

Oliver Adolph

Dr. med.

CD40-Ligand vermittelte Freisetzung des von Willebrand Faktors aus Endothelzellen in der murinen Arteria carotis communis

Fach/Einrichtung: Physiologie

Doktorvater: Prof. Dr. Markus Hecker

In dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass CD154 über Ligation des CD40-Rezeptors einer intakten Endothelzellschicht zur luminalen Freisetzung von von Willebrand Faktor (VWF) führt und sich unter Flussbedingungen ultra large VWF (ULVWF)-Multimere auf der Oberfläche der Endothelzellen bilden. An diese Multimere binden nicht-aktivierte Thrombozyten und ermöglichen und verstärken nach ihrer Aktivierung eine Interaktion von Endothelzellen mit Leukozyten. Hierdurch entstehen sogenannte Prädispositionsstellen atherosklerotischer Gefäßveränderungen an Aufzweigungsstellen des Gefäßsystems. Hierzu wurde ein im Labor etabliertes *in situ* Gefäßperfusionsmodell der isolierten A. carotis communis der Maus weiterentwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass das Modell sich auch für Perfusionsversuche bei höheren Schubspannungen eignet, ohne dass es zu einer Ablösung der endothelialen Zellschicht kommt. Die Stimulation des endothelialen CD40-Rezeptors erfolgte durch einen löslichen rekombinanten Liganden (sCD154). Ruhende murine Thrombozyten wurden isoliert, gefärbt und perfundiert. Die Perfusion von Leukozyten erfolgte in Form der Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 sowie mit nach einem für diese Arbeit implementierten Protokoll aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) frisch isolierten und gefärbten Monozyten.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass in einem *in situ* Perfusionsmodell der murinen A. carotis communis die Ligation des CD40-Rezeptors durch den löslichen Liganden sCD154 zu einer ausgeprägten Freisetzung von VWF aus endothelialen Weibel-Pallade-Körperchen führt und sich auf der Oberfläche der Endothelzellen mehrere 100 µm lange ULVWF-Multimere bilden. Damit konnten die in einem Zellkulturmodell unter Verwendung von humanen Endothelzellen gewonnenen *in vitro* Ergebnisse aus der naturwissenschaftlichen Dissertation von Dr. Kerstin Möller auch in dem hier dargestellten *in situ* Modell bestätigt werden. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass ruhende Thrombozyten an den CD154-induzierten ULVWF-Multimeren anhaften und hierdurch aktiviert werden, was durch die positive Immunfluoreszenz für P-Selektin nachgewiesen werden konnte. Zu einer

Anhaftung kam es dabei sowohl unter Flussbedingungen mit niedriger als auch mit mittlerer Schubspannung von 1 bzw. 15 dyn/cm². Bei Echtzeit-Aufnahmen unter dem 2-Photonen Mikroskop zeigte sich, dass bei höheren Schubspannungen tendenziell mehr Thrombozyten rekrutiert werden als bei niedrigeren Werten. Weiter konnte in exemplarischen Versuchen gezeigt werden, dass native murine Monozyten und RAW 264.7 Zellen in den perfundierten Gefäßen haften bleiben und mit den Thrombozyten-besetzten ULVWF-Multimeren kolokalisiert sind.

In der Zusammenschau der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente, den von unserer Arbeitsgruppe zuvor veröffentlichten Ergebnissen und den durch Dr. Möller gewonnen Erkenntnissen ergibt sich ein recht umfassendes Bild der Interaktion des endothelialen CD40-Rezeptors mit CD154 und der möglicherweise bedeutenden Beteiligung an der Initiierung maladaptiver Vorgänge an und in der Gefäßwand, wie sie in der Frühphase der Atherosklerose vorkommen.