

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Statine blockieren die spontane Differenzierung von humanen
Monozyten in M2-Makrophagen *in vitro***

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.) für das Fachgebiet
Medizin

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Julia Großmann
geboren am 02.08.1990 in Sebnitz

Betreuer: Prof. Dr. Harald Loppnow

Gutachter:

1. Prof. Dr. Harald Loppnow
2. Prof. Dr. Heike Kielstein
3. Prof. Dr. Florian Limbourg (Hannover)

09.07.2019

03.06.2020

Referat

Atherosklerose ist eine inflammatorische Erkrankung und gehört zu den führenden Todesursachen in den westlichen Industrienationen. Am Entstehungsprozess sind unter anderem Monozyten und Makrophagen beteiligt, die über die Ausschüttung diverser Zytokine ihre Funktionen vermitteln. Statine hemmen die Cholesterinbiosynthese und haben zusätzlich einen immunmodulatorischen Effekt, der vermutlich über die Hemmung der Isoprenoidsynthese vermittelt wird. Vorangegangene Studien lassen vermuten, dass Monozyten und Makrophagen unterschiedlich auf Statine reagieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zytokinausschüttung und die Antigenexpression von humanen Monozyten untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene Kulturmodelle, Typ A und Typ B, miteinander verglichen. Typ A-Monozyten wurden sofort mit dem Bakterienendotoxin LPS stimuliert, während Typ B-Monozyten vor der Stimulation zunächst 24 Stunden vorinkubierten. Parallel dazu wurden sowohl Typ A- als auch Typ B-Kulturen angelegt, die Fluvastatin enthielten. Als Negativ-Kontrollen dienten unstimulierte und statinfreie Monozytenkulturen. Mittels ELISA wurde die Ausschüttung der Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-10 in den Kulturüberständen gemessen. Mittels Durchflusszytometrie wurden die Monozyten anhand ihrer CD14- und CD16-Expression in Subpopulationen eingeteilt und ihr Phänotyp darüber hinaus anhand der Expression der Chemokinrezeptoren CCR2 und CX3CR1 und der Makrophagenmarker CD86 und CD163 charakterisiert.

In den Typ A-Kulturen konnte eine potente Zytokinproduktion nachgewiesen werden, die von Statin unbeeinflusst blieb. Die Antigenexpression veränderte sich unter Statin nur geringfügig. In den Typ B-Kulturen verloren die vorinkubierten Monozyten die Fähigkeit, IL-1 β und IL-6 zu sezernieren, aber produzierten vermehrt IL-10. Parallel dazu sank die CD14-Expression in den Typ B-Kulturen stark ab. Die Expression der M2-Makrophagenmarker CD163 und CX3CR1 stieg hingegen signifikant an. Eine Vorinkubation der Typ B-Monozyten in statinhaltigem Medium verhinderte sowohl den Rückgang der IL-1 β - und IL-6-Sekretion als auch den Anstieg der Makrophagenmarker. Der CD14-Verlust war unter Statin hingegen verstärkt. Eine Auswirkung von Statin auf die Sterberate der Zellen konnte nicht festgestellt werden.

