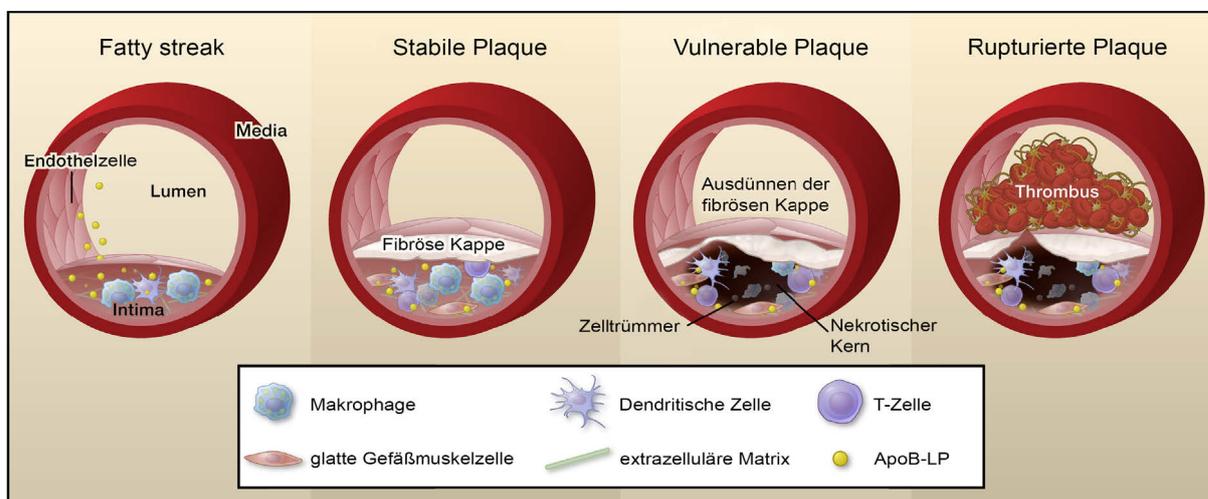


Abbildung 1: Entwicklung der atherosklerotischen Plaque

Eine Aktivierung von Endothelzellen unter anderem durch Retention von LDL bedingt eine endotheliale Dysfunktion und die Expression von Adhäsionsmolekülen. Leukozyten werden rekrutiert und wandern in die Läsion. Durch Phagozytose von LDL entwickeln sich aus Monozyten entstandene Makrophagen zu Schaumzellen. Es kommt zur Ausbildung von *fatty streaks*. Glatte Gefäßmuskelzellen migrieren aus der Media in die Plaque, sezernieren extrazelluläre Matrixproteine und bilden eine fibröse Kappe, was zu Stenosen führen kann, jedoch auch die Plaque stabilisiert. Dendritische Zellen aktivieren über Antigenpräsentation T-Zellen und stellen somit die Verbindung zum adaptiven Immunsystem dar. Die Retention von LDL und die Inflammation werden verstärkt. Durch Nekrose und Apoptose insbesondere von Schaumzellen sowie fehlerhafte Efferozytose bildet sich ein nekrotischer Kern heraus. Die verminderte Produktion extrazellulärer Matrixproteine, ein verstärkter Abbau durch Matrixmetalloproteinase und der Untergang von glatten Gefäßmuskelzellen bedingen ein Ausdünnen der fibrösen Kappe, wodurch die Plaque vulnerabel wird. Die chronische Entzündung kann zur Plaqueruptur führen, wodurch thrombogenes Material in das Gefäßlumen freigesetzt wird. Klinisch manifestiert sich dies häufig als akutes Koronarsyndrom oder Schlaganfall. Mit freundlicher Genehmigung von und modifiziert nach Moore KJ und Tabas I.¹⁰

3.3. Zelltypen und ihre Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose

Die atherosklerotische Plaque ist durch das Vorhandensein und die Interaktion diverser Zelltypen gekennzeichnet und stellt in seiner zellulären Zusammensetzung keineswegs ein statisches System dar. Prinzipiell können Zellen aus naheliegenden Regionen oder entfernten Organen an den Ort der Entzündung migrieren, sich differenzieren, mit anderen Zellen interagieren, diese stimulieren, einen Progress der Erkrankung bewirken oder auch zur Stabilisierung bzw. Regression beitragen.⁴³⁻⁴⁶

In die Plaque eingewanderte Monozyten differenzieren sich hauptsächlich in MP und können über diverse *pattern-recognition*-Rezeptoren, z. B. *Toll-like* Rezeptoren oder *scavenger*-

Rezeptoren, LDL phagozytieren.¹⁰ Morphologisch imponieren die so entstandenen Lipid-beladenen Zellen als Schaumzellen. Auch wenn die Genese der Schaumzellen nicht abschließend geklärt ist (siehe 3.2), so nehmen diese eine zentrale Rolle in der Atherogenese ein. In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl an humanen und murinen Untergruppen von Monozyten und MP mit unterschiedlichen phänotypischen Eigenschaften identifiziert.⁴⁷⁻⁵² Ein weitgehend akzeptiertes Konzept stellen klassisch aktivierte MP (M1 MP) und alternativ aktivierte MP (M2 MP) dar. Obwohl sich die Situation *in vivo* sehr komplex gestaltet und immer mehr MP-Subpopulationen charakterisiert werden, so wird den M1 MP generell eine proinflammatorische Rolle zugeschrieben, während die M2 MP vornehmlich eine antiinflammatorische Wirkung in der atherosklerotischen Plaque zeigen.⁴³ M1 MP finden sich daher auch vermehrt in lipidreichen Arealen.⁵¹ Neben der Phagozytose von LDL und Zelltrümmern und der Sezernierung diverser, vornehmlich proinflammatorischer Zytokine, können MP Matrixmetalloproteinasen produzieren, welche zum Abbau der extrazellulären Matrix und damit zur Destabilisierung einer Plaque beitragen.^{53,54} Weiterhin können MP über die Induktion von Apoptose in glatten GMZ ein Ausdünnen der fibrösen Kappe, Kalzifikation, Progress der Atherosklerose und Plaqueruptur fördern^{32,55,56} oder durch die Freisetzung von Matrixvesikeln direkt eine Mikrokalzifikation begünstigen.⁵⁷ Auf der anderen Seite stellen Autophagie und das Auswandern der MP aus der Plaque jedoch wichtige Mechanismen zur Stabilisierung einer Plaque dar.^{44,46}

Glatte GMZ bilden einen Großteil der Blutgefäßwand und sind über Kontraktion an der Regulierung des Blutdrucks und der Durchblutung beteiligt.⁵⁸ Im Rahmen der Atherosklerose führen die Aktivierung des Endothels sowie durch Leukozyten freigesetzten Zytokine und Wachstumsfaktoren zur einer Migration von glatten GMZ in die Läsion.^{33,59} Proliferierende GMZ bilden die fibröse Kappe und sezernieren Matrixproteine wodurch sie zwar zum Wachstum der Plaque und damit Stenosebildung beitragen, aber auch eine schützende, stabile Schicht zwischen nekrotischem Kern und intravasalem Lumen ausbilden.⁸ Gleichzeitig tragen jedoch auch GMZ selbst zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion bei.³³ Bereits vor langer Zeit wurden verschiedene glatte GMZ-Phänotypen beschrieben.^{60,61} In der fibrösen Kappe kommt es zu einer Umwandlung der GMZ vom kontraktile in den synthetischen Phänotyp,^{62,63} welcher sowohl andere Matrix-⁶⁴ als auch kontraktile und zytoskelettale Proteine synthetisiert. Weiterhin werden die intrazellulären Strukturen reorganisiert⁶⁵ und gefäßmuskelzelltypische Marker herunterreguliert, während Migration und Proliferation zunehmen.⁵⁸ Glatte GMZ, welche Lipid-geladene Lysosomen aus MP aufgenommen haben, zeigen *in vitro* zudem schaumzellartige Eigenschaften.²⁶

Die beschriebenen Funktionen und phänotypische Merkmale der glatten GMZ gelten als weitestgehend etabliert, dürfen jedoch nicht gänzlich unkritisch gesehen werden. So scheint von diversen identifizierten und für vergangene Forschungsarbeiten genutzten GMZ-Markern

lediglich die Isoform des *myosin heavy chain* exklusiv von glatten GMZ exprimiert zu werden.^{66,67} In cholesterobeladenen GMZ wiederum werden GMZ-Marker herunterreguliert und stattdessen makrophagentypische Antigene exprimiert.⁶⁸ Die eindeutige Zuordnung von Zellen zu GMZ oder MP gestaltet sich daher mitunter schwierig und ist Gegenstand aktueller Kontroversen.⁵⁸ Tang *et al.* stellen das Konzept der geänderten Phänotypen in Frage und postulieren stattdessen das Vorhandensein multipotenter vaskulärer Stammzellen.⁶⁹ Die Methodik und Schlussfolgerungen der von ihnen publizierten Arbeit werden jedoch kritisiert.⁷⁰ Endothelzellen bilden die innerste Schicht von Blutgefäßen und steuern über endokrine sowie parakrine Mechanismen die Gefäßfunktion.⁷¹ Das Endothel fungiert als antithrombotische Oberfläche⁷², reguliert den Durchtritt von Flüssigkeiten und Makromolekülen zwischen Blut und zu versorgendem Gewebe⁷³ und spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Durchblutung über die Sekretion diverser vasoaktiver Substanzen wie Stickstoffmonoxid, Prostaglandine, *endothelial-derived hyperpolarizing factors* und Endothelin.⁷⁴⁻⁷⁶ Zuvor genannte Risikofaktoren (siehe 3.1) führen zu Schädigung bzw. Beeinflussung der Endothelzellen und bewirken die endotheliale Dysfunktion. Diese stellt im gegenwärtigen Konzept den Ausgangspunkt der Entzündung dar, welche zur Atherosklerose führt.^{8,33,77} Die Aktivierung des Endothels, z. B. durch oxidiertes LDL⁷⁸ oder veränderte Scherkräfte,⁷⁹ führt zu einer erhöhten Permeabilität für LDL und zur Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren. Dies fördert die Rekrutierung im Blut zirkulierender Monozyten und anderer Leukozyten, welche in die Intima einwandern und dort lokal die Entzündungsreaktion verstärken.^{11,80}

Dendritische Zellen aktivieren über Antigenpräsentation das adaptive Immunsystem und treten vermehrt in vulnerablen Plaques auf.⁸¹ Sie finden sich in der Intima und präsentieren LDL-Fragmente an T-Zellen.^{82,83} Diese werden aktiviert und produzieren proinflammatorische Zytokine, welche die Aufnahme von LDL in MP und damit die Schaumzellbildung fördern.⁸⁴ T-Zellen spielen trotz ihrer geringen Anzahl sowohl in der initialen Läsion als auch im Progress der atherosklerotischen Plaque eine wichtige Rolle. Diverse Untergruppen sind charakterisiert und auf ihre Eigenschaften in der Atherosklerose hin untersucht worden. Sie können sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken.^{85,86} Nach Antigenpräsentation durch dendritische Zellen außerhalb der Plaque differenzieren naive T-Zellen in proinflammatorische Th1-Effektorzellen. Diese zirkulieren im Blut, migrieren in atherosklerotische Läsionen und können dort durch LDL-Fragmente erneut aktiviert werden, was zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führt.⁸⁷ Regulatorische T-Zellen wiederum können durch Sezernierung antiinflammatorischer Zytokine atheroprotektiv wirken.⁸⁸ Vulnerable Plaques zeichnen sich durch einen geringeren Anteil regulatorischer T-Zellen aus.⁸¹

B-Zellen finden sich nur vereinzelt in atherosklerotischen Plaques,⁸⁹ sind jedoch häufiger in der Adventitia von Blutgefäßen anzutreffen.⁹⁰ B1-Zellen produzieren IgM-Antikörper (AK), von denen bis zu 30 % gegen *oxidation-specific epitopes* (OSEs) gerichtet sind. OSEs finden sich unter anderem an oxidiertem LDL und vermitteln üblicherweise eine proinflammatorische Reaktion.⁹¹ Auch wenn der genaue Mechanismus noch nicht geklärt ist, verhindern entsprechende IgM-AK möglicherweise die Aufnahme von oxidiertem LDL durch Makrophagen und fördern die Efferozytose.⁹² B1-Zellen wirken so mitunter atheroprotektiv, obwohl sie vor allem in serösen Höhlen und der Milz, weniger in der Plaque zu finden sind.⁹³ B2-Zellen sollen dagegen durch Sekretion von Zytokinen und Interaktion mit anderen Leukozyten eine proinflammatorische Wirkung zeigen.⁹⁴

Neutrophile Granulozyten zirkulieren in großer Anzahl im peripheren Blut und sammeln sich früh in Läsionen. Sie unterstützen insbesondere die Adhäsion und Transmigration von Monozyten durch die Freisetzung von Granulaproteinen. Dieser Mechanismus scheint vor allem in frühen Stadien der Atherosklerose eine wichtige Rolle zu spielen. Dazu passend ist das Vorliegen einer Hypercholesterinämie als bekannter Risikofaktor der Plaquebildung auch als Ursache für eine Neutrophilie beschrieben worden.⁹⁵

Mastzellen spielen sowohl in allergischen Reaktionen als auch angeborenen Immunantworten eine wichtige Rolle durch das Freisetzen diverser Mediatoren. Durch Aktivierung werden unter anderem Histamin, Serotonin, Thromboxan, Serinproteasen und Zytokine wie Interferon- γ und Interleukin-6 freigesetzt. Dadurch wirken Mastzellen in der atherosklerotischen Plaque sowohl proinflammatorisch als auch proteolytisch.^{96,97}

Thrombozyten nehmen vor allem bei der Thrombusbildung infolge einer Plaqueruptur oder Endothelerosion und damit erst im Kontext des akuten ischämischen Ereignisses eine zentrale Rolle ein. Im Blut zirkulierende Thrombozyten können jedoch auch Aggregate mit Monozyten und anderen Leukozyten bilden und über die Aktivierung von Adhäsionsmolekülen den Eintritt von Leukozyten in die atherosklerotische Läsion unterstützen.⁹⁸

3.4. Der interzelluläre Transport Lipid-geladener Lysosomen aus Makrophagen in glatte Gefäßmuskelzellen

Sowohl die Genese als auch die Funktion der Schaumzellen und glatten Gefäßmuskelzellen in der atherosklerotischen Plaque sind Gegenstand aktueller Forschung und Kontroversen. Weinert *et al.* untersuchten die Interaktion zwischen Lipid-geladenen MP und glatten GMZ sowie eine mögliche Transdifferenzierung von MP in GMZ in der Kokultur.²⁶ Mit Alexa Fluor 594-konjugiertem, acetyliertem *low density lipoprotein* (AcLDL) beladene Makrophagen übertragen dies in Kokulturen bereits nach wenigen Stunden auf humane und

murine glatte GMZ. Durch die Verwendung räumlich getrennter Kokulturen sowie durch Konstruktion und adenovirale Transduktion eines Fusionsproteins zur Markierung früher Endosomen konnte die LDL-Aufnahme durch GMZ mittels Phagozytose von Exosomen ausgeschlossen werden. Mit Hilfe eines weiteren Fusionsproteins für die Markierung von Lysosomen und die Verwendung organellenspezifischer Farbstoffe konnte die Lokalisierung des AcLDL ausschließlich in Lysosomen und der Transfer intakter Lysosomen von MP in glatte GMZ *in vitro* gezeigt werden. Eine Transdifferenzierung von MP in GMZ wurde durch *real-time* Polymerase-Kettenreaktion an xenogenen Kokulturen, Lebendzellmikroskopie und durch Verwendung von GMZ einer Maus, die ubiquitär *green fluorescent protein* (GFP) exprimiert, ausgeschlossen. Die Lipid-beladenen GMZ zeigten dabei ein makrophagenähnliches Genexpressionsmuster, Phagozytoseaktivität sowie einen schaumzellähnlichen Phänotyp. Durch diesen Mechanismus tragen glatte GMZ, welchen prinzipiell eine Plaque-stabilisierende Wirkung zugesprochen wird, möglicherweise zum Progress der Atherosklerose, zur Destabilisierung der Plaque, Ruptur der fibrösen Kappe und Thrombusbildung bei. Eine Limitierung der Arbeit von Weinert *et al.* liegt in der Beschränkung der Experimente auf Umgebungsluftbedingungen mit einem Sauerstoffpartialdruck vom ca. 21 kPa. Der arterielle Sauerstoffpartialdruck im Menschen liegt bei etwa der Hälfte dessen und unter hypoxischen Bedingungen werden noch weit geringere Werte erreicht. Im Folgenden ist dargestellt, warum die Untersuchung des LDL-Transfers von MP auf glatten GMZ unter Sauerstoffmangel sinnvoll und notwendig erscheint.

3.5. Die Bedeutung der Hypoxie in der Atherosklerose

Sowohl die systemische Hypoxie als auch lokal begrenzte hypoxische Areale in atherosklerotischen Plaques, wie insbesondere der nekrotische Kern, nehmen eine wichtige Rolle in der Atherogenese ein.

Ein weit verbreitetes Krankheitsbild, welches mit einem stark erhöhten Risiko für kardiovaskulärer Erkrankungen einhergeht, ist das obstruktive Schlafapnoesyndrom (OSAS). OSAS-Patienten leiden an chronisch intermittierenden Abfällen der Sauerstoffsättigung mit anschließender Reoxygenierung.⁹⁹ Ein dadurch erhöhtes Level an oxidativem Stress wird als mögliche Ursache für den fortschreitenden Krankheitsverlauf diskutiert.¹⁰⁰ Im Mausmodell konnte einerseits ein proatherogener Effekt der chronisch intermittierenden Hypoxie demonstriert werden,¹⁰¹ andererseits zeigten sich frühe Stadien der Atherosklerose in OSAS-Patienten reversibel, welche mit einer nichtinvasiven, kontinuierlichen Überdruckbeatmung behandelt worden sind.^{102,103} Weiterhin ließen sich in einzelnen Studien an Mausmodellen und Menschen eine Verminderung der Atherosklerose durch eine

hyperbare Sauerstofftherapie erzielen.^{104,105} Obwohl die gezeigten Daten weder beweisend sind, noch der genaue Mechanismus hinreichend erforscht ist, lässt sich ein durch systemischen Sauerstoffmangel bedingter proatherosklerotischer Effekt vermuten.

Das Vorhandensein hypoxischer Areale in atherosklerotischen Plaques konnte von mehreren Arbeitsgruppen *in vivo* gezeigt werden.^{106,107} Hier scheinen Makrophagen besondere Widerstandsmechanismen zu besitzen und länger zu überleben als andere Zellarten. Durch Hemmung der Emigration von MP begünstigt die Hypoxie eine Kumulation von Schaumzellen und die Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion.¹⁰⁸

Auf metabolischer Ebene verursacht der Sauerstoffmangel vielerlei Veränderungen. Eine vermehrte anaerobe Glykolyse bewirkt eine Ansammlung von Laktat und Absenkung des pH-Wertes. Sowohl erhöhte Laktatkonzentrationen¹⁰⁹ als auch eine systemische Azidose oder lokale Ansäuerung der Plaque können die Atherogenese weiter fördern.^{110,111} Außerdem findet sich eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). ROS sind wiederum in der Bildung von modifiziertem LDL beteiligt und bewirken eine Endothelaktivierung, Proliferation oder Zelltod von GMZ sowie die Rekrutierung bzw. Aktivierung von MP.¹¹²⁻¹¹⁵ Weiterhin wurde ein Einfluss von Hypoxie auf den Lipidstoffwechsel und die Differenzierung von MP-Subpopulationen beschrieben.¹¹⁶

3.6. Autofluoreszenz

Als Autofluoreszenz oder auch unspezifische Fluoreszenz wird im Allgemeinen jede Form natürlicher oder durch chemische Fixation entstandene Fluoreszenz bezeichnet. Diese kann zwar zu diagnostischen Zwecken genutzt werden,¹¹⁷ stellt in der Fluoreszenzmikroskopie jedoch einen Störfaktor dar. Quellen natürlicher Fluoreszenz in tierischen Zellen sind z. B. Flavine und NADH bzw. NADPH,¹¹⁸ Lipofuszin und AGE,¹¹⁹ Protoporphyrin IX,¹²⁰ Kollagen und Elastin.¹²¹ Insbesondere die Letztgenannten finden sich in den Wänden von Blutgefäßen und können fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen erschweren.

Aldehydhaltige Fixationslösungen bzw. freie Aldehydgruppen können mit Aminen und Proteinen reagieren und dabei fluoreszierende Produkte generieren, wobei Formaldehyd geringere Autofluoreszenz verursacht als Glutaraldehyd.¹²² Weiterhin kommen Bestandteile von Kulturmedien als potentielle Quellen von Autofluoreszenz in Frage. Zu nennen sind insbesondere aromatische Aminosäuren und deren Derivate sowie verschiedene Vitamine.¹²³ Die unspezifische Bindung von Antikörpern kann ebenfalls zu fehlerhaften Ergebnissen führen, stellt jedoch keine Autofluoreszenz im eigentlichen Sinne dar.

Generell gibt es verschiedene Strategien, um dem Problem der Autofluoreszenz zu begegnen. Dazu gehören dessen Vermeidung, die Verwendung spezifischer Filter oder dessen chemische Elimination.¹²² Ein Vermeiden ist nicht immer möglich, stellt jedoch die

einfachste Methode dar. Insbesondere durch die Wahl geeigneter Kulturmedien, Fixierungsmethoden und Eindeckmedien lässt sich Autofluoreszenz häufig vermeiden oder wenigstens deutlich verringern.¹²⁴ Weiterhin ist die Intensität spezifischer und auch unspezifischer Fluoreszenz abhängig vom pH-Wert und der Temperatur,^{125,126} sodass sich durch entsprechend gewählte Bedingungen die Qualität der Ergebnisse optimieren lässt. Staughton *et al.* konnten zeigen, dass sich Autofluoreszenz weitestgehend temperaturunabhängig verhält, wohingegen Tracer-Substanzen intensiver leuchten, je niedriger die Umgebungstemperatur gewählt wird.¹²⁶ Auch die Wahl geeigneter Filtersets für die Fluoreszenzmikroskopie nimmt eine wichtige Rolle ein, da die Exzitations- und Emissionsmaxima autofluoreszierender Substanzen mit denen häufig genutzter Fluorochrome, wie z. B. GFP, überlappen können.¹²⁴ Durch chemische Reaktionen lassen sich fluoreszierende Substanzen häufig so beeinflussen, dass Autofluoreszenz nicht mehr bzw. vermindert auftritt oder die Maxima in unproblematische Regionen verschoben werden. Zum diesem so genannten *quenching* existiert eine Vielzahl verschiedener Protokolle mit unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten sowie Vor- und Nachteilen.^{122,124} Als Beispiel sei hier das Blockieren freier Aldehydgruppen mittels Glycin, bovinem Serumalbumin, Milchpulver oder Natriumborhydrid erwähnt. Hierbei werden die Aldehyd- zu Hydroxylgruppen reduziert und stehen anschließend nicht mehr zur Reaktion mit Aminogruppen zur Verfügung. So wird nicht nur die Entstehung fluoreszierender Produkte verhindert, sondern auch die Reaktion mit Lysinresten von Proteinen und damit das unspezifische Binden von Antikörpern.^{122,127,128} Eine neuere Methode zur Reduktion von Autofluoreszenz stellt das *photobleaching* dar, bei dem die Proben vor Aufbringen der spezifischen Färbung intensiv mit Licht bestrahlt werden.¹²⁹ Hierbei macht man sich den meist unerwünschten Effekt zu Nutze, dass Fluorochrome mit der Dauer der Anregung an Leuchtkraft verlieren. Zu einer Optimierung der Ergebnisse führt die Kombination mit chemischem *quenching*.¹³⁰ Eine weitere Methode, welche zur Differenzierung zwischen spezifischer und unspezifischer Fluoreszenz genutzt wird, ist die Fluoreszenzpolarisation. Hierbei macht man sich das Prinzip zu Nutze, dass mit linear polarisiertem Licht angeregte Fluorophore oft ebenso linear polarisiertes Licht emittieren. Große und langsam rotierende Moleküle, wie z. B. GFP, lassen sich mit Hilfe spezieller Polarisationsfilter von kleineren, schnell rotierenden natürlich vorkommenden autofluoreszierenden Molekülen oder Fluorescein(isothiocyanat) (FITC) unterscheiden.¹³¹

3.7. Bildsegmentierung, grafische Filter und *high-content* Analysen

Bildsegmentierung kann als das Zerlegen eines Bildes in einzelne, sich nicht überschneidende Regionen mit bestimmten homogenen Eigenschaften definiert werden. Durch Zusammenfassung benachbarter Pixel werden inhaltlich zusammenhängende Regionen erzeugt. Ziel ist die Vereinfachung oder Abänderung des Bildes, um bestimmte Informationen zu gewinnen bzw. dieses leichter analysieren zu können.^{132,133} Neben biologischen Fragestellungen findet die Bildsegmentierung auch in anderen Bereichen breite Anwendung, u. a. in der radiologischen Bildgebung,^{134,135} der Robotik und Automatisierung¹³⁶ oder auch der Astronomie.¹³⁷ Sie ist ein essentieller Schritt im Rahmen der automatischen Bildanalyse,^{138,139} wenngleich in jüngerer Vergangenheit auch Algorithmen zur Bildanalyse entwickelt wurden, welche ohne vorherige Segmentierung auskommen.¹⁴⁰⁻¹⁴²

Beispiele für Methoden zur Bildsegmentierung stellen pixelorientierte, kantenorientierte, regionenorientierte, texturbasierte und modellbasierte Verfahren dar, wobei die Grenzen zwischen den einzelnen Verfahren fließend sein können und diverse weitere Algorithmen publiziert worden sind. Diese Vielfalt deutet bereits an, dass bislang keine optimale Methode existiert. Vielmehr hängt das Ergebnis von der Art und Beschaffenheit des jeweiligen Bildes ab. Nicht jedes Verfahren zur Bildsegmentierung kann für jede Art von Bild verwendet werden und insbesondere biologische Aufnahmen lassen sich oft nur schwer segmentieren.^{133,139,143} Die folgenden Ausführungen dienen dazu, dem Leser einen allgemeinen Überblick zu verschaffen und erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die mathematischen Grundlagen der erwähnten Methoden sind in der einschlägigen Literatur vertiefend dargestellt.

