

Mirjam Evelin Tyka
Dr. med.

Die Identifikation und Charakterisierung CXCL4 induzierter Makrophagen in humanen atherosklerotischen Plaques

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. Thomas Dengler

Die Atherosklerose ist eine chronische Entzündung der mittleren und großen Arterien des Körpers. Durch Bildung atherosklerotischer Plaques und ihrer Ruptur kommt es mit dem Fortschreiten der Erkrankung zunehmend zu kardiovaskulären Komplikationen wie Thrombose und Ischämie. Makrophagen spielen bei diesem Prozess als prominentester Zelltyp eine wichtige Rolle. Sie beeinflussen mitunter das Fortschreiten der Erkrankung durch pro-inflammatorische Reize.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Makrophagen eine ausgeprägte Heterogenität und Plastizität als Antwort auf ihr spezifisches Mikromilieu zeigen. Aktuell wird in einem vereinfachten Modell zwischen inflammatorischen M1- und anti-inflammatorischen M2-Makrophagen unterschieden. Diese Einteilung ist unzureichend, um die wirklichen Funktionen und Eigenschaften der Makrophagen-Subtypen hinreichend zu erklären. Inzwischen konnten verschiedene Arbeiten belegen, dass es eine Vielfalt an Makrophagen mit unterschiedlicher Bedeutung für die Pathogenese der Atherosklerose geben muss. Das Plättchenchemokin CXCL4 konnte als Bestandteil des proinflammatorischen Mikromilieus in humanen atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden. Es hat potentiell pro-atherogene Effekte auf Endothelzellen, die Rekrutierung von Monozyten in die Gefäßwand sowie die Differenzierung von Makrophagen selbst. In Genchip-Analysen von M-CSF und GM-CSF sowie CXCL4 induzierten Makrophagen gab es Hinweise auf die unterschiedliche Expression von Proteinen, die eine spezifische Charakterisierung ermöglichen könnten.

Basierend auf Genexpressionsdaten von durch CXCL4 oder M-CSF induzierten Makrophagen sollte in dieser Arbeit eine geeignete Markerkombination gefunden werden, um CXCL4-induzierte Makrophagen *in vitro* wie auch *ex vivo* sicher identifizieren zu können. Die Koexistenz dieser Markerkombination sollte *in vitro* auf

Makrophagen bestätigt werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob diese Zellen in humanen atherosklerotischen Plaques zu finden sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von MMP7, MRP8 und CD32 in CXCL4-induzierten im Vergleich zu M-CSF induzierten Makrophagen auf Gen- und Proteinebene verglichen. Diese Marker wurden anhand einer Transkriptomanalyse von Gleissner et al. ausgewählt, da sie signifikant stärker exprimiert waren und sich für den Nachweis in *In-vitro*-Experimenten eignen würden.

Zunächst wurden Monozyten auf Blut gesunder Spender isoliert und in der Zellkultur entweder mit M-CSF für sechs Tage oder mit M-CSF und CXCL4 für jeweils drei Tage stimuliert. Zunächst wurden RT-PCR-Experimente durchgeführt. Diese zeigten für MMP7 und MRP8 eine mit der Konzentration des zugegeben Chemokins CXCL4 dosisabhängig zunehmende Expression der Marker, während M-CSF induzierte Makrophagen MMP7 und MRP8 signifikant weniger stark exprimierten. Für CD32 ließ sich kein Zusammenhang zeigen.

In der anschließenden FACS-Analyse wurde die Expression von MMP7 in CXCL4-induzierten Makrophagen (M4) auf Proteinebene bestätigt. Für CD32 gelang es wiederum nicht, signifikante Unterschiede auf Proteinebene für die beiden unterschiedlichen Makrophagen-Subtypen festzustellen.

Für MRP8 zeigte sich durch eine Fluoreszenzanfärbung in M4-Makrophagen ein positives Signal für MRP8, wohingegen M-CSF-induzierte Makrophagen nur sehr niedrige MRP8-Expression aufwiesen. Schließlich wurden Kryoschnitte humaner Koronararterien mittels Immunhistochemie angefärbt. Dabei zeigte sich, dass die Proteine MRP8 und MMP7 in Makrophagen (durch CD68 markiert) in atherosklerotischen Plaques differentiell exprimiert sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine kleine Subpopulation von Makrophagen simultan MRP8 und MMP7 exprimiert.

Die Versuche ergaben, dass die Kombination der hohen Expression von MMP7 und MRP8, gleichzeitig mit einem geeigneten Makrophagenmarker auf derselben Zelle ein geeignetes Mittel ist, um CXCL4-induzierte Makrophagen zu identifizieren. Diese Kombination wurde bisher in keinem Makrophagen-Subtyp beobachtet. Das Vorkommen des Makrophagentypen konnte erfolgreich in humanen Koronararterien gezeigt werden.

Mit Hilfe der hier entwickelten neuen Strategien, einen putativ pro-atherogenen Makrophagensubtypen in humanen atherosklerotischen Plaques sicher zu identifizieren, kann zukünftig dessen Funktion in der Pathogenese der Atherosklerose weiter untersucht werden. Ferner wird es möglich sein, hieraus neue diagnostische und therapeutische Strategien zu entwickeln.