

Christian Michael Helmes

Dr. med.

## **Transkriptomanalyse der Effekte von Galectin-3 bindendem Protein auf humane Makrophagen: Implikationen für die Hämoglobin-Clearance im Rahmen der Atherosklerose**

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Thomas Dengler

Aus Monozyten differenzierte Makrophagen und Schaumzellen haben eine große Bedeutung bei der Atherogenese. Galectin-3 bindendes Protein (Gal-3BP), auch bekannt als Mac-2 bindendes Protein oder 90K, ist ein sezerniertes Glykoprotein mit immunmodulierenden Eigenschaften. Frühere Studien zeigten bereits, dass Gal-3BP die Scavenger-Rezeptoren CD36 und SR-A für modifiziertes LDL in Makrophagen herunterreguliert und dadurch die für die Atherogenese wichtige Schaumzellbildung inhibiert. Zudem werden hohe Plasma-Spiegel von Gal-3BP bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit mit einem günstigen klinischen Outcome assoziiert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten vor dem Hintergrund einer potentiellen Relevanz für die Atherosklerose beim Menschen neue Mechanismen identifiziert werden, mit denen Gal-3BP Einfluss auf die Makrophagendifferenzierung hat. Hierfür wurden primäre humane Makrophagen mit physiologischen Konzentrationen von rekombinanten Gal-3BP oder Kontrollpuffer für 48 Stunden stimuliert und mit Hilfe von Illumina Human Sentrix-8 Bead Chips analysiert. Unter Verwendung des Local-Pooled-Error (LPE) Tests wurden 217 statistisch signifikant regulierte Probe Sets identifiziert, von denen 125 eine Hochregulation und 92 eine Herunterregulation durch Gal-3BP erfuhren. Mit Hilfe der Gen Ontologien konnte eine signifikante Überrepräsentanz der Gene festgestellt werden, die mit der Immunantwort, Chemotaxis, Zellmotilität oder der inflammatorischen Antwort assoziiert sind. Eine Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) zeigte, dass das Gal-3BP induzierte Transkriptom der Makrophagen keiner der typischen Makrophagen-Polarisationen M1, M2 oder M4 zugeordnet werden kann. Gal-3BP scheint vielmehr ein neues, spezifisches Makrophagentranskriptom zu induzieren. In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass Gal-

3BP verschiedene Zytokine auf Genebene (*IL8*), auf Proteinebene (*IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *IL-10*) oder auf beiden Ebenen (*IL1B/IL-1 $\beta$* ) in ihren Expressionen hochreguliert.

Das atheroprotektive Gen *CD163*, welches für den Hämoglobin-Haptoglobin (Hb-Hp) Scavenger-Rezeptor CD163 kodiert, war in der Genexpressionsanalyse durch Gal-3BP signifikant hochreguliert. In weiteren Zellkulturexperimenten mit primären humanen Makrophagen zeigte sich auf Proteinebene hingegen eine dosis- und zeitabhängige Herunterregulation nach Stimulation mit Gal-3BP. Grund hierfür ist ein Shedding des Transmembranproteins CD163 von der Makrophagenoberfläche und eine damit verbundene Hochregulation der löslichen Form des Proteins CD163 (sCD163) in den Zellkulturüberständen. Als zugrunde liegender Mechanismus des Sheddings konnte eine von Gal-3BP abhängige Herunterregulation des Sheddase-Inhibitors TIMP-3 identifiziert werden. Makrophagen, die nach einer Gal-3BP-Vorbehandlung mit Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexen stimuliert wurden, wiesen eine verstärkte Hochregulation der atheroprotektiven Hämoxxygenase-1 (HO-1) im Vergleich zur Kontrollgruppe auf, bei der die Hb-Hp induzierte Hochregulation signifikant geringer ausfiel.

Immunhistochemische Untersuchungen von post mortem gewonnenen humanen Koronararterien zeigten eine signifikante positive Korrelation der Proteinexpressionen von Gal-3BP und CD163 in atherosklerotischen Plaques, womit die Ergebnisse der *in vitro* durchgeführten Experimente bestätigt werden konnten. Eine Expression von Gal-3BP und CD163 war dabei nur in Herzkranzgefäßwänden von Patienten zu beobachten, bei denen die Atherosklerose in Form einer koronaren Herzkrankheit bereits symptomatisch wurde.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass Gal-3BP einen bedeutenden Modulator von humanen Makrophagen in atherosklerotischen Plaques darstellt und eine neue Makrophagen-Polarisation hervorruft. Gal-3BP bewirkt die Hochregulation pro-inflammatorischer Zytokine wie auch des atheroprotektiven CD163. Der induzierende Einfluss von Gal-3BP auf die Genexpression von CD163 und die verstärkte Hochregulation von HO-1 in Abhängigkeit von Hb-Hp impliziert einen wichtigen Einfluss von Gal-3BP auf die Fähigkeit von Makrophagen als Antwort auf Hämorrhagien innerhalb der atherosklerotischen Plaque mit einer verstärkten Hochregulation des atheroprotektiven Enzyms HO-1 zu reagieren. Mit diesem Mechanismus konnte ein neuer bedeutender Aspekt der anti-atherosklerotischen Wirkungsweise von Gal-3BP in humanen Makrophagen beschrieben werden.