Schwellenwertverfahren (*thresholding*) dienen dazu, anhand eines Schwellenwertes für ein Graustufenbild festzulegen, welche Pixel bestimmten Klassen angehören (z. B. Vordergrund und Hintergrund). Einfache Schwellenwertverfahren führen so zu einer Binärisierung des Bildes. Werden mehrere Schwellenwerte gesetzt, spricht man von *Multithresholding*.¹⁴⁴ Das Setzen des Schwellenwertes kann manuell oder anhand verschiedener Algorithmen erfolgen. Ein bekanntes Verfahren zum globalen *thresholding* stellt die Methode nach Otsu dar, welche sich der Diskriminanzanalyse bedient. Durch den ermittelten Schwellenwert werden Klassen bestimmt, innerhalb derer die Streuung klein, zwischen den einzelnen Klassen jedoch möglichst groß ist.¹⁴⁵ Der Vorteil des *thresholding* liegt in dem vergleichsweise geringen Rechenaufwand. Globale Methoden legen den Schwellenwert für das gesamte Bild fest. Insbesondere in inhomogen belichteten und verrauschten Bildern führt dies allerdings oft zu unzureichenden Ergebnissen. Lokale Schwellenwertverfahren legen entsprechende Schwellenwerte für jeden einzelnen Pixel fest, sind weniger artefaktanfällig, bedeuten jedoch auch einen erheblichen mathematischen Mehraufwand. Ein

weiterer Nachteil von Schwellenwertverfahren besteht darin, dass nur einzelne Bildkanäle bearbeitet werden können.^{133,139}

Region growing ist ein regionenorientiertes Verfahren, bei dem jedes Pixel als einzelnes Segment betrachtet wird. Pixel mit ähnlichen Eigenschaften werden durch mehrfache Wiederholung zu größeren Segmenten zusammengefügt. Die Methode ist simpel, bei alleiniger Anwendung ohne weitere Filter jedoch sehr artefaktanfällig.^{133,139}

Kantenorientierte Verfahren zielen dagegen auf die Detektion von Objektübergängen und Kanten ab. Beispiele stellen Wasserscheidenfilter (*watershed*)¹⁴⁶ und aktive Konturmodelle (*Snakes*)¹⁴⁷ dar. In der Wasserscheidentransformation werden Graustufenbilder als dreidimensionale Oberflächen mit Gebirgen und Tälern dargestellt. Durch "Fluten" der Täler werden die Kammlinien detektiert. Wasserscheidenfilter führen oft zur Übersegmentierung, sodass fehlerhaft getrennte Objekte wieder zusammengeführt werden müssen.¹³³ *Snakes* dienen dazu, den bestmöglichen Umriss eines Objektes aus vielen verschiedenen Möglichkeiten zu finden und gehören daher auch zu den Optimierungsmethoden. Aktive Konturmodelle können auch in verrauschten Bildern gute Ergebnisse liefern¹³⁹ und eignen sich sowohl für bewegte Bilder als auch für die Objektverfolgung.¹³³ Sie finden eine breite Verwendung in medizinischen Anwendungen, wie der Echokardiografie,^{148,149} dem intravaskulären Ultraschall,^{150,151} der Computertomografie^{152,153} und der Magnetresonanztomografie.^{154,155}

Weitere und insbesondere praktisch bedeutende Methoden zur Bildverarbeitung und Segmentierung stellen Klassifikationsverfahren (*classifiers*),^{156,157} Cluster,^{158,159} atlasbasierte Verfahren,^{156,157} *Markov random fields*^{160,161} und künstliche neuronale Netzwerke^{162,163} dar, auf die an dieser Stelle jedoch nicht näher eingegangen werden soll.

Grafische Filter konvertieren ein Bild derart, dass sich seine Eigenschaften ändern, und werden häufig bereits vor der Segmentierung eingesetzt.¹³⁹ Filtermethoden dienen unterschiedlichen Zwecken. So existieren unter anderem Filter zum Weichzeichnen bzw. Glätten, Schärfefilter und Filter zur Kantenextraktion. Auf Basis der verwendeten Rechenoperationen kann man zwischen linearen und nichtlinearen Filtern unterscheiden. Erstere verknüpfen die Pixelwerte innerhalb der Filterregion in linearer Form, das heißt durch eine gewichtete Summation, während Letztere auf nichtlinearen Operationen wie beispielsweise der Auswahl von Minimal- und Maximalwerten basieren.¹⁶⁴ Glättungsfilter (z. B. *blur*-, *median*- oder *bilateral*-Filter) werden häufig genutzt, um unspezifisches Rauschen aus Bildern zu eliminieren. *Sobel*-, *Laplace*- und *Canny*-Filter dienen der Detektion von Kanten innerhalb eines Bildes. Schärfefilter dienen dazu, die Kantenregionen innerhalb von Bildern zu verstärken.^{139,164}

Anhand der Darstellung wird deutlich, dass in der Bildverarbeitung selten isolierte Methoden zum Einsatz kommen. Vielmehr werden die besten Ergebnisse in den meisten Fällen durch

die geschickte Kombination verschiedener Algorithmen erzielt, um die Stärken einzelner Verfahren zu nutzen und deren Schwächen möglichst zu umgehen.

High-content Analysen schließen verschiedene Methoden ein, welche darauf abzielen, in größerem Maßstab komplexe Informationen aus einzelnen Zellen zu gewinnen. Klassischerweise gehört hierzu die Kombination aus automatisierter Mikroskopie und quantitativer Bildanalyse, welche auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wird. Im weiteren Sinne können jedoch auch eine Vielzahl anderer Untersuchungsmethoden unter dem Begriff *high-content* Analyse subsumiert werden. Methoden, welche oft nur auf die Exploration einzelner Eigenschaften abzielen und auf einen maximalen Durchsatz optimiert sind, werden auch als *high-throughput screening* bezeichnet. Diese finden zum Beispiel in der Arzneimittelforschung breite Anwendung.¹⁶⁵

3.8. Zielstellung der Arbeit

Die Genese der Schaumzellen, Progress und Destabilisierung der Plaque sind bis heute zentrale Schwerpunkte in der Erforschung der Atherosklerose. Ein genaues Verständnis der Pathophysiologie ist die Grundlage für die Entwicklung zielgerichteter und optimierter Therapieoptionen.

Vor diesem Hintergrund verfolgt die vorliegende Arbeit primär das Ziel, den Transfer Lipid-geladener Lysosomen von Makrophagen in glatte Gefäßmuskelzellen unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen zu quantifizieren, da insbesondere die fortgeschrittene Plaque mit dem nekrotischen Kern hypoxische Areale aufweist. Anhand größerer Datenmengen sollten die von Weinert *et al.* erhobene Ergebnisse²⁶ für die Hypoxie validiert werden.

Da sich die Verwendung etablierter Methoden als nicht geeignet herausgestellt hat, wird im Rahmen der vorgelegten Studie eine neue Methodik zur Generierung und Auswertung einer Vielzahl fluoreszenzmikroskopischer Proben validiert, für weitere Analysen der Arbeitsgruppe etabliert und vorgestellt. Zentrale Anforderungen an die entwickelte Methodik waren neben der primären Fragestellung die Fokussierung auf *open-source*-Lösungen, die Umsetzbarkeit mit limitierter personeller und instrumenteller Ausstattung sowie eine prinzipielle Anwendbarkeit für spätere Nutzungen. Mögliche Störfaktoren, Fallstricke und Limitierungen sollten identifiziert und entsprechende Problemlösungen erarbeitet werden. Etablierte Methoden in der Immunzytochemie, Fluoreszenzmikroskopie und Bildsegmentierung sollten in diesem Zusammenhang auf Ihre Anwendbarkeit für spezifische Untersuchungen zum LDL-Transfer überprüft und entsprechend modifiziert und weiterentwickelt werden.

4. Material und Methoden

4.1. Verwendete Geräte und deren Hersteller

Geräte	Hersteller
Autoklav Laboklav 80-V	SHP-Steriltechnik
Chemikalienfeinwaage Ab104-S/Ph	Mettler-Toledo
Chemikalienwaage KERN 440-33	KERN
Fluoreszenzmikroskop Stativ voll motorisiertes Axiovert 200m mit AxioCam MRm und MRc, life-cell-imaging box H201, Fluoreszenzfilter: Zeiss No. 49 (EX G 365, BS 395, EM 445/100), HQ-FITC (EX BP 480/40, BS 505, EM 535/50), HQ-Texas Red (EX 560/55, BS 595, EM 645/75), motorisierter XY-Objektisch, Aufnahme und Stativkontrolle durch AxioVision 4.8 Objektive: LD Achromplan 40x/0,60 Korr.; EC Plan-Neofluar 10x/0,30	Carl Zeiss (Stativ, Kameras, Filter und Software) Okolab (Lebendzellbeobachtungs-Ausrüstung) Chroma Technology Corp. (HQ-Fluoreszenzfilter) Maerzhaeuser Wetzlar (Objektisch)
Gasmischer 2GF Mixer	Okolab
Hypoxiekammer Nalgene 5317-0070	Thermo Fisher Scientific
Inkubator MCO-18AJC	Sanyo
Mikroskop Axiovert 40 C	Carl Zeiss
Sauerstoffkontrollgerät ProOx P110	BioSpherix
Sicherheitswerkbank Hera Safe KS 18	Thermo Fisher Scientific
Trockenschrank VENTI-Line VL115	VWR International
Ultraschallbad USC500TH	VWR International
Wasserbad SW 22	Julabo
Zentrifuge Allegra X-15R Benchtop	Beckman Coulter

Tabelle 1: Verwendete Geräte und deren Hersteller

4.2. Verwendete Chemikalien

Sämtliche verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von AppliChem oder Sigma-Aldrich mindestens in der Qualität *pro analysi* bezogen. Alle verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und Reagenzien stammen von Life Technologies bzw. Thermo Fisher Scientific.

4.3. Verwendete Kulturmedien, Puffer und Zellkulturlösungen

Kulturmedien und Zusätze für die Zellkultur	
Antibiotika/Antimykotika-Mix (PAA Laboratories)	10000 IU/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycinsulfat 25 µg/ml Amphotericin B
Zellkulturmedium für glatte GMZ und MP (D10F+)	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium low Glucose</i> (1 g/l) (PAA Laboratories) 10 % (v/v) Fetales Kälberserum (FCS) 1 % (v/v) Antibiotika/Antimykotika-Mix
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	10 mM Dinatriumhydrogenphosphat 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat 140 mM Natriumchlorid 3 mM Kaliumchlorid pH 7,4
Monozytenwaschpuffer	0,5 % (w/v) Bovines Serumalbumin 2,0 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in PBS
Trypsin/EDTA-Lösung (PAA Laboratories)	0,50 mg/ml Trypsin 0,22 mg/ml EDTA in PBS

Tabelle 2: Verwendete Kulturmedien, Puffer und Zellkulturlösungen

4.4. Verwendete Zellen

In Vorexperimenten im Rahmen der Optimierung der Methodik kamen glatte GMZ sowohl der Ratte und einer GFP-Maus als auch humane Zellen aus Explantaten zur Anwendung. Stamm und Lieferant der Tiere sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Normoxie/Hypoxie-Experimente wurden ausschließlich mit glatten GMZ der GFP-Maus durchgeführt. Zur Gewinnung von Makrophagen wurden primäre Monozyten von gesunden männlichen und weiblichen Spendern aus Leukozytenfiltern isoliert und über mindestens 2 Wochen in MP differenziert.

4.5. Zellkultur

4.5.1. Isolation humaner Monozyten durch doppelte Dichtegradientenzentrifugation

Die Isolation von Monozyten erfolgte aus steril verschlossenen Leukozytenfiltern, welche im Rahmen von Blutspenden zur Leukozytendepletion eingesetzt und freundlicherweise vom Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der Universitätsklinik Magdeburg bereitgestellt wurden.

Nach dem Desinfizieren mit Alkohol wurden die Filter an beiden Schlauchenden aufgeschnitten und mit insgesamt 150 ml PBS/EDTA (5 mM EDTA) pro Filter retrograd ausgespült. Die Zellsuspension wurde anschließend 15 min bei 400 rcf und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, das Volumen durch Absaugen des Überstandes verringert und die Zellen resuspendiert. Die Isolation von Monozyten erfolgte dann durch doppelte Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurden 15 ml Lymphozytentrennmedium LSM1077 (PAA Laboratories) in spezielle 50 ml Leukozytentrennröhrchen (Leucosep, Greiner Bio-One) vorgelegt und durch die poröse Membran zentrifugiert. Anschließend erfolgte das vorsichtige Überschichten mit der Zellsuspension und die 15-minütige Zentrifugation bei 1000 rcf, RT und ausgeschalteter Bremse. Durch diesen Zentrifugationsschritt bildete sich oberhalb der Interphase ein weißer Ring aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes aus, welcher nun vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 ml Röhrchen überführt werden konnte. Nach Resuspension mit Monozytenwaschpuffer auf 50 ml wurde erneut bei RT und 250 rcf zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt und anschließend ein viertes Mal mit 100 rcf durchgeführt, um verbliebene Thrombozyten zu entfernen.

Zur Anreicherung der Monozytenfraktion wurde nun eine Percoll-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Percoll-Stammlösung mit einer spezifischen Dichte von ($\rho = 1,123 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) wurde durch Verdünnen mit physiologischer Kochsalzlösung ($\rho = 1,0046 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) auf eine Dichte von $\rho = 1,064 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ eingestellt. Die untenstehende Formel diente zur Orientierung, wobei die Feineinstellung der Dichte mittels eines Aräometers durchgeführt wurde.

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

Formel zur Berechnung des Mischungsverhältnisses

7 ml der Percoll-Lösung wurden nun in 15 ml Polystyrol-Röhrchen vorgelegt und sehr vorsichtig mit 6 ml der Zellsuspension überschichtet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 20 min bei 800 rcf, RT und ausgeschalteter Bremse. Die Interphase mit ca. 70 % CD14-positiven Zellen wurde abgenommen, in Monozytenwaschpuffer resuspendiert und bei

200 rcf und RT für 10 min zentrifugiert, danach in D10F+ aufgenommen, um schließlich die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer zu bestimmen. Zur Differenzierung in Makrophagen wurden jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen pro *Well* (Loch) auf *6-Well ultra-low-attachment*-Platten (Costar, Corning) ausgesät. Die Zellen wurden mindestens 2 Wochen bei 37 °C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% (v/v) CO₂ kultiviert. In den ersten 5 Tagen wurde nur Medium hinzugegeben, um einen Verlust von nicht adhärenen Monozyten zu vermeiden. Kontaminierende T-Zellen wurden schließlich durch das Wechseln des Mediums dreimal pro Woche entfernt.

4.5.2. Isolation glatter Gefäßmuskelzellen aus Nageraorten und humanen Explantaten

Die Isolation glatter GMZ aus Nageraorten und humanen Explantaten unterschieden sich nicht wesentlich, sodass sie nachfolgend zusammen beschrieben sind. Alle Organentnahmen wurden in Übereinstimmung mit dem *Guide for care and usage of laboratory animals* des National Institute of Health¹⁶⁶ sowie dem deutschen Tierschutzgesetz in der jeweils aktuellen Fassung durchgeführt. Die verwendeten Tiere sind in Tabelle 3 aufgeführt.

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

Tabelle 3: Verwendete Tierarten

Humane glatte GMZ wurden aus anonymisierten Operationspräparaten von peripheren Arterien isoliert, welche freundlicherweise von der Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie (Abteilung Gefäßchirurgie, Prof. Dr. Z. Halloul) zur Verfügung gestellt wurden. Ein Votum der Ethikkommission lag vor. Die Grundsätze der Deklaration von Helsinki wurden beachtet.

Die etwa 1 cm großen humanen Gewebestücke wurden intraoperativ in vorbereitete sterile Behälter mit PBS und Antibiotikamix überführt und unverzüglich abgeholt. Analog wurden die Baucharterien von toten Nagern entnommen und in ein steriles 15 ml Röhrchen mit ca. 5 ml PBS überführt. Die weiteren Arbeiten wurden innerhalb einer Sicherheitswerkbank im eigenen Labor durchgeführt.

Die Nageraorten wurden mittels eines sterilen Präparationsbestecks grob gereinigt, längs aufgetrennt und mit der luminalen Seite nach oben platziert, um durch Abschaben mit dem

Skalpell Blutreste und Endothelzellen zu entfernen. Die humanen Präparate wurden auf gleiche Weise gereinigt und durch Abziehen die luminale sowie adventitielle Schicht entfernt. Größere Proben wurden in etwa 1 cm große Stücke zerteilt, mit der luminalen Seite nach unten in je eine 57 cm² große Zellkulturschale gegeben und vorsichtig mit 8 ml D10F+ überschichtet. Anschließend erfolgte die möglichst erschütterungsfreie Inkubation bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % (v/v) CO₂, was ein spontanes Auswachsen der glatten GMZ bewirkte. Bei jedem Mediumwechsel wurden die Gewebestücke ein wenig verschoben, um möglichst viele primäre Zellen zu gewinnen. Nach einer Woche wurden die Zellen passagiert und im Anschluss, wie unter Kapitel 4.5.3 beschrieben, kultiviert. Die primären glatten GMZ wurden routinemäßig auf Mycoplasmenkontamination und Reinheit untersucht.

4.5.3. Kultur glatter Gefäßmuskelzellen

Nach initialer Passage wurden die glatten GMZ weiterhin routinemäßig in 57 cm² großen Zellkulturschalen mit 10 ml D10F+ im begasten Brutschrank bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % (v/v) CO₂ kultiviert. Das Medium wurde dreimal wöchentlich durch vorgewärmtes D10F+ ersetzt.

Eine Subkultivierung der Zellen wurde bei ca. 95 % optischer Konfluenz im Verhältnis 1:3 für humane oder 1:5 für murine glatte GMZ vorgenommen. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 10 ml PBS gespült. Nach Absaugen der PBS wurden die Zellen für 5 min bei 37 °C mit 2 ml Trypsin/EDTA inkubiert und nach Kontrolle im Phasenkontrastmikroskop in 8 ml Medium aufgenommen, um durch das verwendete FCS die Endopeptidaseaktivität des Trypsins zu inhibieren. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 250 rcf zentrifugiert, der Überstand abgenommen und nach Resuspension in D10F+ auf mehrere 57 cm² große Zellkulturschalen verteilt. Die Anzahl der Passagen wurde dokumentiert und die Zellen sind nie länger als bis Passage 15 verwendet worden.

4.5.4. Kryopräservation von Zellen für die Zellkultur

Zum Einfrieren wurden die glatten GMZ analog des Passagierens von den Kulturplatten mit Trypsin/EDTA gelöst, in Medium aufgenommen und bei RT und 250 rcf für 5 min zentrifugiert. Nach dem Einstellen einer Zellzahl von 0,5 x 10⁶ Zellen/ml wurden die GMZ in das Einfriermedium bestehend aus 60 % (v/v) D10F+, 30 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und in 1 ml Kryoröhrchen überführt. Das Einfrieren erfolgte bei -80 °C mit Hilfe eines mit Isopropylalkohol gefüllten Einfrierbehälters (Nalgene Nunc), wodurch eine optimale Abkühlung um 1 °C pro Minute gewährleistet werden konnte. Die Zellen wurden ebenfalls bei -80 °C gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurde die Zellsuspension langsam aufgetaut und in 9 ml D10F+ überführt. Durch Zentrifugation bei 250 rcf und RT für 5 min und Absaugen des Überstandes konnte das zytotoxische DMSO entfernt werden. Die Zellen wurden daraufhin in 10 ml frischem, vorgewärmtem Medium resuspendiert und auf einer 57 cm² großen Zellkulturschale ausgesät. Tote Zellen sowie verbliebenes DMSO wurden durch das Wechseln des Kulturmediums am nächsten Tag entfernt.

4.6. Kokulturen zwischen glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen

Bei der Anlage von Kokulturen musste einerseits die Praktikabilität und andererseits die mögliche Beeinflussung der Qualität späterer mikroskopischer Aufnahmen und der weiteren Prozessierung tausender Bilder abgewogen werden. Um eine möglichst plane Zellkulturoberfläche für optimale Bilderergebnisse zu haben, wurden große Zellkulturformate verwendet. Vorversuche und Experimente zur Färbung und Permeabilisierung von Zellmembranen wurden meist mit 12-Loch-Zellkulturplatten durchgeführt. Für die spätere Datenerhebung kamen ausschließlich 6-Loch-Platten zum Einsatz.

Weinert *et al.* hatten glatte GMZ und MP noch im Verhältnis 1:3 eingesetzt.²⁶ Da die optimale semiautomatische Bildverarbeitung homogene Kokulturen ohne überlappende Zellen erforderte, wurden glatte GMZ und MP für die Normoxie/Hypoxie-Experimente allerdings im Verhältnis 1:1 ausgesät. Insbesondere bei murinen glatten GMZ galt es, eine starke Zunahme des Zellvolumens nach Stoppen der Proliferation mit Mitomycin C (MMC) zu beachten, sodass auf den 6-Loch-Zellkulturplatten 30000 GMZ je Loch eingesetzt wurden.

Das Auszählen und Aussäen der glatten GMZ erfolgte analog der Subkultivierung. Da die stark proliferierenden GMZ in Kokultur die MP innerhalb kürzester Zeit überwachsen würden, wurde der *DNA crosslinker* MMC zum Inhibieren der Zellteilung verwendet. Dazu wurden die glatten GMZ innerhalb eines Tages nach der Aussaat für 1 bis 2 h mit einer MMC-Lösung (2 µg/ml in D10F+) inkubiert, bevor diese erneut abgesaugt und nach dreimaligem Waschen mit warmem PBS durch frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt wurde.

Die mit AcLDL markierten Makrophagen (siehe 4.7) wurden mittels Zellschaber von der *ultra-low-attachment*-Platte gelöst, mit der Pipette samt Medium aufgenommen und durch Zentrifugieren bei 250 rcf und RT für 5 min pelletiert. Nach dem Bestimmen der Zellzahl wurden je 30000 MP pro Loch gleichmäßig auf die vorbereiteten 6-Loch-Platten gegeben. Die Kokulturen wurden nun für 10 d im Brutschrank bei 37 °C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% (v/v) CO₂ kultiviert und das Medium dreimal wöchentlich erneuert. Zum Generieren hypoxischer Bedingungen wurde eine luftdichte und separat begaste Hypoxiekammer aus Acryl genutzt, welche sich im gleichen Inkubator befand. Der Sauerstoffgehalt wurde durch

die Kombination eines Gasmischers und eines Sauerstoffkontrollgerätes reguliert und lag kontinuierlich bei 1,5 bis 2,0 % (v/v) O₂. Kurze Phasen mit höherem Sauerstoffanteil während und nach dem Wechsel des Kulturmediums wurden akzeptiert, da die Beobachtung von Langzeitergebnissen im Vordergrund stand.

4.7. Fluoreszenzmarkierung lebender Zellen

Zur Untersuchung des Transfers von LDL wurde an Lysinresten acetyliertes, kovalent an Alexa Fluor 594 gebundenes LDL (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Acetyliertes LDL wird nicht mehr über den LDL-Rezeptor aufgenommen, sondern nur noch von Zellen, welche *scavenger*-Rezeptoren exprimieren. Dazu gehören Endothelzellen, Mikrogliazellen, Monozyten oder Makrophagen. Nach der Endozytose von AcLDL kumuliert dieses in der Zelle, die daraufhin einen schaumzellartigen Phänotyp annimmt. Ruhende glatte GMZ nehmen kein freies AcLDL auf.¹⁶⁷ Am Tag vor dem Ansetzen der Kokulturen wurden pro Loch 2 ml D10F+ mit 20 µl (20 µg) Alexa Fluor 594-konjugiertem acetylierten LDL versetzt und über Nacht inkubiert. Vor Anlage der Kokulturen wurde das überschüssige, nicht internalisierte AcLDL durch Wechseln des Mediums entfernt und die MP dann, wie unter 4.5.1 beschrieben, pelletiert, ausgezählt und ausgesät.

4.8. Immunzytochemie

4.8.1. Immunzytochemische Färbungen an glatten Gefäßmuskelzellen

Nachfolgend ist exemplarisch die direkte Immunzytochemie zur Charakterisierung isolierter glatter GMZ beschrieben. Die Färbeexperimente unter 4.8.2 zur Optimierung der Permeabilisierung der Zellen unterschieden sich in der Art der verwendeten Chemikalien oder physikalischen Methoden zur Zellmembranpermeabilisierung.

Die vitalen Zellkulturen wurden aus dem Inkubator genommen und nach Absaugen des Mediums einmal mit PBS gewaschen. Anschließend folgte die Fixierung und gleichzeitige Permeabilisierung mit eiskaltem Methanol (MeOH) für 20 min bei -20 °C. Danach wurden die Zellkulturplatten mit PBS gewaschen und für 30 min mit einer zehnpromzentigen FCS/PBS-Lösung geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Es folgte die Inkubation mit einem FITC-gekoppelten AK gegen α -Aktin (anti- α -actin, smooth muscle, FITC, mAb, Klon 1A4, Sigma) für eine Stunde bei RT und ein dreimaliges Waschen mit der Blockierlösung. Zum Anfärben der Zellkerne wurden die Proben für 10-20 min mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (0,1 µg/ml) inkubiert und nochmals mit FCS/PBS gewaschen. Zur Konservierung und Verminderung des Ausbleichens der Fluorochrome wurden die Proben mit ProTaq MountFluor (quartett) und Deckgläschen eingedeckt.

4.8.2. Optimierung der immunzytochemischen Färbeprotokolle

Zur Optimierung der Membranpermeabilisierung und Immunzytochemie wurden diverse Färbeexperimente nach gängigen und davon abgeleiteten Protokollen durchgeführt, welche im Folgenden zusammengefasst sind. Einige exemplarische Aufnahmen und Ergebnisse sind unter 5.1.1 dargestellt.

<p>Fixierung</p> <p>Formaldehydlösung (PFA) 4 % für 10 min PFA 4 % für 20 min PFA 3 % für 10 min PFA 2 % für 10 min PFA 4 % (durch MeOH stabilisiert) für 10 min Methanol pur bei -20 °C für 20 min</p>
<p>Permeabilisierung</p> <p>PFA 2 % + Tween 20 10 % für 20 min PFA 4 % + Triton X-100 für 20 min PFA 4 % für 10 min, anschließend</p> <ol style="list-style-type: none"> kurze Inkubation mit eiskaltem MeOH Citratpuffer bei unterschiedlichen Temperaturen kurzes Einfrieren bei -20 °C kochendes PBS kochendes Wasser Aqua destillata kurze Inkubation im Ultraschallbad physikalische Permeabilisierung mit ferromagnetischem Strontiumferrit (Maniperm Pulver, Partikelgröße <10 µm, Tridelta) und NeoDeltaMagnet (NdFeB, FD08N, IBSMagnet) mit einer Haftkraft von 350 N
<p>Färbung</p> <p>Antikörper (anti-α-actin, smooth muscle FITC, mAb, Klon 1A4; 2,4 mg/ml) in Verdünnungsreihen 1:1000 bis 1:100 (2,4–24 µg/ml)</p> <ol style="list-style-type: none"> 60 min Inkubationsdauer bei RT Inkubation über Nacht und bei 4 °C in einer feuchten Kammer

Tabelle 4: Synopse verschiedener Vorexperimente zur Optimierung der immunzytochemischen Färbung (alle Lösungen in PBS)

4.9. Mikroskopie

Sämtliche mikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Zeiss Axiovert 200m (10x Objektiv) in Kombination mit der AxioCam MRm im eigenen Labor durchgeführt und unmittelbar nach dem Fixieren und Färben der Proben begonnen. Mikroskop- und Kamerasteuerung sowie die Tischkontrolle erfolgten durch *AxioVision 4.8*.

