

Miruna-Andreea Popa
Dr. med.

CD154-induced platelet-dependent monocyte recruitment to endothelial cells under shear stress conditions

Fach/Einrichtung: Physiologie

Doktorvater: Prof. Dr. Markus Hecker

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Mechanismus der CD154-induzierten Thrombozyten-abhängigen Monozytenadhäsion an Endothelzellen unter arteriellen Schubspannungsbedingungen. Die CD40-CD154 Wechselwirkung ist eng in die Entstehung der Atherosklerose involviert, indem sie die Infiltration von Monozyten in die Arterienwand, die Plaqueinstabilität und die Ausbildung eines nekrotischen Kerns fördert. Obwohl die Rekrutierung und nachfolgende Transmigration der Monozyten wichtige Faktoren der Atherogenese darstellen, bleibt der genaue Mechanismus, wie zirkulierende Monozyten die arterielle Schubspannung überwinden um an intakten Endothelzellen in frühen Krankheitsstadien fest anzuhafte, ungeklärt. Die aktuelle Studie basierte auf der Hypothese, dass CD154-exprimierende aktivierte Thrombozyten mit dem endothelialen CD40-Rezeptor interagieren und dadurch die Freisetzung von ultralangen von Willebrand Faktor (ULVWF) Multimeren induzieren. Diese Multimere lagern sich nach der Freisetzung an der luminalen Endothelzelloberfläche an und bilden dort eine ideale adhäsive Plattform für Thrombozyten, an denen zirkulierende Monozyten anhaften können. Weiterhin wurde im Zusammenhang mit der Entstehung der koronaren Herzkrankheit die Bedeutung der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease ADAMTS13 bei der Entstehung dieser Multimere und der Monozytenrekrutierung untersucht.

Um diese Fragestellungen zu adressieren, wurde ein *in vitro* Flusskammermodell verwendet, das die Flussbedingungen in Arterien simuliert und die Untersuchung der Thrombozyten-Monozyten-Endothelzell-Interaktionen in Echtzeit mit Hilfe von Live Cell Imaging und Reflection Interference Contrast Microscopy ermöglicht. In diesen Flusskammern kultivierte humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen wurden niedrigen bzw. mittleren Schubspannungsbedingungen von 2.5 und 10 dyn/cm² ausgesetzt, wie sie an Prädisloktionsstellen der Atherosklerose vorkommen. Thrombozyten und Monozyten wurden aus frisch abgenommenem humanem Blut isoliert, mit fluoreszierenden Farbstoffen gefärbt und als rekonstituierte Blutlösung mit unterschiedlichen ADAMTS13 Konzentrationen über den Endothelzellen-Monolayer superfundiert. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Modell eine valide Methode zur Quantifizierung der Morphologie und Freisetzungskinetik der ULVWF-Multimere unter Flussbedingungen darstellt. Außerdem lieferte es neue Erkenntnisse über den Mechanismus, demzufolge Thrombozyten unter physiologischen Schubspannungsbedingungen zirkulierende Monozyten abfangen und bei der Transmigration durch die Endothelzellschicht unterstützen.

Es konnte gezeigt werden, dass ein CD154-Fusionsprotein bzw. aktivierte Thrombozyten unter kontinuierlicher unidirektionaler Schubspannung die Freisetzung von ULVWF-Multimeren auslösen und eine funktionelle Bedeutung bei der Thrombozyten-abhängigen Monozytenrekrutierung besitzen. Lösliches und Thrombozyten-gebundenes CD154 induzierten gleichermaßen eine unmittelbare Freisetzung und Anheftung von ULVWF-Multimeren auf der Endothelzelloberfläche, die von einer sofortigen Anlagerung von Thrombozyten gefolgt war. Bemerkenswert war die hohe Stabilität dieser perlschnurartigen ULVWF-Multimer-Thrombozyten-Komplexe bei 10 dyn/cm² und die erreichten Längen von bis zu 700 µm. Die Inkubation aktivierter Thrombozyten mit einem neutralisierenden anti-CD154-Antikörper reduzierte die Entstehung dieser Komplexe auf das Niveau der Negativkontrollgruppe, wodurch die Spezifität dieser CD154-Wirkung aufgezeigt werden konnte. Weiterhin wurde das

inflammatorische Potenzial der CD154-induzierten ULVWF-Multimere nachgewiesen, da sowohl lösliches als auch Thrombozyten-gebundenes CD154 das Anhaften von Monozyten an Endothelzellen signifikant um den Faktor 3 bzw. 5 erhöhte.

