

Daniel Schlittenhardt
Dr. med.

Kolokalisation von Apoptose und Inflammation in Makrophagen arteriosklerotischer Läsionen humaner Karotiden

Geboren am 03.01.1975 in Pforzheim
Reifeprüfung am 21.06.1994 in Pforzheim
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1996 bis SS 2002
Physikum am 23.03.1998 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Schwäbisch Hall
Staatsexamen am 26.11.2002 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. sc. hum. Ralf Kinscherf

In dieser Arbeit wurden immunhistochemisch apoptotische und inflammatorische Makrophagen (MΦ) humaner, arteriosklerotischer Plaques der A. carotis charakterisiert und anschließend mittels Computer-unterstützter Morphometrie analysiert. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen zeigten die Kolokalisation von Markern für oxidativen Stress, Apoptose und Inflammation in Plaque-MΦ. Anhand von *in vitro* Untersuchungen an Human-MΦ wurden die Auswirkungen von oxidativem Stress auf die Apoptoserate und die Induktion von Entzündungsmarkern analysiert. In diesem Zusammenhang gelang erstmals der Nachweis von GDF-15/MIC-1 als neues Mitglied der TGF-β Superfamilie in humanen arteriosklerotischen Läsionen sowie dessen durch oxidativen Stress vermittelte Expression *in vitro* in Human-MΦ. Im Rahmen einer erforderlichen gefäßchirurgischen Intervention wurde 11 Patienten arteriosklerotisches Gefäßwandmaterial aus der A. carotis entnommen. In den immunhistochemischen Untersuchungen wurden zunächst Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit Markern für MΦ (CD68- und Mac-1-IR), glatte Muskelzellen (α-Aktin-IR), oxidativen Stress (oxLDL- und MnSOD-IR), Apoptose (CPP32-, PARP-, AIF-, p53-, c-jun/AP-1-IR) und Entzündung (COX-2- sowie MIF-IR) angefertigt und anschließend die Zelldichte immunreaktiver (ir) Zellen im Plaque morphometrisch bestimmt und quantifiziert. Die Untersuchungen dieser Arbeit belegen, dass es sich bei dem überwiegenden Anteil im Plaque lokalisierter Zellen um MΦ und nur zu einem kleinen Anteil um Glattmuskelzellen handelt. Die Kolokalisation von oxLDL und MnSOD in Human-MΦ sowie signifikant positive Korrelationen zwischen den prozentualen Anteilen dieser Zellen konnten als Hinweis für einen Kausalzusammenhang gewertet werden. Durch oxidativen Stress induzierte Apoptose wurde nahezu ausschließlich in MΦ und nicht in Glattmuskelzellen gefunden. Im Kontext der oxLDL medierten Entzündung ließ sich eine Koinkidenz der Entzündungsmarker MIF und COX-2 in MΦ humaner Karotidenplaques belegen. Des Weiteren bestätigten *in vitro* Untersuchungen, dass oxLDL (bzw. seine Mediatoren) und H₂O₂ zu einer Hochregulierung von MIF auf Proteinebene führen. Dies werteten wir als Hinweis dafür, dass die Erhöhung des oxidativen Stresses, z.B. durch Zunahme reaktiver Sauerstoffverbindungen, als wahrscheinlichste gemeinsame Ursache der Initialisierung von Apoptose und Inflammation angesehen werden kann. Die Apoptose wurde klassischerweise, im Gegensatz zur Nekrose, als nicht-inflammatorisch beschrieben. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch erstmals, dass Apoptose und Entzündung in MΦ arteriosklerotischer Läsionen der humanen A. carotis kolokalisiert sind und eine signifikant positive Korrelation zwischen der Dichte apoptotischer und inflammatorischer MΦ im Plaque besteht. Apoptotische MΦ, die die Hauptquelle der

MIF Produktion in der humanen arteriosklerotischen Gefäßwand darstellen könnten, wären damit in der Lage, ebenso wie über COX-2 vermittelt, proinflammatorische Prozesse zu initiieren bzw. zu verstärken und damit einen wesentlichen Beitrag zur Plaquevulnerabilität/ -ruptur mit der Folge schwerer thrombembolischer Ereignisse (u.a. Instabile Angina pectoris, Myokardinfarkt, Schlaganfall, Tod) zu leisten.

GDF-15/MIC-1 ist ein neues Mitglied der TGF- β Superfamilie. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals seine Lokalisation und darüber hinaus seine Induktion in durch oxLDL (bzw. seiner Mediatoren) und H₂O₂ gestressten M Φ humaner arteriosklerotischer Karotidenplaques nachgewiesen. Aufgrund der beschriebenen Lokalisation von GDF-15/MIC-1 in apoptotischen sowie inflammatorischen M Φ arteriosklerotischer Läsionen humaner Karotiden ist anzunehmen, dass GDF-15/MIC-1 an der Regulation apoptotischer und inflammatorischer Prozesse oxidativ gestresster M Φ involviert sein könnte. Somit wäre für dieses Protein eine völlig neue Funktion bei der Atherogenese gefunden; es könnte auch als prognostischer Marker zur Risikostratifikation von Patienten dienen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Schlussfolgerung zu, dass sowohl die Kolo-kalisation von Apoptose und Inflammation in M Φ humaner Karotidenplaques, als auch die Induzierbarkeit von beiden durch oxLDL (bzw. seiner Mediatoren) sowie durch H₂O₂ in kultivierten Human-M Φ einer gegenseitigen modulatorischen Beeinflussung in der Arteriosklerose unterliegen und damit neue Ansatzpunkte für künftige Therapieansätze bieten könnten.