Für jedes Loch der 6-Loch-Zellkulturplatte wurde ein Raster von 15 x 15 Bildern vordefiniert, sodass pro Platte insgesamt 1350 Positionen mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen wurden. Nach der *shading*-Korrektur, dem Einstellen der Belichtungszeiten für die einzelnen Kanäle sowie dem Kalibrieren der Autofokusfunktion wurden einige Testbilder aufgenommen und dann die automatische Bildaufnahme mit Autofokus an jeder der 1350 Positionen gestartet. *Binning*- oder *gain*-Funktionen wurden nicht verwendet, um eine möglichst hohe Auflösung bei geringem Rauschen zu erhalten. Bei drei Fluoreszenzkanälen (rot, grün, blau) sowie dem Phasenkontrast kamen pro Zellkulturplatte und dazugehöriger Normoxiekontrolle 10.800 Einzelaufnahmen zustande. Nachdem die Aufnahmen an einer Probe abgeschlossen waren, wurde die nächste 6-Loch-Platte mikroskopiert. Innerhalb des Experiments wurden die Einstellungen nicht geändert. Nach der Färbung sowie zwischen und nach den Aufnahmen wurden sämtliche Proben lichtgeschützt bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Einzelne fehlerhafte Bilder fielen nicht ins Gewicht, da für die statistische Auswertung die Anzahl und das Verhältnis der ausgezählten Zellen je Bedingung entscheidend waren.

4.10. Speicherung, Format und Export der Bilder

Alle mikroskopischen Bilder wurden zunächst mit 12-Bit-Graustufen und einer Auflösung von 1388 x 1040 Pixeln im *Zeiss Vision Image* (ZVI)-Format gespeichert, wodurch die einzelnen Farbkanäle in maximaler Dynamik und sämtliche Metadaten, wie Belichtungszeiten, x-y-z Position des Tisches, Mikroskopeinstellungen oder Datum der Aufnahme erhalten blieben (11,1 MB je Position). Zur Analyse der Bilder mittels *CellProfiler* (CP) wurden die Einzelkanäle unter Beibehaltung der Auflösung in 8-Bit-Bilder konvertiert und im *Tagged Image File Format* (TIFF) exportiert (1,37 MB je Kanalbild bzw. 5,51 MB je Position).

4.11. Hardware

Die gesamte Bildverarbeitung mit dem *CellProfiler* wurde auf einem Standardlaborrechner mit folgenden Spezifikationen durchgeführt.

Betriebssystem	Windows 7 Professional, 64 Bit, Service Pack 1
Prozessor	Intel Core 2 Quad Processor Q9400 (6MB Cache, 2.66 GHz, 1333 MHz FSB)
Arbeitsspeicher	4 GB
Grafikkarte	NVIDIA GeForce 210 (512MB DDR2 dedizierter Speicher)

Zum Speichern der Rohdaten, Exporte und Auswertungen wurden ein externes RAID 1 System, bestehend aus einer Sharkoon 2-Bay Raid Box, und zwei Western Digital CAVIAR Black 2 TB Festplatten verwendet, welches über USB 2.0 mit dem Rechner verbunden war.

4.12. Bildverarbeitung

Neben dem *CellProfiler* wurden weitere Bildverarbeitungsprogramme zum Auswerten und Darstellen mikroskopischer Bildern genutzt. Der Export der ZVI-Aufnahmen und das Anfertigen von Mehrkanalbildern erfolgten mit Axiovision 4.8. Die Falschfarbendarstellung der Färbeexperimente (Abbildung 3) sowie die Messung der Kerngrößen wurden mit *ImageJ*¹⁶⁸ (EMBL Distribution) erstellt. Abbildungen von mikroskopischen Bildern wurden schließlich mit Photoshop CS6 (64 Bit) zusammengestellt. Alle gezeigten originalen Fluoreszenzkanalaufnahmen wurden lediglich exportiert, ohne das entsprechende Histogramm zu modifizieren. Zur Veranschaulichung bzw. Angleichung von Intensitäten, welche aufgrund unterschiedlicher Belichtungszeiten entstanden, wurden einige Phasenkontrastaufnahmen auch nichtlinear in Helligkeit und Kontrast verändert. Die Falschfarbendarstellung in Abbildung 3 wurde linear angepasst. Sämtliche kritischen Schwellenwertverfahren und Messungen wurden an unmanipulierten Graustufenbildern im TIF-Format vorgenommen.

4.13. Bestimmen der Kerngrößen mit *ImageJ*

Zur Quantifizierung der phänotypischen Unterschiede zwischen Zellkernen von MP und glatten GMZ wurden je Zelltyp 200 Testbilder mit Hilfe von *ImageJ*¹⁶⁸ ausgewertet. Nach dem Erstellen eines Bildstapels wurden alle 8-Bit-Aufnahmen binärisiert und der Schwellenwert analog zu den Kontrolleexperimenten bei 41 von 256 gesetzt, was einem relativen

Schwellenwert von 0,16 entspricht. Etwaige Löcher in den verbliebenen Objekten (Zellkernen) wurden gefüllt und diese daraufhin mittels *Analyze-Particle*-Modul ausgezählt und in ihrer Fläche (in μm^2) vermessen. Objekte, die den Rand des Bildes berührten, kleiner als $90 \mu\text{m}^2$ oder größer als $3000 \mu\text{m}^2$ waren, wurden nicht berücksichtigt. Anschließend erfolgte die Darstellung der Flächenverteilung im Histogramm durch Einteilung in 100 Klassen mit einem Umfang von je $30 \mu\text{m}^2$. Der Anschaulichkeit halber sind die Ergebnisse in Abbildung 6 als Histogramm mit Objekten bis $2000 \mu\text{m}^2$ dargestellt.

4.14. Automatisierte Bildsegmentierung und Analyse mit dem *CellProfiler*

4.14.1. *CellProfiler*

CellProfiler ist ein kostenloses *open-source*-Programm, welches Wissenschaftlern ohne ausführliche Kenntnisse im Programmieren oder in der Bildverarbeitung ermöglicht, eine Vielzahl von Bildern in großem Maßstab automatisch auszuwerten und Messungen vorzunehmen. Es ist für alle gängigen Betriebssysteme, wie Microsoft Windows, MacOS, MacOS X und Linux verfügbar. Die Betreuung und Weiterentwicklung erfolgt durch das Labor von Anne Carpenter am *Broad Institute* in Cambridge, Massachusetts, USA.^{169,170}

Das Prinzip von *CellProfiler* beruht auf einem modularen Aufbau mit einer Vielzahl von simplen wie auch komplexen Algorithmen, welche auf einfache Weise modifiziert und in beliebiger Reihenfolge in Form sogenannter *pipelines* hintereinandergeschaltet werden können. Die Module sind der einfacheren Handhabung halber in Kategorien, unter anderem zur Verarbeitung von Dateien und Rohdaten, Bildern, Objekten innerhalb der Bilder, Messungen, Datenverarbeitung und Statistik, eingeteilt. Jedes Modul und die verschiedenen einzustellenden Parameter innerhalb der Module sind beschrieben und es werden Hilfestellungen zu Anwendbarkeit und geeignete Optionen gegeben, sodass sich auch ungeübte Anwender schnell zurechtfinden.

Die Art der Aufnahmen und der biologischen Proben spielt dabei prinzipiell keine Rolle. So können unter anderem Bilder aus der Fluoreszenz-, Phasenkontrast- oder Durchlichtmikroskopie verarbeitet werden. CP eignet sich zum Beispiel zur Auswertung von histologischen Schnitten und Zellkulturen humaner, muriner oder anderer tierischer Zellen, von Pflanzenbestandteilen, Untersuchungen an Würmern (*Caenorhabditis elegans*), Bakterien, einzelnen Zellen, Kolonien oder Kokulturen. Am 01.06.2017 ließen sich über Google Scholar (<https://scholar.google.de/>) mehr als 4800 Publikationen abrufen, welche sich auf die Verwendung des CP beziehen.

Durch die freie Verfügbarkeit des Quellcodes steht es allen Nutzern frei, eigene Module zu entwickeln und diese ihrerseits anderen Wissenschaftlern zur Verfügung zu stellen.

4.14.2. Herausforderungen und Probleme bei der Bildverarbeitung

Nachfolgend sind Herausforderungen und Probleme aufgezeigt, die bei der Bildverarbeitung auftraten und beachtet bzw. korrigiert werden mussten.

<p>Zellen</p> <ul style="list-style-type: none"> Verwendung von Kokulturen mit unterschiedlichen Zelltypen Inhomogene Zellkerne, die sich in Form, Größe und Granulierung unterscheiden Inhomogene glatte GMZ mit unterschiedlicher Form und Größe Inhomogenes GFP-Signal in den glatten GMZ der GFP-Maus Einige glatte GMZ mit 2 Zellkernen Relativ dünne Aussaat von Zellen im Verhältnis 1:1 Ungleichmäßige Aussaat der Zellen, Regionen mit hoher Zelldichte Aggregation von Makrophagen Seltene <i>events</i> (AcLDL positive glatte GMZ) in Relation zur Gesamtanzahl der GMZ
<p>Bilder</p> <ul style="list-style-type: none"> Unschärfe Bilder aufgrund von Autofokusfehlern Autofluoreszenz und unspezifische Fluoreszenz in Abhängigkeit von Zelltyp und Kulturdauer Unterschiedlich starkes AcLDL-Signal sowohl in MP als auch in glatten GMZ Lange Dauer der Einzelerperimente über Monate mit einer Aufnahmedauer von mehreren Tagen je Versuchsreihe und damit variierender Bildqualität Artefakte (z. B. Lufteinschlüsse im Eindeckmedium, Staub)
<p>Bildsegmentierung</p> <ul style="list-style-type: none"> Fehlerhafte Objektrennung Bildausschnitte mit angeschnittenen Zellen und Zellkernen Sichere Detektion von <i>events</i> erhöht Risiko falsch positiver Ergebnisse Vereinzelte Überlappung der phänotypischen Merkmale von MP- und GMZ-Kernen
<p>Hardware</p> <ul style="list-style-type: none"> Enorme Rechenkapazität bzw. Rechendauer notwendig Hohe Anzahl an Bildern Zusätzliche Speicherkapazitäten benötigt
<p>Manuelle Modifikationen</p> <ul style="list-style-type: none"> Manuelles Setzen der Schwellenwerte Manuelle Nachkontrolle

Tabelle 5: Herausforderungen und Probleme bei der automatischen Bildverarbeitung

4.14.3. Pipeline

Ziel der entwickelten *pipeline* war die Detektion des AcLDL in glatten GMZ und die Bestimmung der Anzahl der AcLDL-positiven GMZ an der Gesamtheit aller GMZ. Wie Weinert *et al.* zeigen konnten, kommt es bei der Kokultur von AcLDL-positiven Makrophagen mit glatten GMZ zur Übertragung des AcLDL in die glatte GMZ. Da dies gerade zu Beginn der Kokultur ein seltenes Ereignis (*event*) darstellt, war es notwendig, besonders viele Zellen zu untersuchen. Dies ist insbesondere aufgrund des zeitlichen Aufwandes nur begrenzt manuell möglich.

Sämtliche Datensätze wurden mit dem *CellProfiler* 2.0.0. (rev dde5672) analysiert. Die folgende *pipeline* zur Auswertung der Hypoxie-Experimente wurde anhand diverser Vorexperimente und einer Vielzahl von Testläufen und Qualitätskontrollen mit manueller Nachkontrolle entwickelt. Alle Experimente wurden mit den gleichen Modulen und Einstellungen ausgewertet. Lediglich die Schwellenwerte für die Binärisierung bzw. Segmentierung der Zellkerne (blauer Kanal, DAPI) und des AcLDL (roter Kanal, Alexa Fluor 594) wurden anhand von Probed Bildern manuell eingestellt. Innerhalb eines Experiments kamen die gleichen Schwellenwerte zum Einsatz. Die Gliederung der folgenden Module spiegelt den tatsächlichen Arbeitsablauf wider. Nachfolgend sind wesentliche Prinzipien und Einstellungen aufgeführt. Die genaue *pipeline* sowie Beispielbilder sind über das Zusatzmaterial der aus den hier dargelegten Ergebnissen entstandenen Publikation abrufbar (<http://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2472555217691451>).

Für die Kontrollexperimente zur Segmentierung von Zellkernen wurden aufgrund leicht unterschiedlicher Bildeigenschaften und Intensitäten die Parameter der Module 3. *FlagImage*, 4. *IdentifyPrimaryObjects*, 9. *FilterObjects* sowie 11. *FilterObjects* angepasst um gleichwertige Ergebnisse der Algorithmen zu gewährleisten. Die entsprechend veränderten Werte sind im Folgenden in eckigen Klammern angegeben.

1. *LoadImages*

Sämtliche zu analysierende Bilder (exportierte TIFF-Dateien) einer Probe wurden geladen und nach ihrem jeweiligen Farbkanal benannt (*OrigBlue – DAPI*, *OrigGreen – GFP*, *OrigRed – Alexa Fluor 594*).

2. *MeasureImageQuality*

Dieser Schritt diente dazu, aufgrund von Autofokusfehlern unscharfe bzw. verschwommene Bilder zu erkennen und von der weiteren Analyse auszuschließen. Anhand einer gewählten Auflösung von 30 x 30 Pixeln wurde ein Punktwert (*Local Focus Score*) für alle *OrigBlue*-Bilder vergeben, indem benachbarte Pixel miteinander korreliert wurden.

3. *FlagImage*

Ausgehend vom vorherigen Modul wurden nun alle *OrigBlue*-Bilder mit einem *Local Focus Score* unter 0,07 [0,05] markiert und die entsprechenden Mehrkanalaufnahmen für die folgende Prozessierung nicht weiter berücksichtigt.

4. *IdentifyPrimaryObjects*

Durch Binärisierung anhand eines globalen *thresholding* der *OrigBlue*-Bilder wurden alle Zellkerne (*AllNuclei*) erkannt. Objekte mit einem Durchmesser von weniger als 10 oder mehr als 140 Pixeln wurden herausgefiltert. Bei Objekten unterhalb des Schwellenwerts ist vor der Filterung versucht worden, sie mit benachbarten Objekten zu verbinden. Löcher, die bei einem einfachen *thresholding* in erkannten Objekten entstehen können, wurden gefüllt. Der Schwellenwert für die Binärisierung wurde anhand von Testbildern für jedes Experiment manuell eingestellt und lag (relativ gewichtet) zwischen 0,08 und 0,12 [0,16].

Für ein 8-Bit-Bild mit 256 Graustufen bedeutete ein relativer Schwellenwert von 0,12 eine absolute Grenze von 30,72 ($256 \times 0,12 = 30,72$). Demzufolge wurden sämtliche Pixel mit einem Grauwert bis einschließlich 30 dem Hintergrund zugeordnet. Pixel mit einem Wert ab 31 gehörten zum Vordergrund und sind den gesuchten Objekten zugerechnet worden.

5. *MeasureObjectSizeShape*

Größen- und Formmerkmale aller Zellkerne wurden zur weiteren Bearbeitung gemessen, da anhand der Größe eine sehr gute Unterscheidung zwischen den Zellkernen der kleineren MP und der größeren GMZ möglich ist.

6. *FilterObjects*

Alle Zellkerne mit einer Fläche von mindestens 750 Pixeln wurden als Kerne von glatten GMZ definiert und *VSMCNucleiUnfiltered* benannt.

7. *FilterObjects*

Alle Zellkerne mit einer Fläche von weniger als 750 Pixeln wurden als Kerne von MP angesehen und *MacNucleiUnfiltered* benannt.

8. *MeasureObjectIntensity*

Intensitätsmerkmale der *VSMCNucleiUnfiltered* wurden gemessen. Für die weitere Verarbeitung ist die *MeanIntensity*, die durchschnittliche Intensität aller Pixel innerhalb eines Objektes, entscheidend.

9. *FilterObjects*

VSMCNucleiUnfiltered mit einer mittleren relativen Intensität oberhalb von 0,6 [0,9] wurden herausgefiltert. Dieser Schritt erfolgte zum Ausschluss von Artefakten, welche die Größe und Form großer muriner GMZ haben können, aber in der Regel ein deutlich helleres Fluoreszenzsignal liefern. Die verbleibenden Objekte wurden nun *VSMCNuclei* benannt.

10. *MeasureObjectIntensity*

Analog zu 8. wurden Intensitätsmerkmale der *MacNucleiUnfiltered* gemessen.

11. *FilterObjects*

Gelegentlich kam es vor, dass Zellkerne der GMZ nicht korrekt segmentiert wurden, weil die Färbung zu schwach oder die Zelle zum Zeitpunkt der Fixation am Absterben war, wodurch Teile des Nukleus als Makrophagenkern erkannt wurden. Dies hätte ohne weitere Maßnahme darin resultiert, dass eine GMZ als GMZ mit MP oder aber mehrere MP erkannt und im weiteren Verlauf als solche behandelt worden wäre. Phänotypisch sind MP-Zellkerne jedoch in der Regel deutlich heller als die der GMZ und so wurden alle dunklen kleinen Objekte, d. h. *MacNucleiUnfiltered* mit einer mittleren relativen Intensität unterhalb von 0,18 [0,3] entfernt. Die verbleibenden Objekte wurden als *MacNuclei* benannt.

12. *ExpandOrShrinkObjects*

Da die Erkennung der Zellen lediglich über die Zellkerne erfolgte, existierte bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Information über die tatsächliche Ausdehnung der GMZ. Um einen Teil des Zytoplasmas bzw. den perinukleären Bereich zu simulieren, in welchem sich in der Regel das AcLDL detektieren lässt, wurden alle *VSMCNuclei* künstlich vergrößert. Einzelne Pixel wurden dabei 70-mal zum Rand des Objektes addiert. Die vergrößerten Kerne hießen *Expanded VSMC*, die dazugehörigen Umrisse *Propagated VSMCOutlines*.

13. *IdentifyPrimaryObjects*

Durch Binärisierung anhand eines globalen *thresholding* der *OrigRed*-Bilder wurden alle AcLDL-Partikel (*LDL*) detektiert. Objekte mit einem Durchmesser von weniger als 5 oder mehr als 50 Pixeln wurden herausgefiltert. Bei Objekten unterhalb des Schwellenwerts von 5 Pixeln ist auch an dieser Stelle vor der Filterung versucht worden, sie mit benachbarten Objekte zu verbinden. Weil viele kleine helle Objekte beim simplen Setzen niedriger Schwellenwerte als ein einziges, großes Objekt erkannt und bei einem Durchmesser von mehr als 50 Pixeln entfernt worden wären, wurden diese Objekte anhand der Intensität getrennt. Zunächst wurde ein blur-Filter mit einer Größe von 5 Pixeln angewandt, um eine gewisse Gleichmäßigkeit (*smoothness*) zu erreichen. Anschließend wurden lokale

Intensitätsmaxima als Objektmitten ermittelt und entsprechend getrennt. Maxima, welche näher als 5 Pixel beieinanderlagen, wurden unterdrückt. Der Vorteil dieser intensitätsbasierten Methode liegt dabei in der relativen Unabhängigkeit von Form und Größe der zu trennenden Objekte. Erneut wurden Löcher, die beim *thresholding* in den erkannten Objekten entstehen können, gefüllt. Der Schwellenwert für die Binärisierung wurde anhand von Testbildern für jedes Experiment manuell eingestellt und lag relativ gewichtet zwischen 0,11 und 0,15. Die Umrisse (*LDL Outlines*) wurden für die spätere Verarbeitung gespeichert.

14. *ExpandOrShrinkObjects*

Analog zu 12. wurden die *MacNuclei* um 25 Pixelreihen vergrößert. Die vergrößerten Kerne hießen *Expanded MacNuclei*, die dazugehörigen Umrisse *Expanded MacNucleiOutlines*.

15. *RelateObjects*

Alle LDL-Partikel, die sich mit den vergrößerten MP-Zellkernen überlagerten, wurden markiert.

16. *FilterObjects*

Mitunter fanden sich MP, welche den glatten GMZ auflagen und so zu falsch-positiven Ergebnissen führen konnten, falls das Kriterium für ein *event* lediglich *LDL* innerhalb einer GMZ (*Expanded VSMC*) lautete. Die unter 15. markierten Objekte wurden daher entfernt und die verbliebenen Objekte *LDL prefilteredObjects* benannt.

17. *ExpandOrShrinkObjects*

Die *VSMCNuclei* wurden um 2 Pixelreihen geschrumpft und hießen *Shrunken VSMCNuclei*.

18. *RelateObjects*

Alle *LDL prefilteredObjects*, welche sich mit den geschrumpften GMZ-Zellkernen überlagerten, wurden markiert

19. *FilterObjects*

Die unter 18. markierten Objekte wurden entfernt und die verbliebenen Objekte *LDL filtered* benannt.

20. *Relate Objects*

Alle gefilterten LDL-Partikel, welche sich mit *Expanded VSMC* überlagerten, sich also innerhalb einer glatten GMZ befanden, wurden markiert.

21. *FilterObjects*

Alle glatten GMZ, welche mindestens 6 LDL-Partikel enthielten, wurden markiert (*LDL positive VSMC*).

22. *FlagImage*

Alle Bilder, welche keine LDL-positiven glatten GMZ enthielten, wurden übersprungen und nicht weiter bearbeitet.

23. *MeasureObjectSizeShape*

Größen- und Formmerkmale aller *VSMCNuclei* und *MacNuclei* wurden gemessen, um deren Gesamtanzahl zu erhalten.

24. *ExportToSpreadsheet*

Die Anzahl aller *VSMCNuclei*, *MacNuclei* und *LDL positive VSMC* wurde in Form von Microsoft-Excel-Tabellen exportiert.

25. *ApplyThreshold*

Alle Pixel mit einem relativen Wert unterhalb von 0,1 wurden aus dem *OrigRed*-Bild entfernt und ein neues Graustufenbild (*ThreshRed*) generiert. Dieser Schritt diente der Entfernung des Hintergrundsignals im roten Kanal, da dieser im nächsten Schritt stärker gewichtet wurde.

26. *GrayToColor*

Die drei einzelnen Graustufenbilder (*ThreshRed*, *OrigGreen*, *OrigBlue*) wurden zusammengefügt und ein neues Farbbild (*RGB image*) generiert. Dabei gingen die Kanäle mit einer unterschiedlichen Wichtung ein (Rot 5x, Grün 1x, Blau 2x).

27. *OverlayOutlines*

Die Umrisse der LDL-positiven glatten GMZ, vergrößerten Makrophagenzellkerne, GMZ-Nuklei und LDL-Partikel wurden auf das Farbbild projiziert (*RGB Overlay*).

28. *SaveImages*

Das Farbbild mit den Umrissen der einzelnen Objekte wurde im TIF-Format gespeichert. Die Schritte 25 bis 28 wurden durchgeführt, um ein Bild im Rot-Grün-Blau-Farbraum (RGB) zu generieren, welches zwar von den Originalaufnahmen abwich, durch das Hervorheben bestimmter Merkmale jedoch eine schnelle manuelle Nachkontrolle zuließ.

29. SendEmail

Die Bildverarbeitung durch den CP erfolgte satzweise, d.h. einzelne Positionen mit den entsprechenden Farbkanälen wurden nacheinander anhand der *pipeline* abgearbeitet. Für 1350 Positionen bedeutete dies 1350 Zyklen. Optional wurde nach dem letzten Zyklus eine E-Mail versandt, um darüber zu informieren, dass alle Bilder verarbeitet wurden.

30. PauseCellProfiler

Optional wurden alle Berechnungen nach einem Bild pausiert. Dies war hilfreich für Probeläufe und war während der Auswertung kompletter Bildersets deaktiviert.

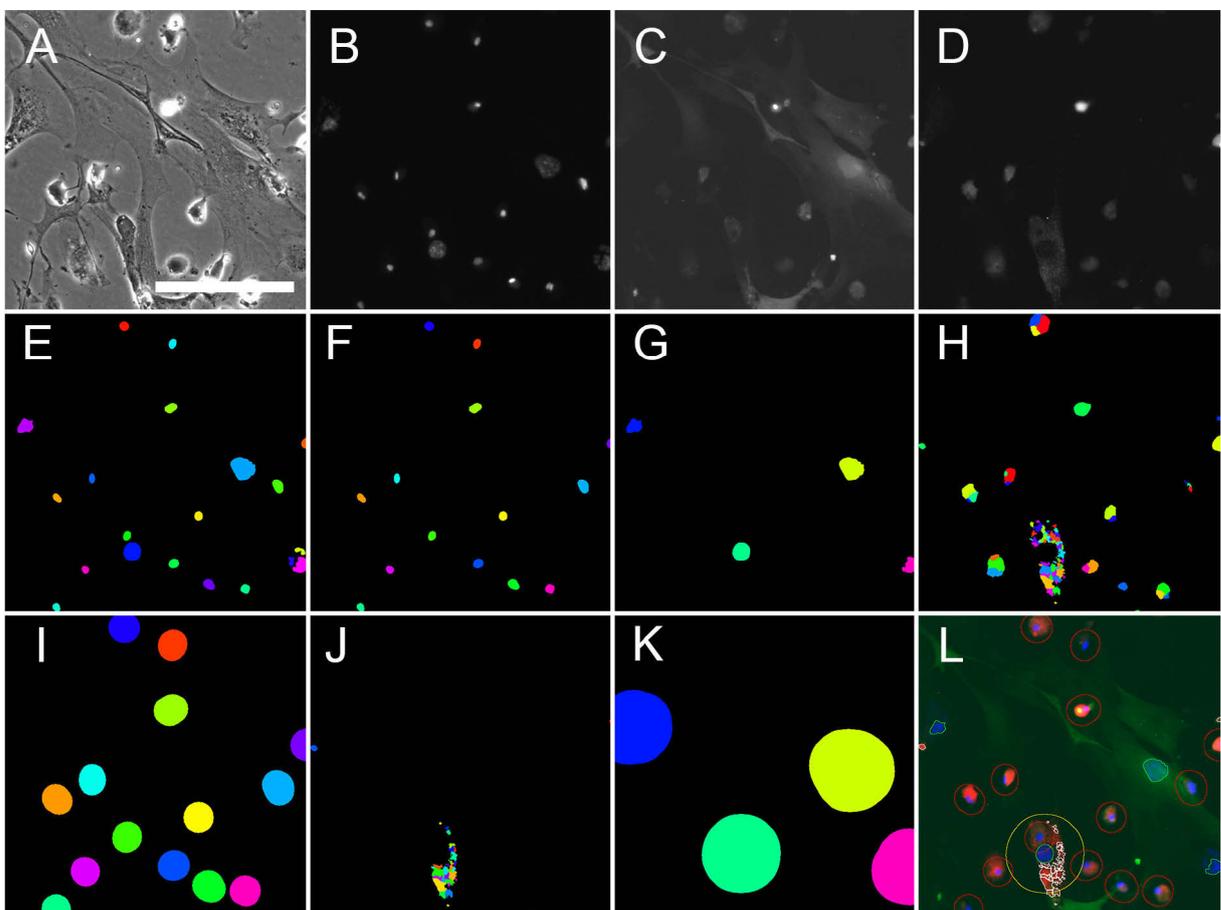


Abbildung 2: 450x450 µm großer, repräsentativer Bildausschnitt zur Veranschaulichung des CellProfiler-Arbeitsablaufes

(A) Phasenkontrast. (B) DAPI. (C) GFP. (D) Alexa Fluor 594. (E) *AllNuclei*. Alle Zellkerne werden erkannt. (F) *MacNuclei*. Makrophagenzellkerne nach Größenfilterung. (G) *VSMCNuclei*. Glatte Gefäßmuskelzellkerne nach Größenfilterung. (H) *LDL*. AcLDL ohne Filterung. (I) *Expanded MacNuclei*. Vergrößerte Makrophagenzellkerne. (J) *LDL filtered*. AcLDL, welches sich nicht in Makrophagen befindet. (K) *Expanded VSMC*. Durch Zellkernvergrößerung simulierte Gefäßmuskelzellen. (L) *RGB Overlay*. RGB-Farbbild zur manuellen Nachkontrolle aus allen drei Fluoreszenzkanälen mit den Umrissen der Gefäßmuskelzellkerne (grün), vergrößerten Makrophagen (rot), relevantem LDL (weiß) und LDL positiven glatten Gefäßmuskelzellkernen (gelb). Maßstabsbalken: 200 µm.

