

Florian Schnitter
Dr. med.

Zur Bedeutung einer CD40/CD40-Ligand-Interaktion bei der transendothelialen Migration von Monozyten für deren Differenzierung und Polarisierung im Rahmen der frühen Atherogenese

Fach/Einrichtung: Physiologie
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Markus Hecker

Einige der medizinisch und sozioökonomisch bedeutsamsten Erkrankungen entstehen auf dem Boden atherosklerotischer Gefäßveränderungen. Im Zuge der Atherogenese begünstigt endotheliale Dysfunktion die Extravasation von Monozyten in die Gefäßintima, wo sie zu Makrophagen differenzieren und diverse Phänotypen annehmen können. Proinflammatorisch polarisierte Makrophagen verstärken pathologische Vorgänge und tragen entscheidend zum maladapten vaskulären Umbauprozess bei. Als möglicher Vermittler dieser phänotypischen Prägung gilt das kostimulatorische Rezeptor-Liganden-Paar CD40/CD40L, das sich unter anderem auf Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen findet. Für kultivierte humane Endothelzellen ist nach Stimulation mit exogenem CD40L die Induktion von endogenem CD40L beschrieben, der wiederum transmigrierende monozytäre Zellen aktivieren konnte. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer solchen Interaktion mit der Hypothese untersucht, dass endothelialer CD40L in auswandernden Monozyten eine spätere proinflammatorische (M1-)Polarisierung hervorruft.

Die CD40L-Expression primärer humaner Endothelzellen aus der Nabelschnurvene wurde nach Inkubation mit multimerem löslichen oder zellmembrangebundenem CD40L auf Protein- (Western Blot) und mRNA-Ebene (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) bestimmt. Aus humanem Vollblut per negativer Immunselektion isolierte Monozyten wurden durchflusszytometrisch charakterisiert sowie kultiviert. Nach ihrer *in vitro*-Differenzierung zu Makrophagen unter dem Einfluss von Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor erfolgte die Zellpolarisierung mit Zytokinen zu M1- (Tumornekrosefaktor- α , Interferon- γ), M2a- (Interleukin-4, -13) oder M2c-Phänotypen (Interleukin-10). Für diese wurden anhand einer mRNA-Expressionsanalyse Oberflächenmarker identifiziert und durchflusszytometrisch validiert. Die transendotheliale Migration humaner Monozyten unter anderem durch mit löslichem CD40L beziehungsweise humanen Thrombozyten vorbehandelte Endothelzellmonoschichten fand in modifizierten Boyden-Kammern unter oszillatorischer Schubspannung bis 1,5 dyne/cm² statt. In einigen Fällen wurde eine etwaige CD40/CD40L-Interaktion mit entsprechenden Antikörpern blockiert. Transmigrierte Zellen wurden schließlich auf ihre mRNA-Expression der ausgewählten Polarisierungsmarker analysiert.

CD40L-Protein konnte in humanen Endothelzellen selbst nach Stimulation mit multimerem löslichen oder membrangebundenem CD40L nicht detektiert werden. Die basale CD40L-mRNA-Expression der Zellen blieb trotz deren Aktivierung durch löslichen CD40L unverändert. Eine signifikante, nahezu 70-fache Expressionssteigerung nach Stimulation mit membrangebundenem CD40L ließ sich nicht sicher als spezifischer Effekt belegen. Die Monozytenisolation lieferte eine hochreine Zellsuspension mit physiologischem Subtypenverhältnis. Infolge der fünftägigen Differenzierung *in vitro* bildeten sich naive Makrophagen aus, die dann nach 24- beziehungsweise 48-stündiger Inkubation mit diversen

Stimuli distinkte Phänotypen aufwiesen. Aus einer Vielzahl vorbeschriebener Polarisierungsmarker wurde die Kombination von CD40, CD64, CD163 und CD206 als geeignet zur phänotypischen Diskriminierung der Zellen mittels mRNA- sowie Proteinexpressionsanalyse identifiziert. Im *in vitro*-Modell der Transmigration unter proatherogenen Flussbedingungen führte alleine die Diapedese durch Endothelzellmonoschichten in den Monozyten zu einer signifikant um etwa 40 % reduzierten mRNA-Expression von CD40. Die CD64- und CD163-mRNA-Expression zeigte sich tendenziell erhöht, vereinbar mit einer beginnenden zellulären Differenzierung. Eine Transmigration in Gegenwart von Thrombozyten und/oder nach eventueller Induktion beziehungsweise selektiver Blockade von endotheliale CD40L bewirkte jedoch weder im kürzeren noch im längeren Verlauf zusätzliche, konsistente Veränderungen der Markerexpression im Sinne einer M1/M2-Polarisierung. Auch nach 24-stündiger Inkubation naiver Makrophagen mit löslichem CD40L war keine entsprechende Polarisierung nachweisbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen somit die vorbeschriebene CD40L-induzierte CD40L-Induktion in kultivierten humanen Endothelzellen in Frage. Zudem stützen sie die anfangs aufgestellte Hypothese nicht, da sich kein (M1-)polarisierender Effekt CD40/CD40L-vermittelter Signale im Rahmen der monozytären *in vitro*-Transmigration unter proatherogenen Bedingungen zeigte. Allerdings stoßen angesichts der ausgeprägten phänotypischen Heterogenität und Plastizität von Monozyten beziehungsweise Makrophagen sowie der Komplexität der Umgebungsmilieus etablierte Methoden, Modelle und Konzepte wie das M1/M2-Paradigma an ihre Grenzen. Die Rolle von CD40/CD40L bei der Aktivierung von Monozyten und Makrophagen in der Atherogenese könnte künftig *in vitro* durch gezielte Expressionsmodulation sowie *in vivo* in einem endothelzellspezifischen *Knockout*-Mausmodell weiter untersucht werden. Eine umfassendere phänotypische Charakterisierung der Immunzellen ließe sich mittels moderner Hochdurchsatztechnologien wie der Massenzytometrie, der Transkriptomsequenzierung oder auch der bildgebenden Massenspektrometrie erzielen.