

Klaus Heukamp

Dr. med.

Die Rolle von extrazellulären Vesikeln in systemischer Sklerose: Aufreinigung, Charakterisierung und Analyse der Funktion

Innere Medizin

Prof. Dr. med. Hanns-Martin Lorenz

Systemische Sklerose ist eine seltene Erkrankung des rheumatischen Formenkreises. Sie ist durch eine Trias aus Mikrovaskulopathie, chronischer Entzündung mit Autoimmunität und Fibrose gekennzeichnet und betrifft die Haut sowie verschiedene innere Organe. Ihre genaue Pathogenese ist noch unklar, sie kann jedoch als ein chronifizierter, pathologischer Wundheilungsprozess verstanden werden, der zu übermäßigen Ablagerungen von nicht funktionsfähigem Bindegewebe führt. Makrophagen sind gewebständige Immunzellen, die an der Wundheilung beteiligt und in der Pathogenese der systemischen Sklerose impliziert sind. Hierbei liegt ein spezifischer Makrophagenphänotyp vor, der sowohl proinflammatorische als auch profibrotische Aspekte kombiniert. Wodurch dieser Phänotyp zustande kommt ist noch unklar. Extrazelluläre Vesikel sind aus einer Lipiddoppelschicht bestehende Sphären, die von Zellen in den Extrazellulärraum sezerniert werden. Sie stellen eine Möglichkeit zur Kommunikation zwischen Zellen dar und sind in verschiedenen physiologischen und pathologischen Vorgängen involviert, von der Antigenpräsentierung bis zur Metastasierung. Extrazelluläre Vesikel kommen in diversen Bioflüssigkeiten vor. Da von ihrer Fracht, unter anderem Proteine und Nukleinsäuren, Rückschlüsse auf ihre Ursprungszelle und ihre Funktion gezogen werden können, werden sie als potentielle Biomarker untersucht. Es gibt nur wenige Studien zu Extrazellulären Vesikeln aus Plasma in systemischer Sklerose, teilweise mit widersprüchlichen Ergebnissen. Ihr Einfluss auf Makrophagen ist bisher unerforscht. Diverse Plasmabestandteile haben eine ähnliche Größe und Dichte wie extrazelluläre Vesikel und liegen in deutlich höherer Konzentration vor, was die Aufreinigung extrazellulärer Vesikel erschwert.

Ziel dieser Arbeit war, Methoden zu etablieren, mithilfe derer die Rolle extrazellulärer Vesikel in der systemischen Sklerose untersucht werden können, sowie erste Versuche zur Beantwortung dieser Fragestellung durchzuführen. Dazu wurden zuerst Aufreinigungsmethoden verglichen. Extrazelluläre Vesikel wurden aus Plasma und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit von Spendern mit systemischer Sklerose durch Size Exclusion Chromatographie, Ultrazentrifugation und Ultrafiltration aufgereinigt. Die Güte der Methoden wurde an der Vesikelkonzentration, gemessen durch Nano Tracking Analysis, und der Proteinkonzentration, gemessen durch Bicinchoninsäure Test, bewertet. Als nächstes wurden die extrazellulären Vesikel quantifiziert und anhand ihrer Oberflächenantigene charakterisiert. Die Antigene wurden durch Western Blot und zwei Sandwich Immuno-Assays, das MACSPlex Exosome Kit und ExoView R100, analysiert. Zuletzt wurde der Einfluss extrazellulärer Vesikel auf Makrophagen untersucht. Hierfür wurde ein Protokoll zur Differenzierung von Makrophagen aus primären Monozyten etabliert. Dann wurden extrazelluläre Vesikel gefärbt und ihre Aufnahme durch Makrophagen durchflusszytometrisch und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zum Schluss wurde ihr Effekt auf die Antigenexpression und Zytokinsekretion der Makrophagen, gemessen durch

Durchflusszytometrie, enzyme-linked immunosorbent assay und bead-based Immuno-Assay, analysiert.

Von den verglichenen Methoden hat die Kombination aus Size Exclusion Chromatographie und Ultrafiltration extrazelluläre Vesikel in der höchsten Konzentration und Reinheit aufgereinigt. Die extrazellulären Vesikel aus Plasma lagen in höherer Konzentration vor, waren jedoch kleiner als die aus bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit. In Plasma exprimierten sie vermehrt Oberflächenantigene, die für eine Abstammung von Endothelzellen, Thrombozyten, B- und T-Zellen sprechen und die am Organotropismus und der transendothelialen Migration beteiligt sind. In bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit hingegen exprimierten sie mehr Antigene, die auf eine Abstammung von Epithelzellen und Antigen-präsentierenden Zellen hindeuten.

Die extrazellulären Vesikel unterschieden sich nicht hinsichtlich ihrer Konzentration und Größe zwischen Spendern mit systemischer Sklerose und Normalspendern. Es waren jedoch mehrere der untersuchten Antigene in systemischer Sklerose überexprimiert, darunter Marker für T, B- und NK-Zellen. Dies impliziert ihre Rolle in der Pathogenese von systemischer Sklerose und bietet Ansätze für weitere Forschung.

Aus primären Monozyten wurden Makrophagen differenziert, die entweder einen proinflammatorischen oder einen profibrotischen Phänotyp hatten. Diese Makrophagen haben fluoreszierende extrazelluläre Vesikel aus Plasma aufgenommen. Dies hat zu einer erhöhten zytoplasmatischen Komplexität geführt, auch Granularität genannt. Auch haben extrazelluläre Vesikel zu einer erhöhten Expression von CD16 und Mer Tyrosinkinase, zwei Rezeptoren, die an der Phagozytose beteiligt sind, sowie einer verringerten Sekretion des proinflammatorischen Chemokins CXCL10 geführt. Ebenfalls wurden zwei antagonistisch wirkende Zytokine, das proinflammatorische IL-1 β und der antiinflammatorische IL-1 Rezeptorantagonist, herunterreguliert. Es wurde jedoch nicht der für systemische Sklerose typische Phänotyp in Makrophagen induziert.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit mehrere Methoden zur Analyse extrazellulärer Vesikel sowie ihrer Wechselwirkungen mit Makrophagen etabliert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Antigenexpression auf extrazellulären Vesikeln in systemischer Sklerose verändert ist. Die genaue Rolle dieser Antigene in der Pathogenese der Krankheit ist noch unbekannt, jedoch implizieren sie T-, B-, und NK-Zellen und die bieten weitere Ansätze, um systemische Sklerose zu erforschen. Auch stellen diese veränderten extrazellulären Vesikel potentielle Biomarker dar, die in Zukunft zu diagnostischen und prognostischen Zwecken verwendet werden könnten. Die Extrazellulären Vesikel aus Plasma haben in diesem Makrophagenmodell keinen für systemische Sklerose typischen Phänotyp induziert. Sie treten jedoch mit den Makrophagen in Kontakt und lösen Veränderungen in ihnen aus, die zukünftig weiter erforscht werden müssen.