4.15. Statistische Auswertung und Darstellung der Daten

Sowohl die statistische Auswertung als auch die grafische Darstellung der Daten erfolgten mittels *Prism 5 (GraphPad Software)*. Die Normoxie/Hypoxie-Experimente wurden mit dem zweiseitigen gepaarten t-Test ausgewertet. Ein Unterschied zwischen den Gruppen wurde für $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

5. Ergebnisse

5.1. Immunzytochemie, Fluoreszenzmikroskopie und Kernmorphologie

5.1.1. Zellmembranpermeabilisierung und Immunzytochemie

Für die Darstellung zytoplasmatischer Proteine durch immunzytochemische Färbungen ist die vorherige Permeabilisierung der Zellmembran unabdingbar, damit der AK intrazellulär an die gewünschte Zielstruktur binden kann. Sämtliche gebräuchlichen Substanzen sind entweder organische Lösungsmittel wie Methanol und Aceton oder Detergenzien wie Triton X-100, Tween 20 oder Saponine. Organische Lösungsmittel koagulieren Proteine und können somit auch zum Fixieren von Proben eingesetzt werden. Beiden Gruppen gemein ist der lipophile Charakter und die Eigenschaft, Cholesterin aus der Zellmembran herauszulösen.¹⁷¹ Da für die Fragestellung nicht nur die glatten GMZ als solche identifiziert, sondern auch das intrazelluläre AcLDL detektiert werden sollte, stellte dies ein relevantes Problem dar. Einfache Fixierungen mit frisch angesetztem PFA (4%) in PBS führten zwar zu guter Präservierung des AcLDL, doch ließen sich die GMZ nach Immunzytochemie nur sehr heterogen bis gar nicht anfärben. Zur Optimierung der Membranpermeabilisierung wurden verschiedene Färbeexperimente nach gängigen und eigens modifizierten Protokollen durchgeführt, die unter 4.8.2 zusammengefasst sind.

Abbildung 3 zeigt das Ergebnis der Membranpermeabilisierung nach PFA-Fixierung mit oder ohne MeOH. Zwar wird durch zusätzliche Inkubation mit MeOH eine gute Permeabilisierung erreicht, allerdings weisen die Zellen trotz hoher Konzentration des eingesetzten AK starke Variationen in der Intensität des Aktinsignals auf (B). Dies kann auf Unterschieden in der Expression von Aktin in den verwendeten humanen glatten GMZ zurückzuführen sein. Durch die PFA-Fixierung allein werden hingegen nur einzelne Zellen permeabilisiert (C), wobei das spezifische AK-Signal deutlich schwächer ausfällt. Zudem findet sich unabhängig vom gewählten Protokoll zur Permeabilisierung eine starke Autofluoreszenz, wie insbesondere anhand der Negativkontrolle deutlich wird (A). Im Gegensatz zum linearen Muster der spezifischen Färbung des Aktinzytoskeletts weist die Autofluoreszenz ein homogenes, vorwiegend zytoplasmatisches Färbemuster auf und ist zusätzlich als unspezifisches Signal im DAPI-Kanal zu erkennen.

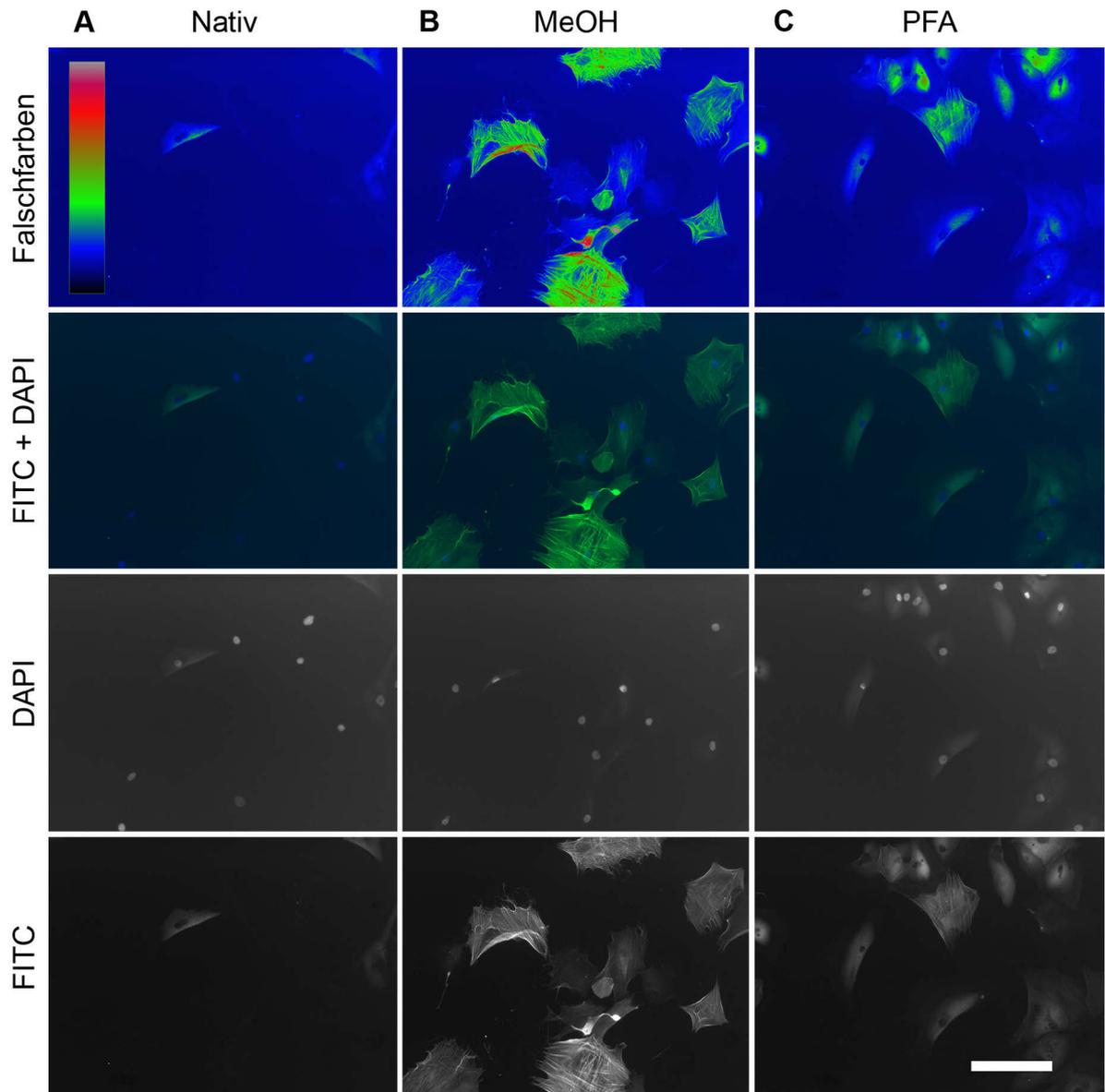


Abbildung 3: Vorexperimente zur Immunzytochemie an humanen glatten Gefäßmuskelzellen

(A) Für die Negativkontrolle wurden die Proben fixiert und lediglich mit DAPI (blau), jedoch ohne Zugabe des primären Antikörpers gefärbt. (B) Nach dem Fixieren der Proben mit PFA (3 %) für 10 min wurden die Zellen für 5 min mit Methanol permeabilisiert, anschließend die Proben für 30 min geblockt und über Nacht mit FITC-markiertem (grün) smooth muscle anti- α -actin AK (2,4 mg/ml) inkubiert. (C) Identische Behandlung wie (B), eine Permeabilisierung mit Methanol fand jedoch nicht statt. Die Aufnahmen erfolgten mit gleichen Einstellungen und Belichtungszeiten (Blau: 240,8 ms; Grün: 897,9 ms). Neben den Einzelkanälen (DAPI und FITC) sowie der überlagerten Darstellung beider Kanäle ist der Anschaulichkeit halber die Intensität der α -Aktin-Färbung mittels Falschfarben (*Color Look Up Table*) dargestellt. Deutlich zu erkennen ist dabei die gute, aber dennoch heterogene Färbung nach zusätzlicher MeOH-Permeabilisierung. Die Anfärbbarkeit bei alleiniger PFA-Fixierung ist hingegen unzureichend. Problematisch stellt sich die Autofluoreszenz der humanen glatten GMZ in allen Proben dar. Maßstabsbalken: 200 μ m.

Abbildung 4 zeigt die Auswirkung der genutzten Chemikalien auf das intrazelluläre AcLDL. Methanol, welches die besten Ergebnisse hinsichtlich der Membranpermeabilisierung lieferte, stellte sich als ungeeignet für die weiteren Untersuchungen heraus, da es neben Lipiden der Zellmembran auch das intrazellulär gespeicherte AcLDL herauslöste.

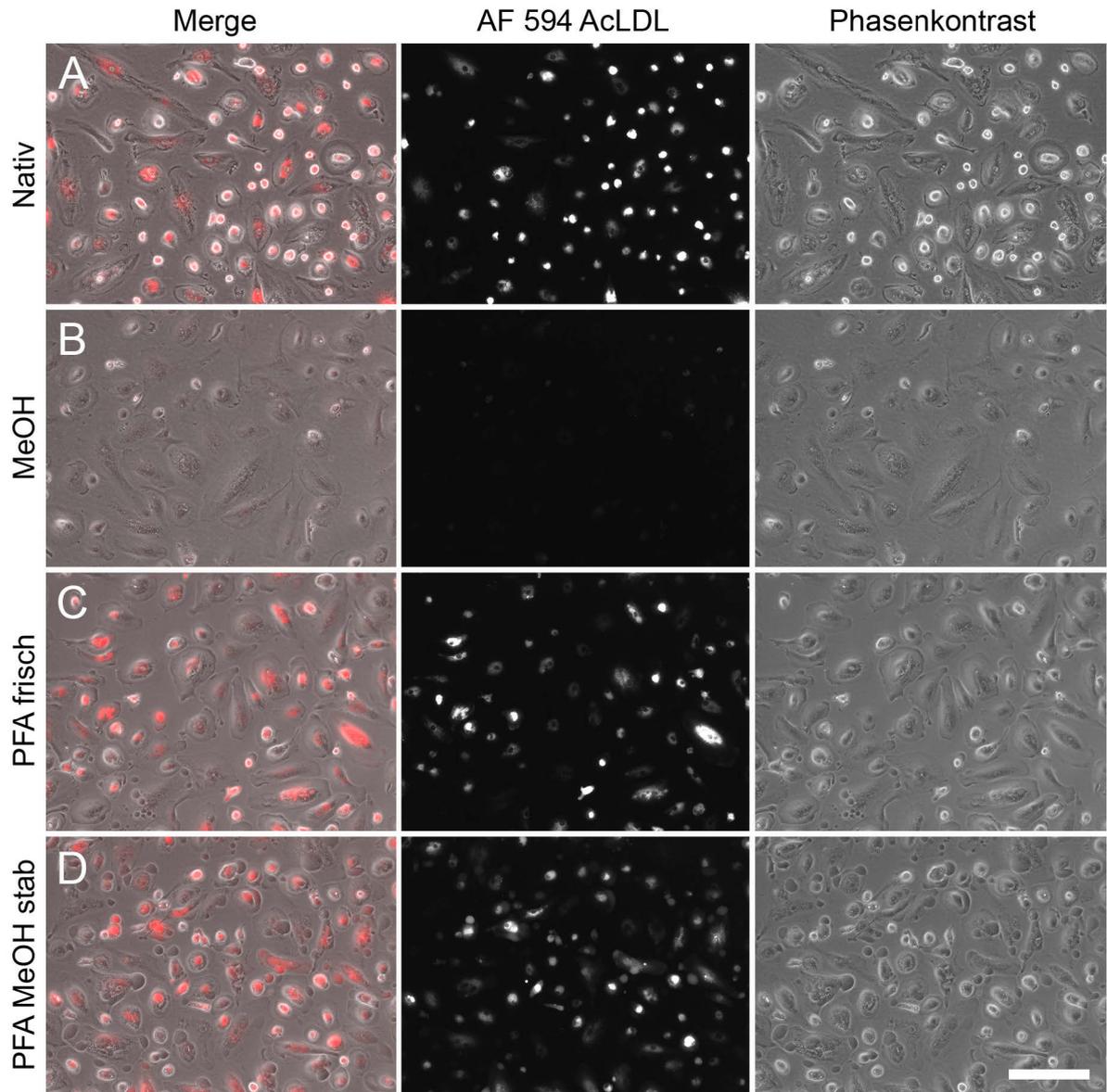


Abbildung 4: Verschiedene Fixierungen zur Kontrolle der AcLDL-Konservierung in MP

(A) Unfixierte native Zellen in PBS. (B) Zellen nach Fixierung mit Methanol (pur). (C) Fixierung mit frisch angesetztem PFA (4%). (D) Fixierung mit methanol-stabilisierter Formaldehydlösung (4%). Die Aufnahmen erfolgten mit gleichen Einstellungen und Belichtungszeiten (Rot: 299,7 ms; Phasenkontrast: 14,3 - 19,5 ms). Sowohl frisch angesetzte als auch gebrauchsfertige Formaldehydlösungen bewirken kein bzw. ein zu vernachlässigendes Auswaschen von AcLDL. Im Gegensatz dazu ist das fluoreszenzmarkierte AcLDL nach Fixierung mit Methanol fast nicht mehr zu detektieren. Maßstabsbalken: 200 μ m.

Die übrigen Ergebnisse der unter 4.8.2 aufgeführten Untersuchungen sind hier nicht gezeigt, da sie entweder in einer unzureichenden Membranpermeabilisierung, Auslöschung des LDL-Signals oder kompletten Zerstörung der Proben resultierten. Eine immunzytochemische Färbung intrazellulärer Antigene, wie dem α -Aktin, ist ohne Zellpermeabilisierung nicht möglich. Nach aktuellem Kenntnisstand gibt es keine Methode, um die Membran suffizient zu permeabilisieren und gleichzeitig das intrazelluläre AcLDL-Signal zu erhalten.

Aus diesem Grund wurden die weiteren Experimente unter Verwendung von glatten GMZ einer GFP-Maus durchgeführt. Auf eine Immunzytochemie wurde verzichtet und die Proben sind lediglich, wie zuvor beschrieben, für 10 min mit Formaldehydlösung (4%) fixiert und mit DAPI gefärbt worden. Zwar zeigte sich auch hier ein inhomogenes GFP-Expressionsmuster, doch konnten die glatten GMZ im Vergleich zu humanen Makrophagen zweifelsfrei anhand der phänotypisch stark unterschiedlichen Zellkerne identifiziert werden.

5.1.2. Autofluoreszenz humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Die ersten Vorexperimente wurden mit humanen glatten GMZ durchgeführt. Diese mussten im weiteren Verlauf durch murine GMZ ersetzt werden. Verantwortlich dafür war neben Schwierigkeiten bei der Membranpermeabilisierung bzw. Immunzytochemie (siehe 5.1.1) und bei der automatischen Differenzierung zwischen humanen GMZ und MP vor allem ein erhöhtes Auftreten von Autofluoreszenz.

Abbildung 5 zeigt humane glatte GMZ, welche nach MMC-Behandlung 8 Monate in Kultur gehalten und anschließend ohne Färbung oder Fixierung untersucht wurden. Betrachtet man die Farbkanäle einzeln, so könnte man von einem membran- oder zytoplasmaspezifischen Fluoreszenzsignal ausgehen. Auffällig ist jedoch, dass sich ein homogenes Muster findet, welches man zumindest mit Blick auf spezifisch lokalisierte Zielproteine (z. B. Aktinskelett) nicht erwarten würde. Weiterhin ist die Tatsache, dass man in sämtlichen Kanälen ein mehr oder minder stark ausgeprägtes Fluoreszenzsignal detektiert, geradezu typisch für Autofluoreszenz. Durch den Einsatz spezieller optischer Filter, die Auswahl geeigneter Fluorochrome und einen großen Helligkeitsunterschied zwischen der spezifischen Färbung und unspezifischer Autofluoreszenz (sogenanntes *signal-to-noise ratio*), wird Letztere in der Regel nicht zum Problem. Schließlich lässt sich die Eigenschaft der Farbaddition auch nutzen, um auf simple Art und Weise zwischen spezifischer und unspezifischer Fluoreszenz zu unterscheiden. Legt man einzelne Farbkanäle übereinander, so entstehen gemäß der Dreifarbentheorie von Thomas Young und Hermann von Helmholtz aus den Farben Rot, Grün und Blau nunmehr Gelb, Cyan und Magenta bzw. Weiß. Dies wurde häufig bei der manuellen Nachkontrolle der mit dem *CellProfiler* segmentierten Daten genutzt. Die Ergebnisse legen nahe, dass Autofluoreszenz in postmitotischen Zellen stark

von der Inkubationsdauer der Zellkulturen und damit der Menge kumulierender autofluoreszierender Substanzen abhängt, wie auch Untersuchungen zum Alterspigment Lipofuszin zeigen.¹¹⁹ Nichtsdestotrotz wurde bereits in Abbildung 3 demonstriert, dass die Autofluoreszenz humaner glatter GMZ schon nach kurzer Kulturdauer ein Problem darstellen kann. Humane glatte GMZ sind daher nur eingeschränkt für Langzeituntersuchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop geeignet.

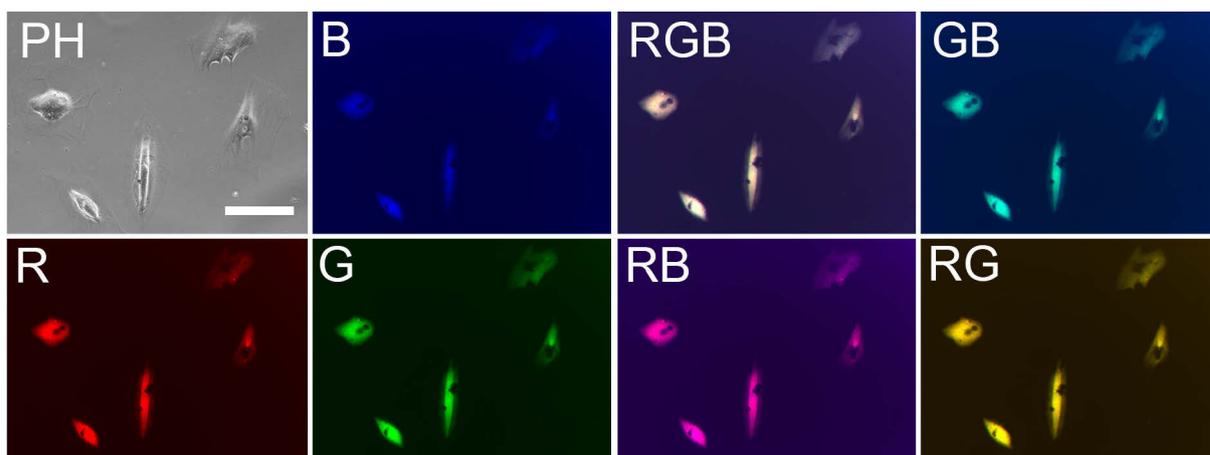


Abbildung 5: Native Aufnahmen zur Demonstration von Autofluoreszenz

Die humanen glatten GMZ wurden mit MMC behandelt und 8 Monate kultiviert. Die Aufnahmen erfolgten an lebenden Zellen in PBS ohne Färbung oder Fixierung mit gleichen Einstellungen und Belichtungszeiten (Blau: 427,9 ms; Grün: 677,0 ms; Rot: 553,6 ms; Phasenkontrast: 71,6 ms). Die Einzelkanäle sowie übereinander gelegten Mehrkanalbilder sind mit dem jeweiligen Kanalnamen bezeichnet (PH Phasenkontrast; B Blau, R Rot, G Grün). Auffällig ist die homogene Autofluoreszenz in allen 3 Kanälen, die sich im gesamten Zytoplasma aller 5 Zellen findet. Beim Zusammenlegen mehrerer Kanäle addieren sich Rot, Grün und Blau zu neuen Farben, wodurch unter Umständen zwischen spezifischem Fluoreszenzsignal und Autofluoreszenz unterschieden werden kann. Maßstabsbalken: 200 μm .

5.1.3. Differenzierung zwischen glatten Gefäßmuskelzellen der Maus und Makrophagen anhand der Zellkernmorphologie

Aufgrund der in den vorherigen Abschnitten beschriebenen methodischen Schwierigkeiten wurde die Differenzierung zwischen GMZ der Maus und humanen MP ausschließlich anhand der Kernmorphologie durchgeführt. Die Diagramme in Abbildung 6 zeigen deutlich die Größenunterschiede der Nuklei beider Zelltypen auf. Obwohl sich auch hierbei keine gänzlich fehlerfreie Differenzierung erreichen lässt, ist die Fehlerquote insgesamt doch zu vernachlässigen. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass die murinen glatten GMZ adäquat mit MMC behandelt werden, die Zelldichte nicht zu hoch gewählt wird und eine ausreichende Kulturdauer gewährleistet ist (siehe Abbildung 7). Für kurzfristige Beobachtungen ist die Methode daher nicht geeignet. Letzteres stellt mit Blick auf die Fragestellung jedoch kein Problem dar, da es sich bei dem lysosomalen LDL-Transfer von MP auf glatte GMZ um einen langfristigen Effekt mit direkter Proportionalität zur Kulturdauer handelt.²⁶

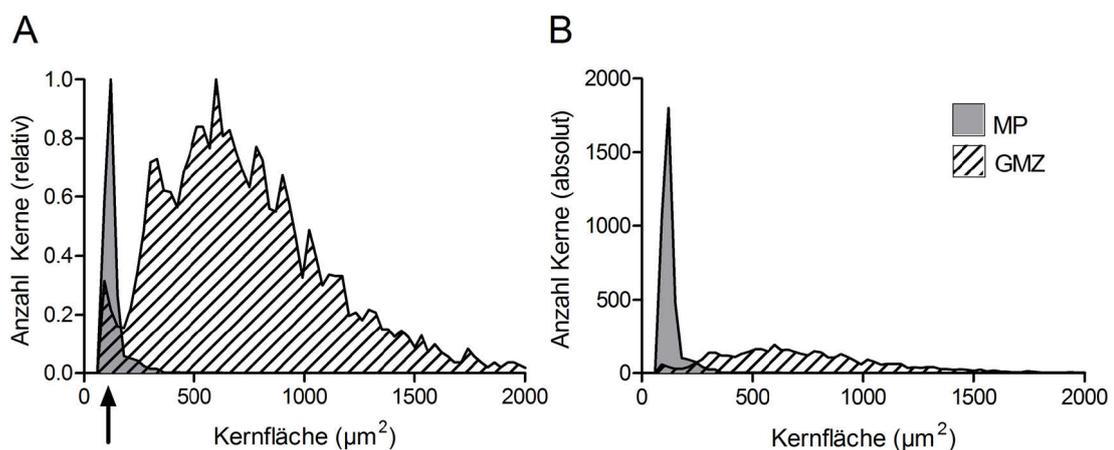


Abbildung 6: Darstellung der Kerngrößen von MP und glatten GMZ der GFP-Maus

Zur Quantifizierung der phänotypischen Unterschiede zwischen Zellkernen von MP und glatten GMZ wurden je 200 Testbilder mit ausschließlich einem Zelltyp mit Hilfe von *ImageJ* ausgewertet. Dargestellt sind Objekte mit einer Fläche von $90 \mu\text{m}^2$ bis $2000 \mu\text{m}^2$. (A) Relative Verteilung innerhalb beider Gruppen. Die Klasse mit der höchsten Anzahl an Objekten wurde 1 gesetzt. Der mit dem Pfeil markierte *peak* bei den GMZ entspricht nicht etwa kleinen Nuklei, sondern Artefakten und bei dem *thresholding* mit *ImageJ* entstandenen Kleinstobjekten, welche eigentlich Teil eines größeren Zellkerns sind. Bei der verwendeten *CellProfiler pipeline* wurde dieses Problem dadurch gelöst, dass zu kleine Objekte entweder mit größeren Objekten automatisch zusammengefügt (CP Modul 4) oder nach erfolgter Messung aufgrund der zu geringen Intensität entfernt wurden (CP Module 10 und 11). (B) Absolute Verteilung. MP-Zellkerne sind phänotypisch weitestgehend identisch und von geringer Fläche, wohingegen glatte GMZ-Nuklei in der Regel deutlich größer werden, dabei aber auch ausgeprägtere Größenunterschiede aufweisen. Die Diagramme zeigen deutlich, dass sich die kleineren MP und größeren glatten GMZ sehr gut anhand der Kerngröße unterscheiden lassen. Makrophagen: gezählte Kerne = 3756; Mittelwert = $147,8 \mu\text{m}^2$; Standardabweichung = $\pm 76,8 \mu\text{m}^2$
Glatte GMZ: gezählte Kerne = 4519; Mittelwert = $755,8 \mu\text{m}^2$; Standardabweichung = $\pm 390,0 \mu\text{m}^2$