Fluoreszierende Monozyten adhärten bei 10 dyn/cm^2 vorzugsweise an Thrombozyten-dekorierten ULVWF-Multimeren, indem sie mithilfe von PSGL-1 direkt mit den P-Selektin-positiven Thrombozyten interagierten, in der Regel ohne eine weitere Rollbewegung z.B. auf Endothelzellen aufzuzeigen. Mikroskopische Bildanalysen zeigten, dass die Monozyten nach Bindung an die Thrombozyten durch die Endothelzellschicht transmigrierten. Die Verwendung von Perfusionslösungen ohne Thrombozyten reduzierte die Monozytenadhäsion um 80%, was die zentrale Rolle der Thrombozyten bei der Monozytenadhäsion und -transmigration unter nahezu physiologischen Flussbedingungen nachweist. Die Monozytenrekrutierung unter arterieller Schubspannung ohne Rollbewegung direkt an die Thrombozyten-dekorierten ULVWF-Multimere auf der luminalen Endothelzelloberfläche spricht für einen neuartigen Mechanismus, der die CD154-induzierte Infiltration in die arterielle Gefäßwand in frühen Stadien der Atherosklerose verstärken könnte.

Außerdem zeigte diese Arbeit, dass die Expression von ADAMTS13 in Endothelzellen von den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IFN- γ gehemmt wird und etablierte CD154 als einen weiteren Inhibitor dieser ADAMTS13-Expression. Atheroprotektive Faktoren wie unidirektionale Schubspannung, Interleukin-10 und Statine konnten die endotheliale ADAMTS13-Expression dagegen nicht steigern. Zudem konnte eine reziproke Korrelation zwischen der Expression von ADAMTS13 und von Willebrand Faktor in den Endothelzellen nachgewiesen werden, die von dem Differenzierungsgrad der Endothelzellen abhängig ist. So stieg die ADAMTS13-Expression signifikant mit zunehmender Zelldichte im Verlauf der Kultivierung an, während die von Willebrand Faktor-Menge am höchsten in proliferierenden und am niedrigsten in konfluenten Endothelzellen war. Dies könnte den u.a. durch eine Kontaktinhibition charakterisierten, anti-inflammatorischen und anti-thrombotischen Phänotyp ruhender Endothelzellen erklären.

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Thrombozyten-abhängige Monozytendiapedese besonders unter ADAMTS13-freien Bedingungen gefördert wird. Die Plasmakonzentration und -aktivität von ADAMTS13 wurde bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit im Rahmen einer klinischen Fall-Kontroll-Studie bestimmt. In Übereinstimmung mit früheren Berichten war ein mäßiger ADAMTS13-Mangel mit koronarer Herzkrankheit und steigendem Alter assoziiert. Die ADAMTS13 Plasmaspiegel der Patienten ($636.3 \pm 146.0 \text{ ng/ml}$, $n = 70$) waren signifikant niedriger im Vergleich zu jungen ($823.7 \pm 154.6 \text{ ng/ml}$, $n = 41$) bzw. altersentsprechenden Kontrollpersonen ($709.4 \pm 166.8 \text{ ng/ml}$, $n = 50$). Unklar war jedoch, ob dieser mäßige ADAMTS13-Mangel klinisch relevant ist. In dem oben beschriebenen *in vitro* Perfusionsmodell, der als Bioassay verwendet wurde, nahm die Bildung Thrombozyten-dekorierter ULVWF-Multimere exponentiell mit fallender ADAMTS13 Plasmakonzentration zu. Ab einem Schwellenwert von ca. 600 ng/ml ADAMTS13 zeigte sich eine signifikante Ablagerung dieser ULVWF-Multimer-Thrombozyten-Komplexe auf der Oberfläche der superfundierten Endothelzellen. Die Superfusion Bradykinin-stimulierter Endothelzellen mit gepooltem Plasma von Patienten mit koronarer Herzkrankheit ($n = 24$) resultierte außerdem in einer 4-fach erhöhten Bildung dieser Multimere im Vergleich zum Plasma der Kontrollpersonen. Insofern zeigten diese Ergebnisse, dass auch ein mäßiger ADAMTS13-Mangel eine insuffiziente Spaltung der ULVWF-Multimere in inaktive kleinere Fragmente bedingt und somit die Monozytenrekrutierung im Bereich von Prädilektionsstellen der Atherosklerose unterstützt und der koronaren Herzkrankheit Vorschub leistet.

Zusammenfassend könnte somit eine reduzierte ADAMTS13 Plasmaaktivität ursächlich für die Förderung einer CD154-induzierten Thrombozyten-abhängigen Monozytenrekrutierung an einer ansonsten intakten Gefäßwand sein. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnten eine neue Perspektive in der

gezielten Beeinflussung der Thrombozyten-Monozyten-Interaktion für die Prävention und die Therapie atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen eröffnen und identifizieren einen relativen ADAMTS13-Mangel sowie hohe CD154 Plasmaspiegel als potenzielle Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass das Zusammenspiel zwischen ADAMTS13 und von Willebrand Faktor ein wichtiges Bindeglied zwischen Thrombose und Inflammation darstellt.