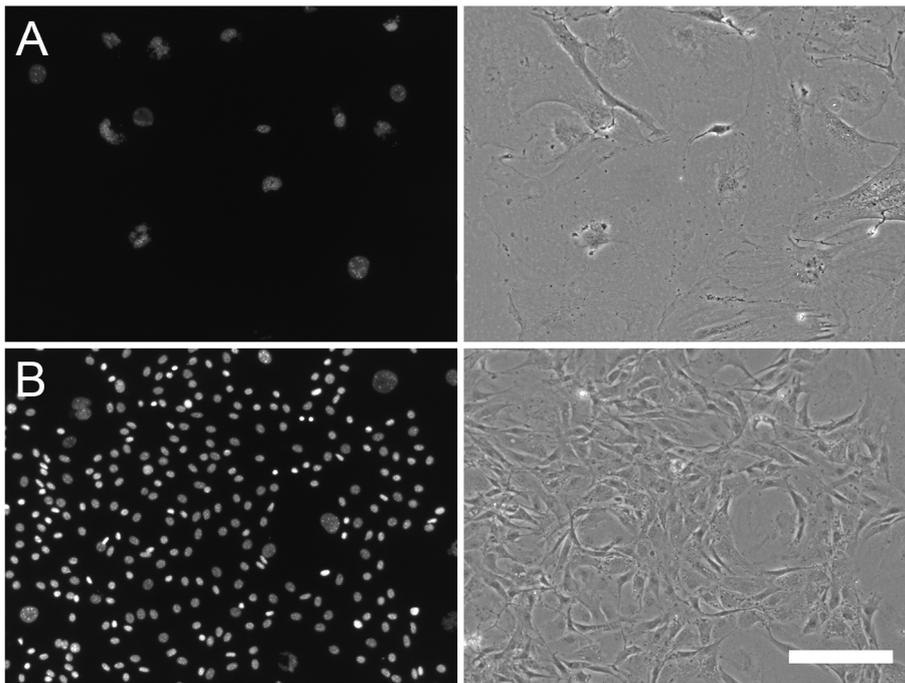


Abbildung 7: Auswirkung von Mitomycin C auf die Kernmorphologie glatter GMZ

Die glatten GMZ der GFP-Maus wurden mit MMC in Standardkonzentration ($2 \mu\text{g/ml}$ für 90 min) behandelt um deren Proliferation zu unterdrücken und für 2 Wochen kultiviert. Beide Aufnahmen stammen aus benachbarten Regionen der gleichen Probe. Wie sich herausstellte, war das verwendete MMC bereits mehrere Jahre alt und die Aktivität entsprechend herabgesetzt. Bei gleicher Konzentration konnte durch die Verlängerung der Inkubationsdauer auf 4 Stunden bzw. die Verwendung von frischem MMC wieder eine adäquate Wirkung erzielt werden. Das eigentliche Augenmerk liegt hierbei auf den phänotypischen Unterschieden zwischen den Zellkernen, welche nicht auf unterschiedlicher Herkunft oder Behandlung der Zellen, sondern ausschließlich auf einem Größenwachstum beruht. (A) Nach Stoppen der Zellproliferation unterliegen die glatten GMZ einem starken Wachstumsprozess. Die Kerne nehmen teilweise um ein Vielfaches an Größe zu und verlieren durch die Verteilung des Chromatins an Intensität. (B) Einzelne Zellklone wurden durch das MMC nicht beeinflusst. Neben großen, sich nicht mehr teilenden GMZ findet man eine Vielzahl von Zellen mit kleinen, hellen Nuklei, die stark proliferieren. Eine sichere Unterscheidung zwischen Makrophagen und glatten GMZ, die lediglich auf der Größe der Zellkerne basiert, ist daher nur nach adäquater Behandlung mit MMC möglich. Linke Spalte: DAPI. Rechte Spalte: Phasenkontrast. Maßstabsbalken: $200 \mu\text{m}$

5.2. CellProfiler

5.2.1. Automatische Segmentierung glatter Gefäßmuskelzellen und Makrophagen

Ausgehend von der Erkenntnis, dass sich humane glatte GMZ nur eingeschränkt für den beschriebenen Versuchsaufbau eignen, MMC-behandelte glatte GMZ der Maus jedoch sehr sicher anhand der Kernmorphologie von Makrophagen unterschieden werden können, wurden Kontrollexperimente durchgeführt, um zu zeigen, dass auch eine automatische Segmentierung mittels CP möglich ist. Hierzu wurden Monokulturen von GMZ bzw. MP angelegt und unter den gleichen Bedingungen wie in den Kokultur-Experimenten behandelt, was die Isolation, Zelldichte, Kulturdauer, Kulturbedingungen, Fixierung, Färbung und

Generierung der Bilddaten anbelangt. Anschließend erfolgte die Auswertung mit der CP *pipeline*.

Je 200 Testbilder mit insgesamt circa 5100 GMZ bzw. 4100 MP wurden mit verschiedenen Schwellenwerten berechnet. Der Effekt auf das Ergebnis der Kernsegmentierung ist in Abbildung 8 dargestellt. Abbildung 9 zeigt, dass mit der Kernsegmentierung bis zu 97 % der glatten Gefäßmuskelzellkerne korrekt erkannt werden. Ein durch Sauerstoffmangel bedingter signifikanter Unterschied wurde nicht beobachtet, sodass die CP *pipeline* bedenkenlos für die Normoxie/Hypoxie-Experimente eingesetzt werden konnte.

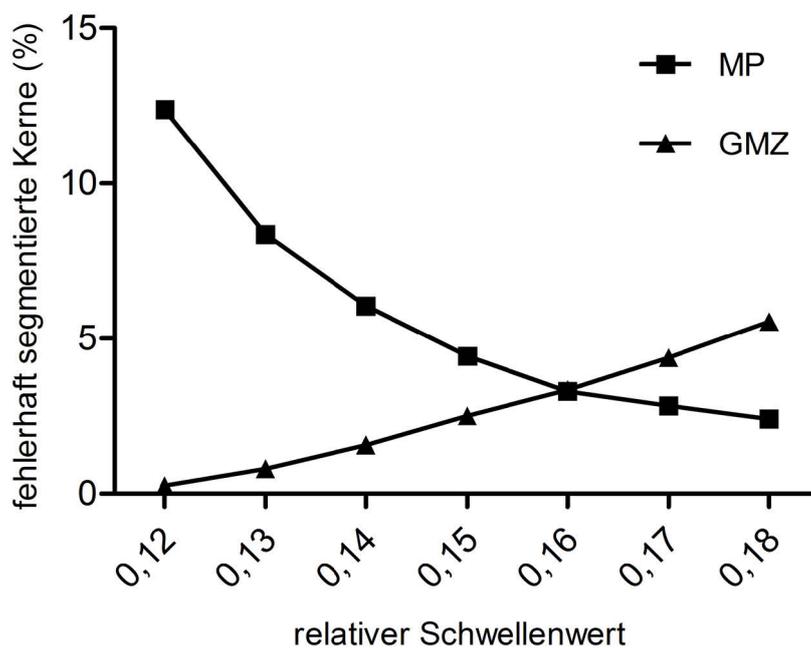


Abbildung 8: Fehlerquoten bei der Segmentierung von Zellkernen in Abhängigkeit vom relativen Schwellenwert

Je 200 Bilder, die entweder nur humane MP oder glatte GMZ der GFP-Maus enthielten, wurden unter Verwendung verschiedener Schwellenwerte mit der CP *pipeline* zur Kernererkennung ausgewertet und die Fehlerquote errechnet (MP als GMZ erkannt und umgekehrt). Mit steigendem Schwellenwert werden MP immer sicherer erkannt, weil diese durch ein strengeres *thresholding* zuverlässiger getrennt werden. Im Gegensatz dazu nimmt die Fehlerquote bei der Segmentierung von GMZ mit steigendem Schwellenwert zu, weil die Objekte (GMZ-Zellkerne) nicht mehr komplett detektiert werden, sondern aufgrund der geringeren Signaldichte zunehmend in ihrer Fläche unterschätzt werden, bis sie nach Segmentierung der Größe von MP entsprechen. Eine fehlerfreie Segmentierung ist nicht zu erreichen, jedoch kann durch passendes Setzen des Schwellenwertes der systematische Fehler auf ein akzeptables Niveau minimiert werden. Anhand der dargestellten Raten fehlerhaft segmentierter Kerne würde man sich für einen relativen Schwellenwert zwischen 0,15 und 0,17 entscheiden. Die Entscheidung für einen Wert ist auch davon abhängig, ob die Favorisierung eines Zelltyps sinnvoll bzw. wünschenswert ist (z. B. die bestmögliche Detektion von glatten GMZ auf Kosten von mehr fehlerhaften MP).

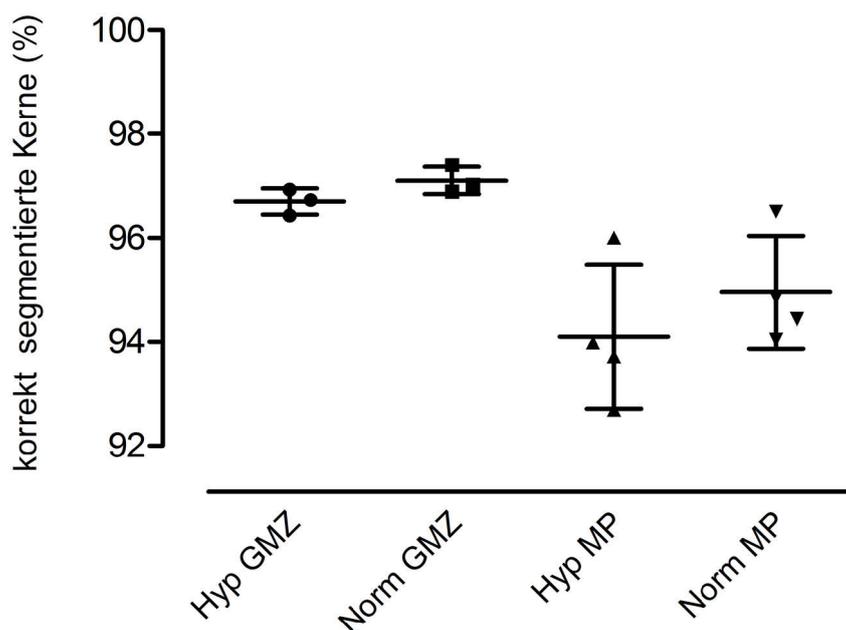


Abbildung 9: Erfolgsquoten der Kernsegmentierung anhand von Kontrolleexperimenten

14 Proben mit je 600 Bildern (6 GMZ, 8 MP; je zur Hälfte unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen; insgesamt circa 138000 Zellen), die nur MP oder glatte GMZ der GFP-Maus enthielten, wurden mit einem relativen Schwellenwert von 0,16 anhand der CP *pipeline* ausgewertet und die Anzahl der korrekt segmentierten Zellkerne bestimmt. Die Erkennung von glatten GMZ funktioniert zwar signifikant besser als bei MP ($p = 0,0008$, ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur) doch ist diese mit ebenfalls deutlich mehr als 90% immer noch zufriedenstellend und bei der späteren Auswertung auch nicht von großer Bedeutung. Vermeintliche AcLDL-positive GMZ, welche in Wirklichkeit falsch erkannte MP darstellen, würden bei der manuelle Nachkontrolle entfernt werden.

5.2.2. Detektion AcLDL-positiver glatter Gefäßmuskelzellen und manuelle Nachkontrolle

Mit der CP *pipeline* wurden nach manueller Binärisierung MP und GMZ aufgrund der Zellkernmorphologie unterschieden. Über verschiedene Filterschritte wurden jene GMZ detektiert, welche intrazelluläres AcLDL enthielten und die entsprechenden Aufnahme unter Hervorhebung bestimmter Merkmale als RBG-Bild zur manuellen Nachkontrolle exportiert. Die beschriebene *pipeline* ist geeignet, um anhand einer Vielzahl von Aufnahmen relativ sicher AcLDL-positive GMZ zu erkennen. Die falsch positiven Ergebnisse können durch manuelle Nachkontrolle effektiv eliminiert werden.

Tabelle 6 zeigt die Zusammenfassung des Normoxie/Hypoxie-Hauptexperimentes hinsichtlich Qualität und Quantität auf. Insgesamt wurde etwa eine halbe Million Zellen ausgewertet, wobei das Verhältnis von 1:1 zwischen GMZ und MP über die Dauer der Experimente hinweg aufrechterhalten werden konnte. Es wurden insgesamt neun unabhängige Experimente durchgeführt (siehe 5.3). Im Mittel wurden je Probe 14856 GMZ

und 14297 MP gezählt. Von den initial 10554 AcLDL-positiven GMZ wurden in der manuellen Nachkontrolle 6578 als korrekt akzeptiert, was einem Anteil von 61,3% entspricht.

	detektierte GMZ	detektierte MP	vorgeschlagene <i>events</i>	akzeptierte <i>events</i>	akzeptierte <i>events</i> in %
Summe	267409	257348	10554	6578	
Mittelwert	14856,1	14297,1	586,3	365,4	61,3 %
SEM	1090,7	891,4	88,2	61,5	1,6 %

Tabelle 6: Synopse des Hauptexperimentes hinsichtlich Qualität und Quantität

Der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) entspricht 7% der mittleren Gesamtzellzahl. Die geringe Streuung (45,8% bis 70,5%, SEM 1,6%) spricht für eine hohe Zuverlässigkeit der Methode.

Ausgehend von drei Fluoreszenzkanälen und dem Phasenkontrast wurden allein während der Normoxie/Hypoxie-Experimente knapp 100000 Einzelbilder generiert. Eine manuelle Auswertung in diesen Dimensionen wäre weder praktikabel noch zielführend. Nach Vorauswertung anhand der CP *pipeline* mussten noch etwa 3,9% aller GMZ (10554 von 267409) hinsichtlich ihres AcLDL-Gehaltes manuell evaluiert werden. Auch wenn es sich hierbei immer noch um mehrere tausend Bilder handelte, so ist die Arbeitserleichterung doch enorm. Da das vom CP ausgegebene RGB-Bild hinsichtlich Farbsättigung bzw. Gewichtung einzelner Kanäle sowie durch das Hinzufügen von *outlines* weitaus schneller und einfacher auszuwerten war als die unbearbeiteten Aufnahmen, konnte der Prozess der manuellen Nachkontrolle weiter optimiert werden. Einen wichtigen Aspekt stellte außerdem das anfallende Datenvolumen dar. Die primär generierten ZVI-Dateien hatten eine Größe von 11,1 MB, die TIFF-Exporte immerhin noch 5,5 MB. Mit den 4,1 MB des finalen RGB-Bildes wurde eine Datenreduktion um 63% erreicht.

Durch die Kombination aus semiautomatischer Auswertung und manueller Nachkontrolle wurde ein höchstmögliches Maß an Objektivität und Effizienz erreicht und gleichzeitig gewährleistet, dass trotz der Komplexität der Aufnahmen und verhältnismäßig seltener Ereignisse möglichst wenige AcLDL-positive GMZ übersehen wurden. Die Aussagekraft der erhobenen Daten übertrifft solche, die ausschließlich durch manuelles und damit fehleranfälligeres Auszählen kleinerer Bildausschnitte erhoben wurden, bei weitem.

5.3. Nachweis des Transports Lipid-geladener Lysosomen aus Makrophagen in glatte Gefäßmuskelzellen unter Hypoxie

Anhand von 9 gepaarten Proben wurde der von Weinert *et al.* beschriebene Transport von Lipid-geladenen Lysosomen aus MP in glatte GMZ auch unter hypoxischen Bedingungen untersucht (Abbildung 10). Die Kokulturen aus humanen MP und glatten GMZ der GFP-Maus wurden 10 Tage entweder unter Hypoxie oder Normoxie kultiviert und anschließend fixiert und gefärbt. Die Auswertung erfolgte anhand der beschriebenen CP *pipeline* mit manueller Nachkontrolle.

Es konnte gezeigt werden, dass der LDL-Transfer von MP auf glatte GMZ auch unter hypoxischen Bedingungen stattfindet. Ein signifikanter Unterschied zwischen den unter Normoxie bzw. Hypoxie kultivierten Proben konnte nicht nachgewiesen werden.

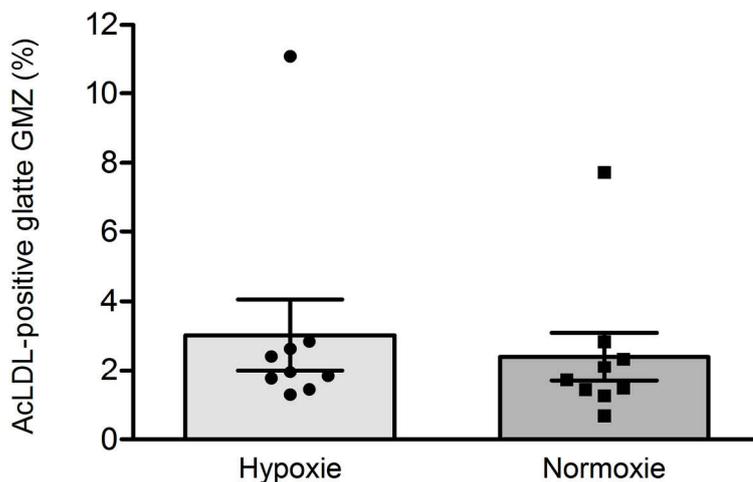


Abbildung 10: Ergebnisse der Untersuchungen zum LDL-Transfer von MP auf glatte GMZ

Das Diagramm zeigt den Anteil AcLDL-positiver glatter GMZ nach Inkubation unter hypoxischen oder normoxischen Bedingungen (Mittelwert \pm SEM sowie Einzelwerte der Experimente; N = 9). Es zeigt sich, dass auch unter Hypoxie ein LDL-Transfer von Makrophagen auf glatte GMZ stattfindet. Ein signifikanter Unterschied der Transferrate im Vergleich zur Normoxiekontrolle findet sich nicht ($p = 0,20$). Die Auswertung erfolgte mittels gepaartem t-Test.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der von Weinert *et al.* beschriebene LDL-Transfer von MP auf glatte GMZ *in vitro* unabhängig von normoxischen oder hypoxischen Bedingungen stattfindet. Eine Untersuchung der Fragestellung mit konventioneller Immunzytochemie und etablierten Protokollen erschien nicht möglich, da sich die Methoden zur Permeabilisierung der Zellmembran zu sehr auf das intrazelluläre AcLDL-Signal auswirkten und die erhebliche Autofluoreszenz insbesondere humaner glatter GMZ Langzeituntersuchungen erschwerte. Aus diesem Grund wurde eine *high-content* Methodik entwickelt, welche ohne vorherige immunzytochemische Färbungen auskommt, sich des *open-source*-Programmes *CellProfiler* bedient und auch in Laboren mit einfacher Ausstattung implementiert werden kann. Mit der beschriebenen CP *pipeline* erfolgte die Differenzierung der einzelnen Zelltypen anhand unterschiedlicher Zellkerngrößen und eine sichere Detektion AcLDL-positiver glatter GMZ. Eine Optimierung der Ergebnisse gelang durch die Kombination automatischer Verfahren zur Bildverarbeitung und manueller Nachkontrolle. Die einzelnen Schritte zur Etablierung der Methodik und das zentrale Experiment werden im Folgenden einzeln diskutiert.

6.1. Zellmembranpermeabilisierung

Eine immunzytochemische Färbung intrazellulärer Proteine ohne Zellmembranpermeabilisierung ist nicht möglich. Wie unter 5.1.1 gezeigt, gibt es nach aktuellem Kenntnisstand keine Methode, um Zellmembranen zu permeabilisieren und gleichzeitig das intrazelluläre AcLDL-Signal zu erhalten. Auch wenn dieses Problem im konkreten Fall durch Verzicht auf eine Immunzytochemie umgangen werden konnte, besteht prinzipiell Bedarf für eine Methode, welche beide Kriterien erfüllt.

Physikalische Methoden könnten hierbei der chemischen Permeabilisierung überlegen sein. Seit längerem werden bereits Ultraschallwellen oder kurze elektrische Impulse für diese Zwecke eingesetzt, zum Beispiel um Nukleinsäuren zu transfizieren.^{172,173} Darüber hinaus gibt es Untersuchungen mit 70 kDa FITC-Dextran-Molekülen, die durch Anwendung von Ultraschall in die Zelle diffundierten,¹⁷⁴ oder mit 1,5 kDa Bleomycin, welches nach Applikation von Strom in die Zelle gelangt.¹⁷⁵ Mittlerweile kommen zudem laserbasierte Methoden zum Einsatz.^{176,177} Bei all diesen physikalischen Methoden bilden sich kurzzeitig kleine Poren aus, durch welche jedoch selbst einzelne Antikörper aufgrund ihrer Größe von etwa 150 kDa nicht diffundieren können. Außerdem muss beachtet werden, dass alle physikalischen Maßnahmen die Proben über die gewünschte Permeabilisierung hinaus potentiell verändern könnten. Dies gilt sowohl für den verwendeten AK als auch für das Epitop, das er erkennt.

Mit Blick auf die Verwendung von Lasern ist neben deren vergleichsweise hohen Preis und etwaigen technischen Herausforderungen in der Wartung vor allem zu beachten, dass sie mitunter eine Verminderung des Fluoreszenzsignals durch *Photobleaching* bewirken.

Eine Alternative könnten Porenbildner wie die Antimykotika Amphotericin B und Nystatin darstellen. Über die Interaktion mit Ergosterin (aber auch Cholesterin) werden Membranporen geformt, durch welche es zu Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt von Zellen kommt. Im Fall von Amphotericin B beträgt die Porengröße lediglich 0,8 nm und ist damit zu klein für AK, deren Größe im Nanometerbereich liegt.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ Ein ähnlicher Mechanismus wurde für Phytosphingosin beschrieben. Durch die gebildeten Poren sollen immerhin Proteine von 10 bis 80 kDa diffundieren können¹⁸¹, was jedoch immer noch nicht ausreichend für die Passage kompletter Antikörper ist. Zudem müsste die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse von Pilzen auf Säugetierzellen untersucht werden.

Anstatt eine Vergrößerung der Membranporen anzustreben, ist der Einsatz kleinerer *tracer* in Kombination mit den etablierten Verfahren ernsthaft zu erwägen. Aptamere¹⁸² und Nanobodies¹⁸³ könnten diesen Zweck erfüllen und sind mit 13 bis 36 kDa um ein Vielfaches kleiner als komplette AK. Derartige *tracer* wurden bereits erfolgreich zur Markierung spezifischer Strukturen eingesetzt,¹⁸³⁻¹⁸⁵ allerdings ist ihre Verfügbarkeit noch sehr begrenzt.

6.2. Autofluoreszenz

Autofluoreszenz stellt prinzipiell immer einen Störfaktor in der Fluoreszenzmikroskopie dar.^{122,124} Wie unter 5.1.2 gezeigt werden konnte, sind humane glatte GMZ aufgrund starker Autofluoreszenz nur eingeschränkt für die beschriebenen Langzeituntersuchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop geeignet. Im Vergleich zu murinen glatten GMZ weisen sie eine deutlich langsamere Teilungsrate auf, sodass in den humanen Zellen vermutlich mehr autofluoreszierende Moleküle kumulieren können.

Es gibt diverse Möglichkeiten, Autofluoreszenz zu umgehen oder abzuschwächen,^{122,124-131} aber wie im beschriebenen Versuchsaufbau ist dies nicht immer umsetzbar. In der vorgelegten Studie ist vor allem versucht worden, durch Optimierung der Fixierungs- und Permeabilisierungsprotokolle eine bessere Verfügbarkeit der Epitope für die AK zu erreichen. Darüber hinaus ist auch das chemische *quenching* durch Natriumborhydrid getestet worden, zeigte aber ebenfalls keine Erfolge (Daten nicht gezeigt).^{122,127} Ein Ausweichen auf aldehydfreie Fixationslösungen ist prinzipiell ebenfalls möglich, birgt jedoch die Gefahr, dass die Proben anderweitig verändert oder gar unbrauchbar werden, wie anhand von Methanol gezeigt wurde. *Photobleaching* kam wiederum nicht in Frage, da das zu detektierende Fluorochrom (AcLDL) bereits lange Zeit vor der Fixation in die Proben gegeben wurde und so ebenfalls an Intensität verloren hätte.¹²⁹ In der Fluoreszenzmikroskopie kamen geeignete

Filter zum Einsatz, sodass hier nur ein geringes Optimierungspotential liegt. Ein Wechseln auf Zellen, welche weniger oder keine extrazellulären Matrixproteine synthetisieren, war aufgrund der Fragestellung nicht möglich.

Selbst wenn eine Bildgenerierung ohne Autofluoreszenz nicht möglich ist, besteht dennoch die Option sich diese nutzbar zu machen. So ist eine Differenzierung zwischen spezifischem und unspezifischem Signal anhand der Verteilung in verschiedenen Fluoreszenzkanälen möglich. Dies kam bei der manuellen Nachkontrolle der mit dem CP segmentierten Daten zur Anwendung (siehe Abbildung 5 und Abbildung 11). Hier wäre auch eine Weiterentwicklung des Konzeptes für automatische Applikationen denkbar. So könnte Autofluoreszenz im Rahmen der Bildverarbeitung durch Subtraktion von Signalen eliminiert oder wenigstens verringert werden, welche in mehreren Kanälen überlappend auftreten. Dies würde jedoch voraussetzen, dass es keine relevante natürliche Kollokalisierung der untersuchten Strukturen gibt.

6.3. Halbautomatische Bildsegmentierung mit der *open-source-Software CellProfiler*

Die Auswertung von Bilddaten nimmt eine zentrale Rolle in der Klinik, medizinisch-biologischen Forschung und vielen anderen Fachbereichen ein. Erste Ansätze zur Generierung größerer Datenmengen und deren halbautomatischen Analyse finden sich bereits Mitte bis Ende der 1980er Jahre.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ Doch erst die zunehmende Digitalisierung eröffnete eine Vielzahl neuer Möglichkeiten. Automatisierung in der Forschung, insbesondere bei Pipettier-Robotern, in der Zellkultur und der Mikroskopie, ermöglicht die Untersuchung immer größerer Probenmengen in kürzeren Zeitabschnitten.^{165,189-191} Gleichzeitig werden die erhobenen Daten stetig komplexer. Durch eine wachsende Anzahl möglicher Fluorochrome, monoklonaler Antikörper und organellspezifischer Farbstoffe können umfangreiche Mehrkanalaufnahmen angefertigt und komplizierte Sachverhalte untersucht werden.^{192,193}

Diese komplexeren Bilddaten gehen jedoch mit einem erhöhten Aufwand bei der Auswertung einher. Während die Bearbeitung einfacher Probleme durchaus mit Standardanwendungen wie zum Beispiel *ImageJ* möglich ist, sind *high-content* Analysen, also die Generierung und Auswertung großer Datenmengen, mit solchen Programmen kaum noch ökonomisch realisierbar. So ist eine einfache Zellkernzählung und nachfolgende Differenzierung in Makrophagen und glatte Gefäßmuskelzellen, wie sie im Rahmen der beschriebenen Experimente vorgenommen worden ist, mit *ImageJ* zwar durchaus umsetzbar gewesen. Die sichere Detektion der seltenen AcLDL-positiven GMZ in Kokultur mit einer Vielzahl AcLDL-

positiver MP stellt jedoch einen allzu komplexen Sachverhalt dar, der in *ImageJ* bestenfalls mit erheblichem Programmieraufwand zu lösen gewesen wäre.

Hier kommen die Möglichkeiten einer automatischen Bildsegmentierung zum Tragen. Die Vorteile gegenüber dem manuellen Auswerten von Bilddaten sind vielschichtig. Zum einen kann ein enormes Datenvolumen schneller und einfacher bearbeitet werden. Dies ermöglicht die Generierung von Daten in bereits vielfach eingesetzten *high-content* Analysen, welche wiederum in schnelleren Ergebnissen resultieren. Diese haben zudem eine hohe Objektivität und Reproduzierbarkeit. Es kommt zu einer großen Arbeitserleichterung für den Untersucher. Aufgrund der rapide fortschreitenden Entwicklung von Software sowie immer leistungsfähigerer und günstigerer Hardware-Komponenten ist der technische Aufwand selbst für kleinere Forschungseinrichtungen überschaubar. Daraus ergeben sich eine Vielzahl neuer Anwendungsbereiche. Einige Beispiele für praktische Anwendungen automatischer Bildanalysen finden sich in der Auswertung von Kometenassays,¹⁹⁴ Medikamentenscreening im Rahmen von Chlamydieninfektionen¹⁹⁵ oder an *Caenorhabditis elegans* Modellen,¹⁹⁶ RNA Interferenzscreening,¹⁹⁷ Untersuchungen von Mikrogefäßen in Tumorgewebe¹⁹⁸ oder Untersuchungen zur Chemotaxis an neutrophilen Granulozyten.¹⁹⁹

Nachteile ergeben sich hier vor allem durch die initial notwendigen Investitionen. Neben der Anschaffung kompatibler Technik, wie automatischer Mikroskoptische, Speicher- und ggf. Übertragungskapazitäten für das erhöhte Datenvolumen und passender Software, muss der entsprechende Algorithmus zur Datenverarbeitung entwickelt und validiert werden. Kostenfreie und benutzerfreundliche *open-source*-Programme mit vordefinierten Bildverarbeitungsprogrammen, wie der CP, bieten sich hier an. Ein weiterer Nachteil ist das potentielle Auftreten systematischer Fehler, welche nicht erkannt oder durch fehlende Interventionsmöglichkeiten nicht korrigiert werden können. Einfache Abläufe zur Bildsegmentierung und Analyse funktionieren lediglich anhand vorher definierter Parameter. Sind diese falsch gewählt, ist auch das Ergebnis potentiell fehlerbehaftet. Abhilfe kann das Ausnutzen des *machine learning*, einer Art künstlichen Intelligenz, schaffen. Ein populäres Beispiel dafür ist der *CellProfiler Analyst*.²⁰⁰ Hierbei „lernt“ das Programm anhand manuell gewählter Beispielbilder mit Hilfe von Iteration bzw. „Trainieren“ durch den Untersucher verschiedene Phänotypen zu erkennen, zuzuordnen und neue Eigenschaften zu entdecken. Es ist daher insbesondere zur Exploration multidimensionaler Bilddaten aus *high-content* Experimenten geeignet.

Gründe für die Nutzung des *CellProfiler* zur Auswertung der erhobenen Daten waren zum einen die Anwenderfreundlichkeit und zum anderen die Verfügbarkeit als *open-source*-Projekt.¹⁶⁹ *Open-source*-Software bezeichnet Programme, deren Quelltexte unter bestimmten Nutzungsvereinbarungen frei einsehbar und editierbar sind. Sie ist häufig robuster, d. h. weniger fehleranfällig, und kosteneffizienter als kommerziell erhältliche

Produkte und findet daher auch in medizinischen Fragestellungen eine immer breitere Anwendung.²⁰¹ Dies liegt vor allem an der Vielzahl von Anwendern (*community*), welche die Programme weiterentwickeln, individualisieren und durch die regelmäßige Anwendung validieren sowie Fehler korrigieren. Kommerzielle Bildverarbeitungssysteme und Komplettlösungen haben zwar den Vorteil, dass diese in der Regel einfach für simple Fragestellungen zu nutzen sind und es innerhalb solcher „*out of the box*“-Lösungen zu keinen Kompatibilitätsproblemen kommen sollte. Jedoch ist es dem Anwender unmöglich, einzelne Teile kostengünstig zu erweitern oder die Software für die eigenen Bedürfnisse zu individualisieren. Dies führt dazu, dass neue Bildgebungsverfahren langsamer transferiert werden.²⁰² Aufgrund des kontinuierlichen *peer review* durch die *community* findet eine natürliche Selektion und stetige Qualitätskontrolle statt. Bestehende Module werden regelmäßig aktualisiert, fehlerhafte und untaugliche Programme setzen sich nicht durch.²⁰¹ Lizenzgebühren entfallen und die Programmierer handeln in der Regel aus genuinem Interesse, wodurch es zu einer enormen Kostenersparnis kommt.

Die freie Verfügbarkeit ermöglicht den Nutzern, die Programme nach eigenen Bedürfnissen weiterzuentwickeln und die Ergebnisse mit anderen zu teilen. Die *community* bietet hierbei Feedback und Unterstützung, z. B. in Onlineforen. Gerade *open-source*-Programme wie *ImageJ*, *Fiji* und der CP bieten eine Vielzahl an Modulen oder *plug-ins*, welche von Anwendern für spezifische Probleme erstellt wurden. Die Eigeninitiative wird hierbei explizit gefördert. Kommerzielle Hersteller können in der Gesamtheit nie alle Fragestellungen erfassen, an denen die wissenschaftliche Gemeinschaft arbeitet. Selbst der Versuch resultiert bestenfalls in einem verspäteten Erscheinen benötigter Software-Lösungen.²⁰¹

Open-source-Software kann sich aufgrund der genannten Vorteile hingegen viel schneller weiterentwickeln und somit die Bedürfnisse der Anwender besser befriedigen. Diese Eigenschaften machen den CP und andere *open-source*-Software insbesondere für den Einsatz in kleineren Laboren ohne große technische Ausstattung oder eigene Softwareentwickler attraktiv. Die Verbreitung von *open-source*-Software in der Medizin beschränkt sich jedoch nicht auf wissenschaftliche Fragestellungen. So findet sich ein enorm breites Anwendungsspektrum in klinischen Bereichen, wie Bildverarbeitung in der Radiologie und Nuklearmedizin²⁰³, elektronischen Patientenakten²⁰⁴, Registern²⁰⁵ oder einem elektronischen Unterstützungsprogramm zur Dosisfindung bei insulinpflichtigen Diabetikern.²⁰⁶

Die genannten Vorteile konnten durch Nutzung des CP im Rahmen dieser Arbeit umgesetzt und durch die erworbenen Kompetenzen die reguläre Verwendung des Programms und der geschaffenen Methodik in der Arbeitsgruppe fest etabliert werden.

Zur Untersuchung des LDL-Transfers von MP auf glatte GMZ unter hypoxischen Bedingungen mittels *high-content* Analyse wurde eine eigene CP *pipeline* entwickelt und

validiert. Diese diente der Auswertung tausender fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen im Rahmen der bearbeiteten Fragestellungen. Die beschriebene *pipeline* ist nicht nur in der Lage, sicher zwischen GMZ und MP zu unterscheiden, sondern zudem auch jene GMZ zu detektieren, welche im Rahmen einer zehntägigen Kokultur Alexa Fluor 594-konjugiertes acetyliertes LDL von MP übertragen bekommen haben. Ermöglicht wurde dies trotz der fehlenden Möglichkeit einer zufriedenstellenden Immunzytochemie und heterogener GFP-Expression der murinen glatten GMZ durch eine Beschränkung der Analyse auf den perinukleären Bereich, da das AcLDL vor allem im Zytoplasma um den Zellkern der GMZ lokalisiert ist. Durch radiale Expansion des detektierten nukleären Areal wurde der zu analysierende Bereich definiert. Da dieser in seiner Größe etwa dem perinukleären Raum entspricht, konnte die Zelle auf ihren Gehalt an AcLDL evaluiert werden ohne die tatsächlichen Zellgrenzen fehlerfrei segmentieren zu müssen. So war auch an hochkomplexen mehrdimensionalen Fluoreszenzaufnahmen von Kokulturen eine suffiziente Analyse möglich.

In den durchgeführten Experimenten zeigten sich sowohl für die Kernsegmentierung (Abbildung 9) als auch für die Erkennung AcLDL-positiver glatter GMZ (Tabelle 6) reproduzierbare Ergebnisse mit geringer Streuung. Gewisse Schwankungen in der Anzahl der gezählten Zellen sind methodenbedingt und nicht zu vermeiden, lagen jedoch in einem akzeptablen Bereich. Sie kommen vorwiegend durch Ungenauigkeiten beim Auszählen der Zellen in der Neubauer-Zählkammer, eine ungleichmäßige Verteilung innerhalb eines *Wells* und zufällig ausgewählte Bildausschnitte zu Stande.

Die hohe Anzahl an falsch positiven Ergebnissen ist durch relativ großzügige Schwellenwertverfahren bedingt und war beabsichtigt, um aufgrund der seltenen *events* möglichst wenige AcLDL-enthaltende GMZ zu übersehen, d. h. falsch negative Ergebnisse zu vermeiden. Folglich wurden in der manuellen Nachkontrolle lediglich 61,3% der ursprünglich detektierten *events* als korrekt akzeptiert (siehe Tabelle 6).

Durch vollständig automatisierte Bildgenerierung kam es wiederholt zu Aufnahmen, welche unscharf waren oder aufgrund von Artefakten eine mangelhafte Qualität aufwiesen. Zu letzteren gehörten unter anderem Staub, Lufteinschlüsse im Eindeckmedium und unspezifische bzw. Autofluoreszenz. Andere Probleme stellten Über- und Untersegmentierung im Rahmen der automatisierten Bildverarbeitung dar. Weiterhin gab es Ausschnitte, die sich als zu komplex für eine gänzlich automatisierte Auswertung erwiesen haben. Beispiele dafür stellen neben polynukleären Zellen und sehr nah beieinanderliegenden Zellkernen auch MP dar, welche sich direkt auf glatten GMZ fanden und nicht im Schritt 16 der CP *pipeline* entfernt wurden. Abbildung 11 zeigt Beispielaufnahmen nach Prozessierung durch den CP einschließlich korrekt segmentierter Objekte, falschem *thresholding* und Artefakten.

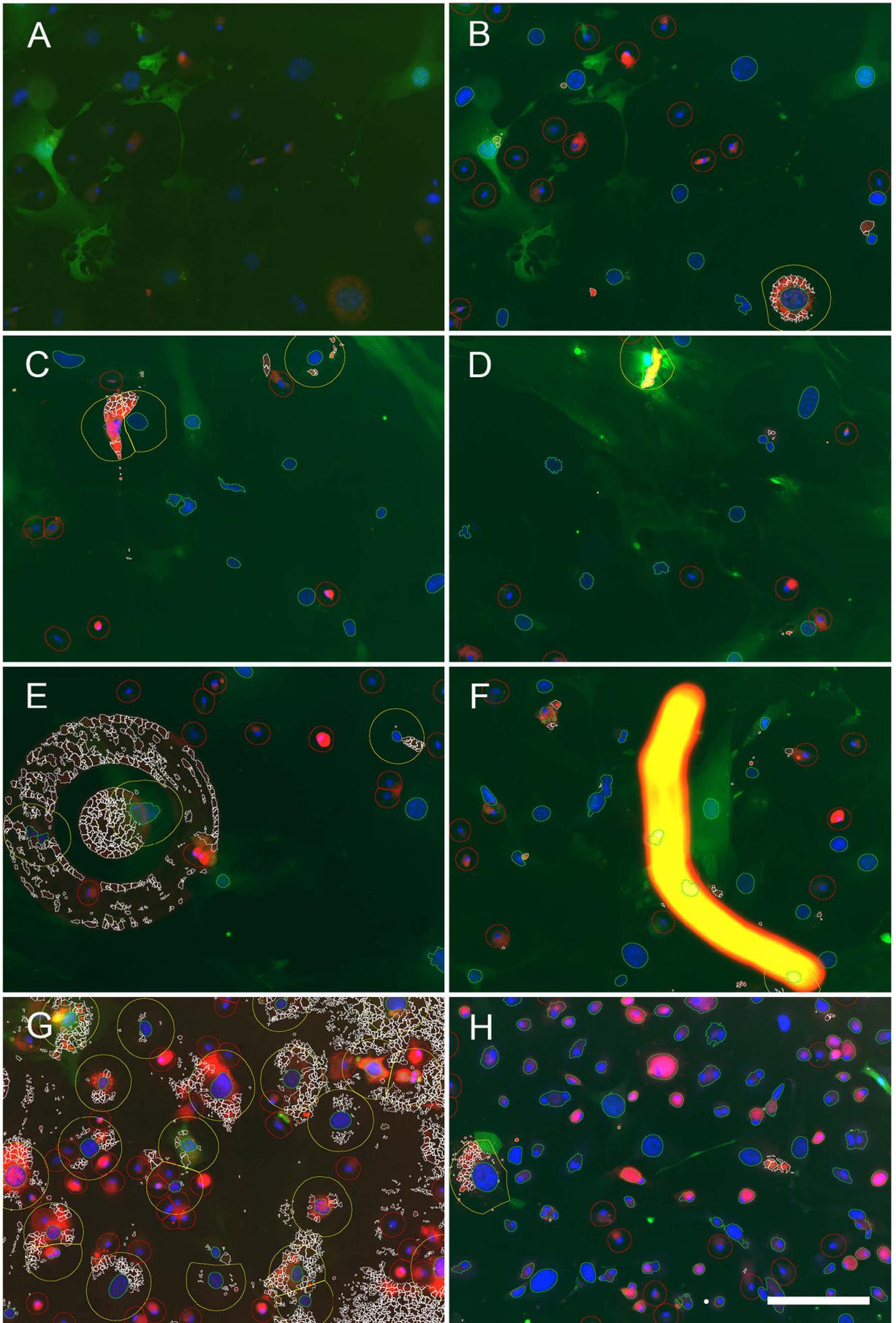


Abbildung 11: Beispielbilder der automatischen Bildsegmentierung mit der entwickelten CellProfiler pipeline einschließlich fehlerhaft segmentierter Objekte

(A) Unbearbeitete Fluoreszenzaufnahme eines repräsentativen Bildausschnitts mit Darstellung der glatten GMZ (GFP, grün), der Zellkerne (DAPI, blau) und des AcLDL (Alexa Fluor 594, rot). (B) Identische Aufnahme wie A nach Segmentierung durch den CP als RGB-Bild zur manuellen Nachkontrolle. Roter und blauer Kanal wurden verstärkt und die einzelnen Objektumrisse eingefügt. Die AcLDL-positive glatte GMZ unten rechts im Bild ist deutlich leichter zu erkennen. (C) Zwei GMZ werden als AcLDL-positiv erkannt, da diese dicht beieinanderliegen. Tatsächlich ist nur eine GMZ korrekt erkannt worden. In der manuellen Nachkontrolle wird dies korrigiert. (D) Beispiel für eine falsch positive GMZ durch unspezifische Fluoreszenz. Das markierte AcLDL-Signal stellt sich nach Addition mit dem grünen Kanal als gelb und damit unspezifisch dar. (E) Ein im Eindeckmedium eingeschlossenes Luftbläschen verursacht falsch positive Ergebnisse. (F) Verunreinigungen (Staub) auf dem Präparat führen zu Artefakten. (G) Durch einen zu niedrig gesetzten Schwellenwert für den roten Kanal kommt es zu einer Vielzahl falsch positiver GMZ. (H) Ein zu niedrig gesetzter Schwellenwert im blauen Kanal verursacht falsch segmentierte Zellkerne. Viele MP werden als GMZ behandelt. Maßstabsbalken: 200 μm .

Ein strengeres Setzen der Schwellenwerte, z. B. eine höheres AcLDL-Signal im perinuklären Bereich (Schritt 21) oder eine geringere Vergrößerung der glatten Gefäßmuskelzellkerne (Schritt 12) hätte zwar eine verminderte Anzahl potentieller *events* bedeutet, damit die manuelle Arbeitslast verringert und die Akzeptanzrate erhöht. Es wäre jedoch wahrscheinlich der Anteil nicht detektierter, aber dennoch AcLDL-positiver glatter GMZ gestiegen. Da das Interesse nicht auf einer absoluten Zahl, sondern dem relativen Vergleich zweier Konditionen lag, stellt dieser systematische Fehler prinzipiell kein großes Problem dar. Doch mit der Kombination aus automatischer Bildverarbeitung und manueller Nachkontrolle wurde letztendlich ein hohes Maß an Genauigkeit erreicht und die falsch positiven Ergebnissen konnten hierdurch effektiv korrigiert werden.

Aufgrund der geringen Streuung wäre es auch denkbar, gänzlich auf eine manuelle Nachkontrolle zu verzichten. Wir hielten diese dennoch für sinnvoll und notwendig. Trotz einer Vielzahl an mathematischen Algorithmen, welche zur Bildsegmentierung und Analyse entwickelt wurden, stellen insbesondere komplexe Zusammenhänge, sich überlappende Strukturen und biologische Aufnahmen im Allgemeinen eine Herausforderung dar.¹³⁹ Semiautomatische Verfahren sind daher effizienter und genauer als vollautomatische Bildverarbeitung.¹³⁸ Der einzelne Untersucher ist nicht in der Lage, innerhalb von Minuten bis Stunden tausende Aufnahmen zu sichten, alle Objekte zu erkennen bzw. zu klassifizieren, zu zählen und bestimmte Merkmale herauszufiltern, wie dies mit einem einfachen Laborrechner und der passenden Software möglich gemacht wurde. Doch das menschliche Gehirn in seiner Abstrahierungsfähigkeit ist bis dato unübertroffen. Daher liegt es nahe, sich die Kombination aus reiner Rechenleistung und menschlichen Diskriminationsfähigkeiten zu Nutze zu machen. Hierdurch eröffnen sich vollkommen neue Möglichkeiten in der Analyse biomedizinischer und anderer Daten.

6.4. Der LDL-Transfer von Makrophagen auf glatte Gefäßmuskelzellen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der LDL-Transfer von MP auf glatte GMZ *in vitro* unabhängig von normoxischen oder hypoxischen Bedingungen stattfindet. Es ist daher anzunehmen, dass die vorausgegangenen Erkenntnisse von Weinert *et al.* zum LDL-Transport und den phänotypischen Veränderungen betroffener GMZ auch in Bezug auf hypoxische Regionen der atherosklerotischen Plaque ihre Gültigkeit behalten. Dies trifft insbesondere auf den nekrotischen Kern und seine Randbereiche zu. Dieser Befund stützt die Hypothese, dass der untersuchte Mechanismus des LDL-Transfers auf glatte GMZ eine wichtige Rolle bei der Schaumzellbildung, Plaquestabilisierung und Plaqueruptur spielt.

Ungeklärt bleibt die Frage, welcher genaue Transportmechanismus dem LDL-Transfer zugrunde liegt. Beispiele für die interzelluläre Kommunikation, den Austausch von Informationen sowie großen und kleinen Moleküle in tierischen bzw. menschlichen Zellen, stellen neben endokrinen und parakrinen Mechanismen *gap junctions*, Exosomen, Phagozytose sowie neuronale und immunologische Synapsen²⁰⁷ dar. Eine Beteiligung von *gap junctions* am LDL-Transfer auf glatte GMZ ist praktisch nicht möglich, da diese nur für kleine Moleküle mit maximal 1 bis 2 kDa permeabel sind.²⁰⁸ Die Aufnahme mittels Phagozytose von Exosomen oder freiem AcLDL wurde bereits von Weinert *et al.* ausgeschlossen.²⁶ Neuronale Synapsen finden sich lediglich im Nervensystem. Eine Vermittlung über immunologische Synapsen wäre prinzipiell denkbar, doch werden nach gängigem Konzept hierbei lediglich sekretorische Lysosomen freigesetzt, welche nach Verschmelzung mit der Zellmembran der gegenüberliegenden Zelle zytotoxische Proteine freisetzen. Zur Aufnahme intakter Lysosomen durch die empfangende Zelle kommt es dabei nicht.^{209,210}

Gegenstand aktueller Forschung stellen *tunneling nanotubes* (TNT) dar, welche 2004 erstmalig beschrieben wurden.²¹¹ Hierbei handelt es sich um röhrenförmige Verbindungen zwischen zwei Zellen, welche F-Aktin enthalten, innerhalb weniger Minuten geformt werden und über Minuten bis Stunden bestehen können.^{211,212} TNT bewirken ein temporäres Verschmelzen der Zellmembranen und damit transiente zytoplasmatische Kontinuität. TNT wurden für diverse Zelllinien und primäre Zellen beschrieben und bilden sich sowohl zwischen unterschiedlichen als auch gleichen Zellarten. Sie variieren stark in Durchmesser, Länge und Art der transportierten Moleküle.²¹³ So werden in der Literatur Durchmesser zwischen 50 und 2000 nm^{211,214} sowie Längen von wenigen Mikrometern bis 140 µm beschrieben.^{213,215} Es gibt Hinweise für die Beteiligung von TNT in der Embryogenese, Immunologie, Geweberegeneration und elektrischen Signaltransduktion.²¹⁶ So können über TNT Vesikel von verschiedenen Organellen einschließlich Endosomen,^{217,218} Lysosomen^{217,219} und Mitochondrien^{217,220} sowie Bestandteile der Plasmamembran,²¹¹

Kalziumsignale²²¹ und Pathogene wie Bakterien,²¹⁷ HIV-Partikel²²² und Prionen²²³ in andere Zellen transportiert werden. Im Rahmen der Aktivierung von natürlichen Killerzellen²²⁴ und im Zusammenhang mit dem Antigenaustausch in dendritischen Zellen²²⁵ sind TNT wahrscheinlich an der Immunantwort beteiligt.

Der genaue Entstehungsmechanismus dieser Strukturen ist noch nicht hinreichend geklärt.²¹⁶ Diskutiert wird die Ausbildung von TNT einerseits auf Basis aktin-gesteuerter Protrusionen²¹¹ oder andererseits zwischen zwei verbundenen, aber sich voneinander entfernenden Zellen. Hinweise für den letztgenannten Mechanismus haben sich insbesondere in Immunzellen gezeigt.²¹⁵⁻²¹⁷ Herausforderungen bei der Untersuchung von TNT ergeben sich aus dem Fehlen spezifischer Marker zur Detektion sowie der hohen Fragilität dieser Strukturen gegenüber mechanischer Beanspruchung, Lichtexposition und chemischer Fixation.²¹¹

Der Fokus der vorgelegten Studie lag auf dem prinzipiellen Nachweis des untersuchten LDL-Transfers unter hypoxischen Bedingungen, sodass die Methodik entsprechend gewählt worden ist. Die relativ geringe Frequenz des untersuchten LDL-Transfers wie auch die geringe mikroskopische Auflösung in dieser Arbeit erklären, warum keine TNT *in vitro* beobachtet wurden.

Eine weitere, kürzlich beschriebene interzelluläre Verbindung entsteht durch Verschmelzung von Pseudopodien in einer murinen, makrophagen-ähnlichen Zelllinie. Diese *inter-pseudopodial axis connections* (iPACs) sollen sich in diversen Kriterien von TNT unterscheiden und über die Bildung von tunnelartigen Strukturen den Transport sowohl von Membranbestandteilen als auch von Partikeln bis zu einem Durchmesser von 0,5 µm ermöglichen.²²⁶ Allerdings entstehen iPACs nur an Kratzern auf Zellkulturplatten aus Kunststoff und bilden sich nicht zwischen anderen untersuchten Zellarten aus. Weitere Ergebnisse hierzu bleiben daher abzuwarten.

Vor dem Hintergrund der bisherigen Erkenntnisse zu den grundsätzlich möglichen Übertragungsmechanismen erscheint ein TNT-vermittelter Transport beim Transfer Lipid-geladener Lysosomen aus MP in glatte GMZ aus den nachfolgend genannten Gründen als wahrscheinlich:

1. Die Aufnahme von AcLDL in glatte GMZ über einen endosomalen Phagozytoseweg wurde bereits von Weinert *et al.* ausgeschlossen.²⁶ Da ein Transport über TNT unabhängig von der Endosomenbildung funktioniert, käme er prinzipiell in Frage.
2. Die Ausbildung von TNT in Makrophagen wie auch die Übertragung von Lysosomen über diese TNT konnte mehrfach gezeigt werden.^{217,219,227,228}

3. Beobachtungen an TNT und dem LDL-Transfer von MP auf glatte GMZ zeigen sowohl räumliche als auch zeitliche Übereinstimmungen. Anhand von Lebendzellmikroskopie konnten Weinert *et al.* zeigen, dass der Prozess innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden abläuft.²⁶
4. Andere bereits diskutierte Transportmechanismen sind aufgrund fehlender Größenkapazität oder fehlendem Nachweis in den untersuchten Zellarten ausgeschlossen oder sehr unwahrscheinlich.

Die Aufschlüsselung des Transportmechanismus birgt ein enormes klinisches Potential. Kürzlich konnte *in vivo* und *in vitro* ein kausaler Therapieansatz für die Cystinose, eine genetisch bedingte lysosomale Speicherkrankheit, demonstriert werden. Cystinosin fungiert als Transmembranprotein, welches Cystin aus Lysosomen heraus transportiert. Über einen TNT-vermittelten bidirektionalen Transport von Lysosomen zwischen MP und Fibroblasten wurden nicht nur Cystin-beladene Lysosomen durch MP abtransportiert, sondern auch Cystinosin-defiziente Fibroblasten mit dem Transportprotein versorgt.²¹⁹

Ähnliche Mechanismen sind prinzipiell auch im Kontext der Atherosklerose denkbar. Da die Atherogenese einen zumindest teilweise reversiblen Vorgang darstellt,⁴⁴ könnten native MP über die Entfernung von LDL direkt aus Schaumzellen und das anschließende Verlassen der Plaque ähnlich wie bei der Efferozytose zur Regression der Erkrankung beitragen. Umgekehrt kann über die Manipulation von MP und das Ausnutzen von Vesikeln womöglich ein zielgerichteter Transport von Medikamenten in den Ort der Entzündung erreicht werden, wobei die Anwendung nicht auf die Atherosklerose beschränkt sein muss. Stellt der LDL-Transfer von MP auf glatte GMZ, wie bereits postuliert, in der Summe einen proinflammatorischen Prozess dar, so ließe sich durch zielgerichtete Blockade des Transportmechanismus möglicherweise ein Progress der Erkrankung hemmen. Hierbei sollte das Augenmerk auf Parallelen zu anderen, zunächst entfernt scheinenden Forschungsgebieten gelegt werden. Es ist nicht abwegig, modifiziertes LDL als pathologisches Agens zu betrachten, lassen sich doch diverse Überschneidungen feststellen. LDL ist kein Bakterium, kann jedoch PAMPs ähneln und eine Immunreaktion auslösen oder, ebenso wie bakterielle Antigene, über *pattern-recognition*-Rezeptoren von MP phagozytiert werden. Wie Prionen stellt LDL eine körpereigene Struktur dar, welche durch Modifikation pathogene Eigenschaften entwickelt. Ähnlich den Viren verändert eine Akkumulation von LDL innerhalb der „Wirtszelle“ deren Eigenschaften und Genexpression. Schließlich ist modifiziertes LDL wie ein infektiöses Pathogen von einer Zelle auf eine andere Zelle übertragbar.

Bestätigt sich die Vermutung, dass *tunneling nanotubes* für den LDL-Transfer von MP auf glatte GMZ verantwortlich sind, so könnte die Antwort auf die Frage nach der Regression der Plaque und der Eindämmung der Ausbreitung bestimmter Viren, Bakterien oder Prionen womöglich ein und dieselbe sein.

6.5. Fehlerbetrachtung, Vergleichbarkeit der Ergebnisse und Anwendbarkeit der Methode

6.5.1. Zellkultur

Trotz der Plausibilität und Reproduzierbarkeit der hier dargestellten Ergebnisse muss beachtet werden, dass es sich um Untersuchungen *in vitro* handelt. Eine entsprechende Interaktion von MP und glatten GMZ *in vivo* ist zwar anzunehmen, ein unmittelbarer Nachweis steht allerdings derzeit noch aus.

Ein guter Überblick über gängige Kokulturmodelle in der Atheroskleroseforschung stammt von Zuniga *et al.*²²⁹ Das für diese Studie gewählte direkte Zellkulturmodell eignete sich dabei am besten für die behandelte Fragestellung. Der Einsatz von konditioniertem Medium oder *transwell*-Systemen kam nicht in Frage, da Weinert *et al.* bereits gezeigt hatten, dass für den lysosomalen LDL-Transport ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwingend notwendig ist. Das Durchführen der Experimente an 3D-Modellen, wie z. B. Kollagen- und Fibringelen, ist durchaus denkbar, allerdings deutlich aufwendiger. Neben technischen Herausforderungen in der Generierung und Auswertung dreidimensionaler Bildaufnahmen wäre es eventuell möglich sehr dünne gefärbte Schnitte im Sinne einer Immunhistologie anzufertigen. Hierdurch würde jedoch vermutlich ein Großteil des AcLDL herausgewaschen werden. Mit Blick auf die Fragestellung ergäbe sich vermutlich kein relevanter Erkenntnisgewinn, welcher den Mehraufwand rechtfertigen würde.

Zu beachten ist, dass aufgrund der beschriebenen Probleme bei der Färbung der humanen GMZ die Normoxie/Hypoxie-Experimente mit xenogenen Kokulturen aus glatten GMZ der GFP-Maus und humanen MP durchgeführt wurden. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, inwieweit die Ergebnisse einer solchen xenogenen Kokultur auf mögliche Pathomechanismen beim Menschen übertragen werden können. So besteht zum Beispiel auf Ebene der Transkription nur eine Übereinstimmung von etwa 50% zwischen murinen und humanen Makrophagen.²³⁰ Da bei den eigenen Untersuchungen der LDL-Transfer von humanen MP auf glatte GMZ der Ratte, der Maus und des Menschen beobachtet wurde und bereits Weinert *et al.* den *proof of principle* an diesen drei Spezies erbracht haben, scheint es sich hierbei vielmehr um eine konservierte Eigenschaft der Makrophagen in der Interaktion mit anderen Zellarten zu handeln. Inwiefern sich die Übertragung von LDL auf glatte GMZ ungerichtet vollzieht oder einem speziellen Regulationsmechanismus unterliegt,

kann an dieser Stelle nicht zuverlässig eingeschätzt werden. Weinert *et al.* konnten jedoch in weiterführenden, bislang unveröffentlichten Experimenten zeigen, dass AcLDL zudem von MP auf Endothelzellen übertragen wird.

Für die Erhebung der hier dargestellten Ergebnisse kamen keine speziell stimulierten MP zum Einsatz, da es an dieser Stelle vornehmlich um den Nachweis eines allgemeinen Phänomens ging. Die isolierten Monozyten differenzierten sich demzufolge in Kultur lediglich durch autokrine und parakrine Stimulation. Ähnlich dem *community effect* in der Entwicklungsbiologie ist hierbei eine gewisse Zelldichte von Nöten.²³¹ Die Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaque ist bei weitem komplexer und geht auch über das Konzept der M1 und M2 Makrophagen hinaus.²³² Sowohl der Einsatz speziell differenzierter MP-Subpopulationen als auch der Einfluss weiterer Zellarten wie zum Beispiel Endothelzellen oder T-Zellen könnten daher abweichende Ergebnisse liefern. Untersuchungen hierzu liegen nicht vor.

Mit Blick auf den für die Durchführbarkeit der Experimente notwendigen Einsatz des zytotoxischen Proliferationsinhibitors MMC ist kritisch zu anzumerken, dass es zu einer Änderung der zellulären Physiologie, teils aber auch zur Zellschädigung bzw. einem Absterben von GMZ kommt. Allerdings wurden etablierte Protokolle eingesetzt und sowohl Hypoxie- als auch Normoxiekontrollen identisch behandelt. Statt der Verwendung von MMC wäre prinzipiell auch eine Bestrahlung zur Störung der Zellproliferation möglich gewesen, hätte jedoch ähnliche Probleme hervorgerufen.

Darüber hinaus führt auch die Hypoxie zu mannigfaltigen Veränderungen auf Transkriptionsebene,²³³ bis hin zum Zelltod durch Apoptose oder Nekrose.²³⁴ Aus diesem Grund wurde die Untersuchungsdauer auf 10 Tage begrenzt und ein Sauerstoffgehalt von 1,5 bis 2% (v/v) gewählt. Eine restriktivere Sauerstoffzufuhr im Rahmen der Normoxie/Hypoxie-Experimente wäre zwar prinzipiell möglich gewesen, hätte jedoch durch ein vermehrtes Absterben insbesondere von GMZ zu verfälschten Ergebnissen führen können.

Abweichungen in der angestrebten Zusammensetzung der Kokulturen im Verhältnis 1:1 sowie der Gesamtzellzahl der Zellen sind einerseits durch den Verlust von Zellen über die Inkubationsdauer hinweg und andererseits durch technische Limitationen, wie beispielsweise geringfügige Variationen beim manuellen Auszählen der Zellen sowie einer nicht immer in gleichem Maße homogenen Aussaat, geschuldet. Trotz dieser Quellen von Variabilität ließen sich die Experimente und Ergebnisse im Verlauf der Studie sicher reproduzieren und lieferten plausible Ergebnisse.

6.5.2. Bildsegmentierung mit dem *CellProfiler*

Bei der automatischen Bildsegmentierung mit dem CP anhand eines vorher festgelegten Arbeitsablaufes (*pipeline*) wurden mittels komplexer mathematischer Algorithmen und manuell festgelegter Schwellenwerte die Bilddaten segmentiert, Objekte definiert, vermessen und schließlich in ein zur manuellen Nachkontrolle geeignetes RGB-Bild umgewandelt. Sowohl durch die mathematischen Operationen als auch die vorab individuell einzustellenden Parameter kann es hierbei zu Fehlern in der Bildsegmentierung kommen.

Durch den verwendeten *blur*-Filter sind unscharfe Bilder vorab von der Analyse ausgeschlossen worden, doch konnte es dennoch in Abhängigkeit der gewählten Parameter zur Segmentierung und weiteren Verarbeitung von *out-of-focus*-Aufnahmen kommen. Ein strikteres Festlegen der Einstellungen hätte ein sicheres Filtern entsprechender Bilder gewährleistet, jedoch auch zu einem Verlust qualitativ ausreichender Aufnahmen mit potentiellen *events* führen können.

Proben, welche zu schwach belichtet oder ungenügend gefärbt wurden, können sehr schwach fluoreszierende glatte Gefäßmuskelzellkerne enthalten. Wurde die kritische Kombination aus Größe und Intensität unterschritten, so wurden diese Nuklei nicht erkannt und im Folgenden auch nicht beachtet. Weiterhin sind aggregierte Makrophagen gelegentlich als einzelne GMZ erkannt worden, da die Objektrennung lediglich anhand eines vorab festgelegten Schwellenwertes in Kombination mit Größenfiltern vorgenommen worden ist. Aufgrund der phänotypischen Eigenheiten der murinen GMZ-Nuklei (variierende Größe und intensive Granulierung) war der Einsatz spezifischer Segmentierungsmechanismen, wie z. B. einem *watershed*-Filter, nicht möglich. Selten wurden am Bildrand angeschnittene Gefäßmuskelzellkerne aufgrund der geringeren Größe als MP erkannt. Ein Vernachlässigen am Rand lokalisierter Objekte wäre zwar prinzipiell möglich gewesen, hätte jedoch auch den Ausschluss vieler AcLDL-positiver glatter GMZ zur Folge gehabt

Weiterhin sind an dieser Stelle Fehler in der Objekterkennung aufgrund der manuellen Schwellenwertsetzung zu erwähnen. Abbildung 8 und Abbildung 9 (5.2.1) zeigen die Kernsegmentierung und damit verbundene Fehlerquoten im Rahmen der Kontrollexperimente. Hier wurden bis zu 97% der glatten GMZ-Kerne korrekt erkannt. Da die Fehler jedoch in allen Proben gleichermaßen auftreten, wären selbst weitaus schlechtere Ergebnisse akzeptabel. Unberücksichtigt blieben dabei schwach gefärbte GMZ-Kerne, welche beim entsprechenden Schwellenwert gar nicht erst als Objekt erkannt wurden

Abbildung 8 verdeutlicht jedoch auch die Möglichkeiten, welche sich durch eine Manipulation des Schwellenwertes bieten. In der bearbeiteten Fragestellung lag die Priorität auf dem Detektieren AcLDL-positiver glatter GMZ. Da dies bei 10 Tagen Kokulturdauer, einer dünnen Aussaat und dem gewählten Verhältnis von 1:1 jedoch ein verhältnismäßig seltenes Ereignis

darstellt, war es wichtig, möglichst alle GMZ korrekt zu segmentieren. Die ungefähre Anzahl der MP hingegen waren lediglich im Rahmen der Qualitätskontrolle von Interesse. Eine höhere Rate an falsch segmentierten MP zugunsten der GMZ kann also prinzipiell akzeptiert werden und hat durch das Volumen der Experimente einen vernachlässigbaren Effekt auf die Gesamtstatistik. Ein Favorisieren der GMZ war explizit gewünscht.

Bei allen genannten Fehlerquellen handelt es sich um systematische Fehler, welche sowohl in den Experimenten als auch den Kontrollen gleichermaßen auftreten. Da eine große Anzahl von Aufnahmen verarbeitet wurde, es sich um gepaarte relative Vergleiche handelt und eine Diskriminierung zu Negativkontrollen erfolgt, ist nicht davon auszugehen, dass es durch diese potentiellen Einflüsse zu einer relevanten Verfälschung der Ergebnisse gekommen ist.

6.5.3. Manuelle Nachkontrolle

Da eine absolut fehlerfreie vollautomatische Auswertung der Experimente mit der entwickelten CP *pipeline* nicht implementiert werden konnte, wurde eine manuelle Nachkontrolle im Anschluss an die vorherige Prozessierung und Reduktion des Datenvolumens durchgeführt. Obwohl die menschliche Leistungsfähigkeit bei der Beurteilung hoch komplexer und stark variabler biologischer Aufnahmen der eines Computers derzeit noch überlegen ist, fanden sich auch hier potentielle Fehlerquellen. Zum einen erfolgte die Kontrolle der Funktionalität der *pipeline* und der angewandten Schwellenwerte in Form von Stichproben, wodurch zum Beispiel qualitativ unzureichende Aufnahmen übersehen wurden. Zum anderen können insbesondere an schwierigen Aufnahmen Fehler beim Auszählen der AcLDL-positiven GMZ auftreten. Auch eine gewisse Variabilität bei Auswertungen durch verschiedene Untersucher ist möglich. Wenngleich es für die hier vorgelegte Studie keine Rolle spielt, da sowohl die Entwicklung bzw. Weiterentwicklung der Methoden zur semiautomatischen Auswertung, als auch die Durchführung sämtlicher Experimente einschließlich der manuellen Nachkontrolle im Wesentlichen durch eine Person erfolgten, ist dies im Falle der weiteren Verwendung dieser oder ähnlicher Auswertroutinen als möglicher Faktor zu berücksichtigen. Gleichzeitig kann dieser Problematik durch eine ausreichende Erprobung, Validierung und Reproduzierbarkeit der *pipeline* anhand einer Vielzahl zufälliger und von verschiedenen Proben stammender Aufnahmen sowie eine hohe Konsistenz und Qualität bei der Ausführung der Experimente und Anfertigung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen begegnet werden.

7. Zusammenfassung

Die Atherosklerose stellt eine chronisch entzündliche Erkrankung der Blutgefäße dar, welche mit einer beträchtlichen Morbidität und Mortalität verbunden ist. In atherosklerotischen Plaques lassen sich diverse Zelltypen nachweisen, welche untereinander und mit modifiziertem LDL interagieren und an pro- sowie antiinflammatorischen Prozessen beteiligt sind. MP und glatte GMZ nehmen hierbei eine zentrale Rolle ein. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer Methode zur Untersuchung des lysosomalen LDL-Transfers von MP auf glatte GMZ unter hypoxischen Bedingungen anhand einer Vielzahl fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen. Glatte GMZ der GFP-Maus wurden für 10 Tage mit MP kokultiviert, die mit Alexa Fluor 594-konjugiertem acetylierten LDL beladen waren. Anschließend wurden die Proben fixiert und gefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte anhand vordefinierter Bildpunkte und mithilfe eines automatisierten Mikroskops. Zur Auswertung der Daten wurde ein eigener Algorithmus (*pipeline*) für das *open-source*-Programm *CellProfiler* entwickelt. Nach manueller Festlegung des Schwellenwertes zur Binärisierung wurden MP und GMZ anhand der Zellkernmorphologie unterschieden. Über verschiedene Filterschritte wurden jene GMZ detektiert, welche intrazelluläres AcLDL enthielten und die entsprechenden Aufnahme unter Hervorhebung der für die Auswertung relevanten Merkmale als RGB-Bild zur manuellen Nachkontrolle exportiert. Die Arbeitserleichterung ist dank automatisierter Prozessierung und Aufbereitung der Bilddaten bei gleichzeitig hoher Objektivität, Validität und Reproduzierbarkeit erheblich. Bei der Auswertung komplexer fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen ist sowohl die Nutzung von *open-source*-Programmen als auch die kombinierte Herangehensweise mit semiautomatischer Bildsegmentierung und manueller Nachkontrolle anderen Verfahren überlegen. Sowohl die Autofluoreszenz in GMZ als auch der lipophile Charakter des LDL stellten große Herausforderungen in der Anfertigung immunzytochemischer Färbungen und der Fluoreszenzmikroskopie zur Bearbeitung der Fragestellungen dar. Es konnte gezeigt werden, dass auch unter hypoxischen Bedingungen ein Transport von Lipid-geladenen Lysosomen aus MP in glatte GMZ stattfindet. Ein signifikanter Unterschied zwischen den unter Normoxie bzw. Hypoxie kultivierten Proben fand sich nicht. Dieses Erkenntnis stützt die von Weinert *et al.* beschriebene Vermutung, dass MP in der hypoxischen Plaque LDL aktiv auf glatte GMZ transferieren, dadurch eine Schaumzellbildung der GMZ induzieren und zur Plaquestabilisierung beitragen können. Vor diesem Hintergrund verspricht die weitere Untersuchung und Aufklärung des zugrundeliegenden Transportmechanismus im Rahmen der atherosklerotischen Pathogenese großes therapeutisches Potential.

8. Literaturverzeichnis

- (1) Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407(6801):233-41.
- (2) Nabel EG, Braunwald E. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *N Engl J Med* 2012;366(1):54-63.
- (3) Lozano R, Naghavi M, Foreman K et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012;380(9859):2095-128.
- (4) Bonow RO, Smaha LA, Smith SC, Jr., Mensah GA, Lenfant C. World Heart Day 2002: the international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic. *Circulation* 2002;106(13):1602-5.
- (5) Sandison AT. Degenerative vascular disease in the Egyptian mummy. *Med Hist* 1962;6:77-81.
- (6) Gosswald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA. [Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2013;56(5-6):650-5.
- (7) Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2010;121(7):e46-e215.
- (8) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26.
- (9) Grundtman C, Wick G. The autoimmune concept of atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2011;22(5):327-34.
- (10) Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 2011;145(3):341-55.
- (11) Tabas I, Garcia-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol* 2015;209(1):13-22.
- (12) Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(5):551-61.
- (13) Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997;272(34):20963-6.
- (14) Lopes-Virella MF, Virella G. Modified lipoproteins, cytokines and macrovascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Med* 1996;28(4):347-54.
- (15) Khoo JC, Miller E, McLoughlin P, Steinberg D. Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. *Arteriosclerosis* 1988;8(4):348-58.
- (16) Khoo JC, Miller E, Pio F, Steinberg D, Witztum JL. Monoclonal antibodies against LDL further enhance macrophage uptake of LDL aggregates. *Arterioscler Thromb* 1992;12(11):1258-66.

- (17) Hurt E, Camejo G. Effect of arterial proteoglycans on the interaction of LDL with human monocyte-derived macrophages. *Atherosclerosis* 1987;67(2-3):115-26.
- (18) Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(11):2292-301.
- (19) Rolin J, Maghazachi AA. Implications of chemokines, chemokine receptors, and inflammatory lipids in atherosclerosis. *J Leukoc Biol* 2014;95(4):575-85.
- (20) Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell* 2010;140(6):871-82.
- (21) Holman RL, McGill HC, Jr., Strong JP, Geer JC. The natural history of atherosclerosis: the early aortic lesions as seen in New Orleans in the middle of the of the 20th century. *Am J Pathol* 1958;34(2):209-35.
- (22) Robertson WB, Geer JC, Strong JP, McGill HC, Jr. The fate of the fatty streak. *Exp Mol Pathol* 1963;52:Suppl 1 28-39.
- (23) Restrepo C, Tracy RE. Variations in human aortic fatty streaks among geographic locations. *Atherosclerosis* 1975;21(2):179-93.
- (24) Swirski FK, Nahrendorf M. Do vascular smooth muscle cells differentiate to macrophages in atherosclerotic lesions? *Circ Res* 2014;115(7):605-6.
- (25) Feil S, Fehrenbacher B, Lukowski R et al. Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis. *Circ Res* 2014;115(7):662-7.
- (26) Weinert S, Poitz DM, Auffermann-Gretzinger S et al. The lysosomal transfer of LDL/cholesterol from macrophages into vascular smooth muscle cells induces their phenotypic alteration. *Cardiovasc Res* 2013;97(3):544-52.
- (27) Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF et al. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med* 2013;19(9):1166-72.
- (28) Ross R, Wight TN, Strandness E, Thiele B. Human atherosclerosis. I. Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery. *Am J Pathol* 1984;114(1):79-93.
- (29) Virmani R, Burke AP, Kolodgie FD, Farb A. Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol* 2002;15(6):439-46.
- (30) Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(10):1859-67.
- (31) Tabas I. Apoptosis and efferocytosis in mouse models of atherosclerosis. *Curr Drug Targets* 2007;8(12):1288-96.
- (32) Boyle JJ, Weissberg PL, Bennett MR. Tumor necrosis factor-alpha promotes macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis by direct and autocrine mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(9):1553-8.
- (33) Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006;86(2):515-81.

- (34) New SE, Aikawa E. Role of extracellular vesicles in de novo mineralization: an additional novel mechanism of cardiovascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(8):1753-8.
- (35) Demer LL, Tintut Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34(4):715-23.
- (36) Tesaro M, Mauriello A, Rovella V et al. Arterial ageing: from endothelial dysfunction to vascular calcification. *J Intern Med* 2017;281(5):471-82.
- (37) Chen NX, O'Neill KD, Chen X, Moe SM. Annexin-mediated matrix vesicle calcification in vascular smooth muscle cells. *J Bone Miner Res* 2008;23(11):1798-805.
- (38) Sun Y, Byon CH, Yuan K et al. Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification. *Circ Res* 2012;111(5):543-52.
- (39) Farb A, Burke AP, Tang AL et al. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation* 1996;93(7):1354-63.
- (40) Hansson GK, Libby P, Tabas I. Inflammation and plaque vulnerability. *J Intern Med* 2015;278(5):483-93.
- (41) Quillard T, Araujo HA, Franck G, Shvartz E, Sukhova G, Libby P. TLR2 and neutrophils potentiate endothelial stress, apoptosis and detachment: implications for superficial erosion. *Eur Heart J* 2015;36(22):1394-404.
- (42) Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn AV, Virmani R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *Eur Heart J* 2013;34(10):719-28.
- (43) Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol* 2013;13(10):709-21.
- (44) Feig JE, Pineda-Torra I, Sanson M et al. LXR promotes the maximal egress of monocyte-derived cells from mouse aortic plaques during atherosclerosis regression. *J Clin Invest* 2010;120(12):4415-24.
- (45) Potteaux S, Gautier EL, Hutchison SB et al. Suppressed monocyte recruitment drives macrophage removal from atherosclerotic plaques of Apoe^{-/-} mice during disease regression. *J Clin Invest* 2011;121(5):2025-36.
- (46) Liao X, Sluimer JC, Wang Y et al. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis. *Cell Metab* 2012;15(4):545-53.
- (47) Hashimoto SI, Komuro I, Yamada M, Akagawa KS. IL-10 inhibits granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent human monocyte survival at the early stage of the culture and inhibits the generation of macrophages. *J Immunol* 2001;167(7):3619-25.
- (48) Waldo SW, Li Y, Buono C et al. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 2008;172(4):1112-26.
- (49) Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003;19(1):71-82.

- (50) Nahrendorf M, Swirski FK. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circ Res* 2013;112(12):1624-33.
- (51) Chinetti-Gbaguidi G, Baron M, Bouhlef MA et al. Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARgamma and LXRA pathways. *Circ Res* 2011;108(8):985-95.
- (52) Kadl A, Meher AK, Sharma PR et al. Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res* 2010;107(6):737-46.
- (53) Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R, Clark S, Libby P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(2):402-6.
- (54) Gough PJ, Gomez IG, Wille PT, Raines EW. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2006;116(1):59-69.
- (55) Clarke MC, Figg N, Maguire JJ et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med* 2006;12(9):1075-80.
- (56) Clarke MC, Littlewood TD, Figg N et al. Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circ Res* 2008;102(12):1529-38.
- (57) New SE, Goettsch C, Aikawa M et al. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 2013;113(1):72-7.
- (58) Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2012;95(2):156-64.
- (59) Reidy MA, Irvin C, Lindner V. Migration of arterial wall cells. Expression of plasminogen activators and inhibitors in injured rat arteries. *Circ Res* 1996;78(3):405-14.
- (60) Chamley JH, Campbell GR, McConnell JD, Groschel-Stewart U. Comparison of vascular smooth muscle cells from adult human, monkey and rabbit in primary culture and in subculture. *Cell Tissue Res* 1977;177(4):503-22.
- (61) Chamley-Campbell JH, Campbell GR. What controls smooth muscle phenotype? *Atherosclerosis* 1981;40(3-4):347-57.
- (62) Campbell GR, Campbell JH. The phenotypes of smooth muscle expressed in human atheroma. *Ann N Y Acad Sci* 1990;598:143-58.
- (63) Thyberg J, Blomgren K, Hedin U, Dryjski M. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. *Cell Tissue Res* 1995;281(3):421-33.
- (64) Ang AH, Tachas G, Campbell JH, Bateman JF, Campbell GR. Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth-muscle cells. Alteration with phenotype. *Biochem J* 1990;265(2):461-9.

- (65) Worth NF, Rolfe BE, Song J, Campbell GR. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 2001;49(3):130-45.
- (66) Li L, Miano JM, Cserjesi P, Olson EN. SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ Res* 1996;78(2):188-95.
- (67) Madsen CS, Regan CP, Hungerford JE, White SL, Manabe I, Owens GK. Smooth muscle-specific expression of the smooth muscle myosin heavy chain gene in transgenic mice requires 5'-flanking and first intronic DNA sequence. *Circ Res* 1998;82(8):908-17.
- (68) Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(23):13531-6.
- (69) Tang Z, Wang A, Yuan F et al. Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases. *Nat Commun* 2012;3:875.
- (70) Nguyen AT, Gomez D, Bell RD et al. Smooth muscle cell plasticity: fact or fiction? *Circ Res* 2013;112(1):17-22.
- (71) Onat D, Brillon D, Colombo PC, Schmidt AM. Human vascular endothelial cells: a model system for studying vascular inflammation in diabetes and atherosclerosis. *Curr Diab Rep* 2011;11(3):193-202.
- (72) de Agostini AI, Watkins SC, Slayter HS, Youssoufian H, Rosenberg RD. Localization of anticoagulant active heparan sulfate proteoglycans in vascular endothelium: antithrombin binding on cultured endothelial cells and perfused rat aorta. *J Cell Biol* 1990;111(3):1293-304.
- (73) van Hinsbergh VW. Endothelial permeability for macromolecules. Mechanistic aspects of pathophysiological modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(6):1018-23.
- (74) Clifford PS. Local control of blood flow. *Adv Physiol Educ* 2011;35(1):5-15.
- (75) Durand MJ, Gutterman DD. Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. *Microcirculation* 2013;20(3):239-47.
- (76) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332(6163):411-5.
- (77) Gimbrone MA, Jr., Buchanan MR. Interactions of platelets and leukocytes with vascular endothelium: in vitro studies. *Ann N Y Acad Sci* 1982;401:171-83.
- (78) Berliner JA, Territo MC, Sevanian A et al. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* 1990;85(4):1260-6.
- (79) Chappell DC, Varner SE, Nerem RM, Medford RM, Alexander RW. Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circ Res* 1998;82(5):532-9.
- (80) Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007;7(9):678-89.

- (81) Dietel B, Cicha I, Voskens CJ, Verhoeven E, Achenbach S, Garlichs CD. Decreased numbers of regulatory T cells are associated with human atherosclerotic lesion vulnerability and inversely correlate with infiltrated mature dendritic cells. *Atherosclerosis* 2013;230(1):92-9.
- (82) Zhu SN, Chen M, Jongstra-Bilen J, Cybulsky MI. GM-CSF regulates intimal cell proliferation in nascent atherosclerotic lesions. *J Exp Med* 2009;206(10):2141-9.
- (83) Choi JH, Cheong C, Dandamudi DB et al. Flt3 signaling-dependent dendritic cells protect against atherosclerosis. *Immunity* 2011;35(5):819-31.
- (84) Koltsova EK, Garcia Z, Chodaczek G et al. Dynamic T cell-APC interactions sustain chronic inflammation in atherosclerosis. *J Clin Invest* 2012;122(9):3114-26.
- (85) Ammirati E, Moroni F, Magnoni M, Camici PG. The role of T and B cells in human atherosclerosis and atherothrombosis. *Clin Exp Immunol* 2015;179(2):173-87.
- (86) Mallat Z, Taleb S, Ait-Oufella H, Tedgui A. The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S364-S369.
- (87) Hermansson A, Ketelhuth DF, Strodtzoff D et al. Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis. *J Exp Med* 2010;207(5):1081-93.
- (88) Lahoute C, Herbin O, Mallat Z, Tedgui A. Adaptive immunity in atherosclerosis: mechanisms and future therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol* 2011;8(6):348-58.
- (89) Canducci F, Saita D, Foglieni C et al. Cross-reacting antibacterial auto-antibodies are produced within coronary atherosclerotic plaques of acute coronary syndrome patients. *PLoS One* 2012;7(8):e42283.
- (90) Houtkamp MA, de Boer OJ, van der Loos CM, van der Wal AC, Becker AE. Adventitial infiltrates associated with advanced atherosclerotic plaques: structural organization suggests generation of local humoral immune responses. *J Pathol* 2001;193(2):263-9.
- (91) Miller YI, Choi SH, Wiesner P et al. Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circ Res* 2011;108(2):235-48.
- (92) Tsiantoulas D, Diehl CJ, Witztum JL, Binder CJ. B cells and humoral immunity in atherosclerosis. *Circ Res* 2014;114(11):1743-56.
- (93) Martin F, Kearney JF. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2001;13(2):195-201.
- (94) Kyaw T, Tipping P, Toh BH, Bobik A. Current understanding of the role of B cell subsets and intimal and adventitial B cells in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2011;22(5):373-9.
- (95) Drechsler M, Megens RT, van ZM, Weber C, Soehnlein O. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation* 2010;122(18):1837-45.
- (96) Kaartinen M, Penttila A, Kovanen PT. Mast cells of two types differing in neutral protease composition in the human aortic intima. Demonstration of tryptase- and tryptase/chymase-containing mast cells in normal intimas, fatty streaks, and the shoulder region of atheromas. *Arterioscler Thromb* 1994;14(6):966-72.

- (97) Sun J, Sukhova GK, Wolters PJ et al. Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. *Nat Med* 2007;13(6):719-24.
- (98) Huo Y, Schober A, Forlow SB et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med* 2003;9(1):61-7.
- (99) Drager LF, Polotsky VY, Lorenzi-Filho G. Obstructive sleep apnea: an emerging risk factor for atherosclerosis. *Chest* 2011;140(2):534-42.
- (100) Yamauchi M, Kimura H. Oxidative stress in obstructive sleep apnea: putative pathways to the cardiovascular complications. *Antioxid Redox Signal* 2008;10(4):755-68.
- (101) Nakano D, Hayashi T, Tazawa N et al. Chronic hypoxia accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Hypertens Res* 2005;28(10):837-45.
- (102) Buchner NJ, Quack I, Woznowski M, Stahle C, Wenzel U, Rump LC. Microvascular endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea is caused by oxidative stress and improved by continuous positive airway pressure therapy. *Respiration* 2011;82(5):409-17.
- (103) Drager LF, Bortolotto LA, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi GF. Effects of continuous positive airway pressure on early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176(7):706-12.
- (104) Kudchodkar B, Jones H, Simecka J, Dory L. Hyperbaric oxygen treatment attenuates the pro-inflammatory and immune responses in apolipoprotein E knockout mice. *Clin Immunol* 2008;128(3):435-41.
- (105) Karadurmus N, Sahin M, Tasci C et al. Potential benefits of hyperbaric oxygen therapy on atherosclerosis and glycaemic control in patients with diabetic foot. *Endokrynol Pol* 2010;61(3):275-9.
- (106) Sluimer JC, Gasc JM, van Wanroij JL et al. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J Am Coll Cardiol* 2008;51(13):1258-65.
- (107) Silvola JM, Saraste A, Forsback S et al. Detection of hypoxia by [18F]EF5 in atherosclerotic plaques in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(5):1011-5.
- (108) Ramkhelawon B, Yang Y, van Gils JM et al. Hypoxia induces netrin-1 and Unc5b in atherosclerotic plaques: mechanism for macrophage retention and survival. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(6):1180-8.
- (109) Shantha GP, Wasserman B, Astor BC et al. Association of blood lactate with carotid atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Carotid MRI Study. *Atherosclerosis* 2013;228(1):249-55.
- (110) Oorni K, Kovanen PT. Enhanced extracellular lipid accumulation in acidic environments. *Curr Opin Lipidol* 2006;17(5):534-40.
- (111) Khazaei M, Nematbakhsh M. Effect of experimentally induced metabolic acidosis on aortic endothelial permeability and serum nitric oxide concentration in normal and high-cholesterol fed rabbits. *Arch Med Sci* 2012;8(4):719-23.

- (112) Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009;417(1):1-13.
- (113) Violi F, Basili S, Nigro C, Pignatelli P. Role of NADPH oxidase in atherosclerosis. *Future Cardiol* 2009;5(1):83-92.
- (114) Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol* 2009;50(5):402-9.
- (115) Tavakoli S, Asmis R. Reactive oxygen species and thiol redox signaling in the macrophage biology of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2012;17(12):1785-95.
- (116) Marsch E, Sluimer JC, Daemen MJ. Hypoxia in atherosclerosis and inflammation. *Curr Opin Lipidol* 2013;24(5):393-400.
- (117) Harries ML, Lam S, MacAulay C, Qu J, Palcic B. Diagnostic imaging of the larynx: autofluorescence of laryngeal tumours using the helium-cadmium laser. *J Laryngol Otol* 1995;109(2):108-10.
- (118) Aubin JE. Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J Histochem Cytochem* 1979;27(1):36-43.
- (119) Yin D. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic Biol Med* 1996;21(6):871-88.
- (120) Bissonnette R, Zeng H, McLean DI, Schreiber WE, Roscoe DL, Lui H. Psoriatic plaques exhibit red autofluorescence that is due to protoporphyrin IX. *J Invest Dermatol* 1998;111(4):586-91.
- (121) Fitzmaurice M, Bordagaray JO, Engelmann GL et al. Argon ion laser-excited autofluorescence in normal and atherosclerotic aorta and coronary arteries: morphologic studies. *Am Heart J* 1989;118(5 Pt 1):1028-38.
- (122) Collins, TJ. Autofluorescence: Causes and Cures. <http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/PDF/Autofluorescence.pdf>
Stand: 13.1.2005 (abgerufen am 27.1.2011): 1-8.
- (123) Udenfriend S. *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*. Academic Press; 1969; 291-331.
- (124) Billinton N, Knight AW. Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal Biochem* 2001;291(2):175-97.
- (125) Rost FWD. *Fluorescence Microscopy*. Cambridge University Press; 1992; 33-34.
- (126) Staughton TJ, McGillicuddy CJ, Weinberg PD. Techniques for reducing the interfering effects of autofluorescence in fluorescence microscopy: improved detection of sulphorhodamine B-labelled albumin in arterial tissue. *J Microsc* 2001;201(Pt 1):70-6.
- (127) Beisker W, Dolbeare F, Gray JW. An improved immunocytochemical procedure for high-sensitivity detection of incorporated bromodeoxyuridine. *Cytometry* 1987;8(2):235-9.

- (128) Clancy B, Cauller LJ. Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion in sodium borohydride. *J Neurosci Methods* 1998;83(2):97-102.
- (129) Neumann M, Gabel D. Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem* 2002;50(3):437-9.
- (130) Viegas MS, Martins TC, Seco F, do Carmo A. An improved and cost-effective methodology for the reduction of autofluorescence in direct immunofluorescence studies on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Eur J Histochem* 2007;51(1):59-66.
- (131) Knight AW, Goddard NJ, Billinton N, Cahill PA, Walmsley RM. Fluorescence polarization discriminates green fluorescent protein from interfering autofluorescence in a microplate assay for genotoxicity. *J Biochem Biophys Methods* 2002;51(2):165-77.
- (132) Haralick RM, Shapiro LG. Image Segmentation Techniques. *Comput Vision Graph* 1985;29(1):100-32.
- (133) Pham DL, Xu C, Prince JL. Current methods in medical image segmentation. *Annu Rev Biomed Eng* 2000;2:315-37.
- (134) Phellan R, Falcao AX, Udupa JK. Medical image segmentation via atlases and fuzzy object models: Improving efficacy through optimum object search and fewer models. *Med Phys* 2016;43(1):401.
- (135) John NM, Kabuka MR, Ibrahim MO. Multivariate statistical model for 3D image segmentation with application to medical images. *J Digit Imaging* 2003;16(4):365-77.
- (136) Zhao Y, Gong L, Huang Y, Liu C. Robust Tomato Recognition for Robotic Harvesting Using Feature Images Fusion. *Sensors (Basel)* 2016;16(2).
- (137) Salzenstein F, Collet C. Fuzzy Markov random fields versus chains for multispectral image segmentation. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* 2006;28(11):1753-67.
- (138) Chen S, Zhao M, Wu G, Yao C, Zhang J. Recent advances in morphological cell image analysis. *Comput Math Methods Med* 2012;2012:101536.
- (139) Uchida S. Image processing and recognition for biological images. *Dev Growth Differ* 2013;55(4):523-49.
- (140) Shamir L, Orlov N, Eckley DM, Macura T, Johnston J, Goldberg IG. Wndchrm - an open source utility for biological image analysis. *Source Code Biol Med* 2008;3:13.
- (141) Orlov N, Shamir L, Macura T, Johnston J, Eckley DM, Goldberg IG. WND-CHARM: Multi-purpose image classification using compound image transforms. *Pattern Recognit Lett* 2008;29(11):1684-93.
- (142) Uhlmann V, Singh S, Carpenter AE. CP-CHARM: segmentation-free image classification made accessible. *BMC Bioinformatics* 2016;17(1):51.
- (143) Pal NR, Pal SK. A review on image segmentation techniques. *Pattern Recogn* 1993;26(9):1277-94.
- (144) Sahoo PK, Soltani S, Wong AKC. A survey of thresholding techniques. *Comput Vision Graph* 1988;41(2):233-60.

- (145) Otsu N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE T Syst Man Cyb* 1979;9(1):62-6.
- (146) Beucher S, Lantuejoul C. Use of watersheds in contour detection. International Workshop on image processing: Real-Time Edge and Motion Detection/estimation, Rennes, France. 1979 p. 2.1-2.12.
- (147) Kass M, Witkin A, Terzopoulos D. Snakes: Active contour models. *Int J Comput Vision* 1988;1(4):321-31.
- (148) Mikic I, Krucinski S, Thomas JD. Segmentation and tracking in echocardiographic sequences: active contours guided by optical flow estimates. *IEEE Trans Med Imaging* 1998;17(2):274-84.
- (149) Marsousi M, Alirezaie J, Ahmadian A, Kocharian A. Segmenting echocardiography images using B-Spline snake and active ellipse model. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2010;2010:3125-8.
- (150) Zhu X, Zhang P, Shao J, Cheng Y, Zhang Y, Bai J. A snake-based method for segmentation of intravascular ultrasound images and its in vivo validation. *Ultrasonics* 2011;51(2):181-9.
- (151) Brunenberg E, Pujol O, ter Haar RB, Radeva P. Automatic IVUS segmentation of atherosclerotic plaque with stop & go snake. *Med Image Comput Comput Assist Interv* 2006;9(Pt 2):9-16.
- (152) Yu P, Poh CL. Region-based snake with edge constraint for segmentation of lymph nodes on CT images. *Comput Biol Med* 2015;60:86-91.
- (153) Jiang H, He B, Ma Z, Zong M, Zhou X, Fujita H. Liver segmentation based on Snakes Model and improved GrowCut algorithm in abdominal CT image. *Comput Math Methods Med* 2013;2013:958398.
- (154) Pang Y, Li L, Hu W, Peng Y, Liu L, Shao Y. Computerized segmentation and characterization of breast lesions in dynamic contrast-enhanced MR images using fuzzy c-means clustering and snake algorithm. *Comput Math Methods Med* 2012;2012:634907.
- (155) Liu HT, Sheu TW, Chang HH. Automatic segmentation of brain MR images using an adaptive balloon snake model with fuzzy classification. *Med Biol Eng Comput* 2013;51(10):1091-104.
- (156) Rohlfing T, Russakoff DB, Maurer CR, Jr. Performance-based classifier combination in atlas-based image segmentation using expectation-maximization parameter estimation. *IEEE Trans Med Imaging* 2004;23(8):983-94.
- (157) Sdika M. Enhancing atlas based segmentation with multiclass linear classifiers. *Med Phys* 2015;42(12):7169.
- (158) Hannequin P, Liehn JC, Valeyre J. Cluster analysis for automatic image segmentation in dynamic scintigraphies. *Nucl Med Commun* 1990;11(5):383-93.
- (159) Delso G, Zeimpekis K, Carl M, Wiesinger F, Hullner M, Veit-Haibach P. Cluster-based segmentation of dual-echo ultra-short echo time images for PET/MR bone localization. *EJNMMI Phys* 2014;1(1):7.

- (160) Derin H, Elliott H, Cristi R, Geman D. Bayes smoothing algorithms for segmentation of binary images modeled by markov random fields. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* 1984;6(6):707-20.
- (161) Roy PK, Bhuiyan A, Janke A et al. Automatic white matter lesion segmentation using contrast enhanced FLAIR intensity and Markov Random Field. *Comput Med Imaging Graph* 2015;45:102-11.
- (162) Piraino DW, Amartur SC, Richmond BJ, Schils JP, Thome JM, Weber PB. Segmentation of magnetic resonance images using an artificial neural network. *Proc Annu Symp Comput Appl Med Care* 1991;470-2.
- (163) Sharif MS, Abbod M, Amira A, Zaidi H. Artificial Neural Network-Based System for PET Volume Segmentation. *Int J Biomed Imaging* 2010;2010:4:1-4:11.
- (164) Burger W, Burge MJ. *Digitale Bildverarbeitung. Eine algorithmische Einführung mit Java*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2015; 93-145.
- (165) Fraietta I, Gasparri F. The development of high-content screening (HCS) technology and its importance to drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2016;11(5):501-14.
- (166) National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011; 1-220.
- (167) Beyea MM, Reaume S, Sawyez CG et al. The oxysterol 24(s),25-epoxycholesterol attenuates human smooth muscle-derived foam cell formation via reduced low-density lipoprotein uptake and enhanced cholesterol efflux. *J Am Heart Assoc* 2012;1(3):e000810.
- (168) Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;9(7):671-5.
- (169) Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 2006;7(10):R100.
- (170) Kametsky L, Jones TR, Fraser A et al. Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics* 2011;27(8):1179-80.
- (171) Jamur MC, Oliver C. Permeabilization of cell membranes. *Methods Mol Biol* 2010;588:63-6.
- (172) Potter H, Weir L, Leder P. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(22):7161-5.
- (173) Bao S, Thrall BD, Miller DL. Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound Med Biol* 1997;23(6):953-9.
- (174) Karshafian R, Bevan PD, Williams R, Samac S, Burns PN. Sonoporation by ultrasound-activated microbubble contrast agents: effect of acoustic exposure parameters on cell membrane permeability and cell viability. *Ultrasound Med Biol* 2009;35(5):847-60.

- (175) Silve A, Leray I, Mir LM. Demonstration of cell membrane permeabilization to medium-sized molecules caused by a single 10 ns electric pulse. *Bioelectrochemistry* 2012;87:260-4.
- (176) Tirlapur UK, Konig K. Targeted transfection by femtosecond laser. *Nature* 2002;418(6895):290-1.
- (177) Schomaker M, Heinemann D, Kalies S et al. Characterization of nanoparticle mediated laser transfection by femtosecond laser pulses for applications in molecular medicine. *J Nanobiotechnology* 2015;13:10.
- (178) Werner TC, Bunting JR, Cathou RE. The shape of immunoglobulin G molecules in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972;69(4):795-9.
- (179) de KB, Gerritsen WJ, Oerlemans A, Demel RA, van Deenen LL. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. I. Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics. *Biochim Biophys Acta* 1974;339(1):30-43.
- (180) Yang TS, Ou KL, Peng PW et al. Quantifying membrane permeability of amphotericin B ion channels in single living cells. *Biochim Biophys Acta* 2013;1828(8):1794-801.
- (181) Veerman EC, Valentijn-Benz M, van't Hof W, Nazmi K, van MJ, Amerongen AV. Phytosphingosine kills *Candida albicans* by disrupting its cell membrane. *Biol Chem* 2010;391(1):65-71.
- (182) Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 1990;346(6287):818-22.
- (183) Ries J, Kaplan C, Platonova E, Eghlidi H, Ewers H. A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nat Methods* 2012;9(6):582-4.
- (184) Opazo F, Levy M, Byrom M et al. Aptamers as potential tools for super-resolution microscopy. *Nat Methods* 2012;9(10):938-9.
- (185) de Castro MA, Rammner B, Opazo F. Aptamer Stainings for Super-resolution Microscopy. *Methods Mol Biol* 2016;1380:197-210.
- (186) Donovan RM, Goldstein E. A charge coupled device-based image cytophotometry system for quantitative histochemistry and cytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1985;33(6):551-6.
- (187) Donovan RM, Goldstein E, Kim Y, Lippert W, Cheung AT, Miller ME. A quantitative method for the analysis of cell shape and locomotion. *Histochemistry* 1986;84(4-6):525-9.
- (188) Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990;10(2):290-3.
- (189) Taylor DL. A personal perspective on high-content screening (HCS): from the beginning. *J Biomol Screen* 2010;15(7):720-5.
- (190) Boutros M, Heigwer F, Laufer C. Microscopy-Based High-Content Screening. *Cell* 2015;163(6):1314-25.

- (191) Mattiazzi UM, Styles EB, Verster AJ, Friesen H, Boone C, Andrews BJ. High-Content Screening for Quantitative Cell Biology. *Trends Cell Biol* 2016;26(8):598-611.
- (192) Giuliano KA, Taylor DL. Fluorescent-protein biosensors: new tools for drug discovery. *Trends Biotechnol* 1998;16(3):135-40.
- (193) Prevel C, Pellerano M, Van TN, Morris MC. Fluorescent biosensors for high throughput screening of protein kinase inhibitors. *Biotechnol J* 2014;9(2):253-65.
- (194) Gonzalez JE, Romero I, Barquinero JF, Garcia O. Automatic analysis of silver-stained comets by CellProfiler software. *Mutat Res* 2012;748(1-2):60-4.
- (195) Osaka I, Hills JM, Kieweg SL, Shinogle HE, Moore DS, Hefty PS. An automated image-based method for rapid analysis of Chlamydia infection as a tool for screening antichlamydial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(8):4184-8.
- (196) Moy TI, Conery AL, Larkins-Ford J et al. High-throughput screen for novel antimicrobials using a whole animal infection model. *ACS Chem Biol* 2009;4(7):527-33.
- (197) Boutter J, Huang Y, Marovca B et al. Image-based RNA interference screening reveals an individual dependence of acute lymphoblastic leukemia on stromal cysteine support. *Oncotarget* 2014;5(22):11501-12.
- (198) Reyes-Aldasoro CC, Williams LJ, Akerman S, Kanthou C, Tozer GM. An automatic algorithm for the segmentation and morphological analysis of microvessels in immunostained histological tumour sections. *J Microsc* 2011;242(3):262-78.
- (199) Meyvantsson I, Vu E, Lamers C et al. Image-based analysis of primary human neutrophil chemotaxis in an automated direct-viewing assay. *J Immunol Methods* 2011;374(1-2):70-7.
- (200) Jones TR, Kang IH, Wheeler DB et al. CellProfiler Analyst: data exploration and analysis software for complex image-based screens. *BMC Bioinformatics* 2008;9:482.
- (201) Ratib O, Rosset A, Heuberger J. Open Source software and social networks: disruptive alternatives for medical imaging. *Eur J Radiol* 2011;78(2):259-65.
- (202) Eliceiri KW, Berthold MR, Goldberg IG et al. Biological imaging software tools. *Nat Methods* 2012;9(7):697-710.
- (203) Valeri G, Mazza FA, Maggi S et al. Open source software in a practical approach for post processing of radiologic images. *Radiol Med* 2015;120(3):309-23.
- (204) Pathak J, Bailey KR, Beebe CE et al. Normalization and standardization of electronic health records for high-throughput phenotyping: the SHARPN consortium. *J Am Med Inform Assoc* 2013;20(e2):e341-e348.
- (205) van DJ, Musuku J, Zuhlke LJ et al. An open-access, mobile compatible, electronic patient register for rheumatic heart disease ('eRegister') based on the World Heart Federation's framework for patient registers. *Cardiovasc J Afr* 2015;26:1-7.
- (206) Spat S, Holl B, Petritsch G, Schaupp L, Beck P, Pieber TR. Automatic system testing of a decision support system for insulin dosing using Google Android. *Stud Health Technol Inform* 2013;186:187-91.

- (207) Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;76(2):241-51.
- (208) Phelan P, Starich TA. Innexins get into the gap. *Bioessays* 2001;23(5):388-96.
- (209) Davis DM, Dustin ML. What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol* 2004;25(6):323-7.
- (210) van der Sluijs P, Zibouche M, van KP. Late steps in secretory lysosome exocytosis in cytotoxic lymphocytes. *Front Immunol* 2013;4:359.
- (211) Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 2004;303(5660):1007-10.
- (212) Bukoreshtliev NV, Wang X, Hodneland E, Gurke S, Barroso JF, Gerdes HH. Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. *FEBS Lett* 2009;583(9):1481-8.
- (213) Sisakhtnezhad S, Khosravi L. Emerging physiological and pathological implications of tunneling nanotubes formation between cells. *Eur J Cell Biol* 2015;94(10):429-43.
- (214) Domhan S, Ma L, Tai A et al. Intercellular communication by exchange of cytoplasmic material via tunneling nano-tube like structures in primary human renal epithelial cells. *PLoS One* 2011;6(6):e21283.
- (215) Onfelt B, Nedvetzki S, Yanagi K, Davis DM. Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol* 2004;173(3):1511-3.
- (216) Abounit S, Zurzolo C. Wiring through tunneling nanotubes--from electrical signals to organelle transfer. *J Cell Sci* 2012;125(Pt 5):1089-98.
- (217) Onfelt B, Nedvetzki S, Benninger RK et al. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol* 2006;177(12):8476-83.
- (218) Kadiu I, Gendelman HE. Macrophage bridging conduit trafficking of HIV-1 through the endoplasmic reticulum and Golgi network. *J Proteome Res* 2011;10(7):3225-38.
- (219) Naphade S, Sharma J, Gaide Chevronnay HP et al. Brief reports: Lysosomal cross-correction by hematopoietic stem cell-derived macrophages via tunneling nanotubes. *Stem Cells* 2015;33(1):301-9.
- (220) Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ Res* 2005;96(10):1039-41.
- (221) Watkins SC, Salter RD. Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity* 2005;23(3):309-18.
- (222) Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O et al. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol* 2008;10(2):211-9.
- (223) Gousset K, Schiff E, Langevin C et al. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol* 2009;11(3):328-36.

- (224) Chauveau A, Aucher A, Eissmann P, Vivier E, Davis DM. Membrane nanotubes facilitate long-distance interactions between natural killer cells and target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(12):5545-50.
- (225) Zaccard CR, Watkins SC, Kalinski P et al. CD40L induces functional tunneling nanotube networks exclusively in dendritic cells programmed by mediators of type 1 immunity. *J Immunol* 2015;194(3):1047-56.
- (226) Arrebillaga-Boni G, Hernandez-Ruiz M, Castillo EC, Ortiz-Navarrete V. Intercellular communication through contacts between continuous pseudopodial extensions in a macrophage-like cell line. *Cell Commun Adhes* 2014;21(4):213-20.
- (227) Eugenin EA, Gaskill PJ, Berman JW. Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: a potential mechanism for intercellular HIV trafficking. *Cell Immunol* 2009;254(2):142-8.
- (228) Hashimoto M, Bhuyan F, Hiyoshi M et al. Potential Role of the Formation of Tunneling Nanotubes in HIV-1 Spread in Macrophages. *J Immunol* 2016;196(4):1832-41.
- (229) Zuniga MC, White SL, Zhou W. Design and utilization of macrophage and vascular smooth muscle cell co-culture systems in atherosclerotic cardiovascular disease investigation. *Vasc Med* 2014;19(5):394-406.
- (230) Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 2006;177(10):7303-11.
- (231) Gurdon JB, Lemaire P, Kato K. Community effects and related phenomena in development. *Cell* 1993;75(5):831-4.
- (232) Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003;3(1):23-35.
- (233) Caro J. Hypoxia regulation of gene transcription. *High Alt Med Biol* 2001;2(2):145-54.
- (234) Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W et al. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res* 1996;56(9):2161-6.

9. Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger Braun-Dullaeus möchte ich danken für die Überlassung dieses interessanten Themas, das in mich gesetzte Vertrauen, die Möglichkeit ein gleichberechtigtes Mitglied der Forschungsgruppe zu werden, sowie die stete Unterstützung und konstruktive Kritik bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Sönke Weinert, welcher mich als Freund, Mentor und exzellenter Wissenschaftler viele Jahre begleitet hat. Ohne seinen Perfektionismus, Fachkenntnis, Freundlichkeit, Hilfsbereitschaft und unerschöpfliche Geduld wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Weiterhin möchte ich meinen Kollegen aus dem Labor für Experimentelle Kardiologie für die mir entgegengebrachte Unterstützung sowie Freundlichkeit danken.

Für die Durchsicht des Manuskripts und wertvolle Kritik danke ich meinen Freunden Maria Wachsmuth und Jan Teuber.

Ich danke besonders meinen Eltern, welche mir so vieles ermöglicht, die wichtigen Dinge auf meinen Lebensweg mitgegeben und mich mit viel Liebe zu dem Menschen erzogen haben, welcher ich heute bin.

Größter Dank gilt ebenso meiner Verlobten Maria, welche mir in all den Jahren nicht nur seelischen Beistand geleistet und das Manuskript kritisch gegengelesen hat, sondern durch ihre Toleranz und Fürsorge für unsere Familie erst dafür gesorgt hat, dass ich so viel Zeit für diese Arbeit aufwenden konnte.

10. Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Untersuchungen zur Interaktion von Makrophagen mit Gefäßmuskelzellen unter Hypoxie mittels high-content Bildanalyse

in der Klinik für Kardiologie und Angiologie

mit Unterstützung durch **Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger Christian Braun-Dullaeus** und **Herrn Dr. rer. nat. Sönke Weinert**

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 12.06.2017

Unterschrift

11. Darstellung des Bildungsweges

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht
enthalten.**

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht
enthalten.**