Die Ergebnisse deuten auf eine spontane Differenzierung der Monozyten in M2-Makrophagen hin. Dieser Vorgang konnte durch die Anwesenheit von Fluvastatin während der Vorinkubation verhindert werden. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmalig den unterschiedlichen Einfluss von Statinen auf frische Monozyten und vorinkubierte Monozyten (Makrophagen). Die hierbei dargestellte Fähigkeit der Statine, die Funktion und den Phänotyp von Monozyten aufrecht zu erhalten, könnte an den positiven pleiotropen Effekten von Statinen beteiligt sein.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Monozyten sind eine heterogene Population	1
1.2	Monozyten sind entscheidend an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt	3
1.3	Statine haben immunmodulatorische Eigenschaften	5
2.	Zielstellung	7
3.	Material und Methodik	8
3.1	Gewinnung humaner Monozyten	8
3.1.1	Kulturmedien und Zusätze	8
3.1.2	Isolation humaner Monozyten	8
3.2	Zellkultivierung	9
3.2.1	Anlage der Monozytenkultur	9
3.2.2	experimenteller Aufbau	10
3.3	Zellernte und -färbung	11
3.4	Durchflusszytometrie	12
3.4.1	Prinzip	12
3.4.2	Puffer und Antikörper	14
3.4.3	Messung	15
3.5	ELISA	18
3.5.1	Prinzip	18
3.5.2	Puffer und Reagenzien	19
3.5.3	Messung	19
3.6	Datenauswertung	20
4.	Ergebnisse	21
4.1	Monozyten sind potente Produzenten inflammatorischer Zytokine	21
4.2	Statin beeinflusst die Zytokinproduktion in den Typ A-Kulturen nicht	21
4.3	Typ B-Monozyten produzieren keine proinflammatorischen Zytokine	22
4.4	Statin erhält die Zytokinproduktion in den Typ B-Kulturen aufrecht	24
4.5	Die Hyporesponsivität der Typ B-Monozyten ist abhängig von der Dauer der Vorinkubation	26
4.6	Klassische CD14 ⁺ /CD16 ⁻ -Monozyten bilden die Hauptpopulation frisch isolierter Monozyten	27
4.7	LPS erhält den Phänotyp frisch isolierter Monozyten in der Kultur aufrecht	29
4.8	Statin ändert den Phänotyp der Typ A-Monozyten nur geringfügig	34
4.9	Vorinkubierte Monozyten exprimieren vermehrt M2-Makrophagenmarker	39
4.10	Statin blockiert die Differenzierung der Monozyten zu M2-Makrophagen	44
4.11	Statin erhöht nicht die Rate toter Zellen	49
5.	Diskussion	51
5.1	Vorinkubierte Monozyten sind hyporesponsiv gegenüber LPS	51

5.2	Frisch isolierte humane Monozyten sind CD14 ⁺ /CCR2 ⁺ /CD16 ⁻ /CX3CR1 ⁻	52
5.3	Vorinkubierte Monozyten differenzieren spontan zu M2-Makrophagen	54
5.4	Statine verhindern die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen	57
5.5	Limitationen	59
5.6	Ausblick	60
6.	Zusammenfassung	61
7.	Literaturverzeichnis	63
8.	Thesen	72
	Tabellarischer Lebenslauf	IV
	Selbstständigkeitserklärung	VI
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	VI
	Danksagung	VII

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
CD	Cluster of Differentiation
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Protein-4
DZ	Dendritische Zelle
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FKS	Fetales Kälberserum
FPP	Farnesylpyrophosphat
FSC	Forward scattered light, Vorwärtsstreulicht
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GMZ	Glatte Gefäßmuskelzellen
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
LSD	Least Significant Difference
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex
MNZ	Mononukleäre Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
RE	Relative Einheit
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPMI ^{xx}	FKS-, Glutamin- und Streptomycin-haltiges RPMI-Medium
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SSC	Side Scattered Light, Seitwärtsstreulicht
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VLA-4	Very Late Antigen-4
VLE-RPMI	Very low endotoxin-RPMI

1. Einleitung

1.1 Monozyten sind eine heterogene Population

Monozyten sind als Teil des angeborenen Immunsystems die primären Verteidigungszellen des menschlichen Organismus gegen Krankheitserreger. Sie zählen neben Lymphozyten, NK-Zellen und dendritischen Zellen (DZ) zu den peripheren mononukleären Blutzellen (MNZ) und haben an diesen einen Anteil von 10-25 %. Sie bekämpfen Mikroorganismen durch die Bildung proinflammatorischer Zytokine, reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO). Durch Ausschüttung von Chemokinen locken sie weitere Zellen des Immunsystems an. Zudem stellen sie eine Verbindung zum spezifischen Immunsystem dar, indem sie T- und B-Lymphozyten durch Antigenpräsentation und Zell-Zell-Interaktionen aktivieren. Sie sind auch an der Förderung der Neovaskularisation und bei Gewebereparaturvorgängen beteiligt (Saha und Geissmann, 2011; Boyette et al., 2017). Nach 1-3 Tagen in der Blutzirkulation wandern sie in Gewebe ein und differenzieren zu Makrophagen und dendritischen Zellen oder unterliegen der Apoptose.

Monozyten sind keine einheitliche Population, sondern bestehen aus verschiedenen Subtypen, die anhand von Oberflächenantigenen unterschieden werden. Hierzu werden der Lipopolysaccharid (LPS)-Korezeptor CD14 und der FcγIII-Rezeptor CD16 genutzt. Es existieren nach derzeitigem Wissensstand drei Subpopulationen, denen unterschiedliche Funktionen zugeschrieben werden. CD16-negative Monozyten mit einer starken CD14-Expression ($CD14^+/CD16^-$) werden als klassische oder inflammatorische Population bezeichnet, da sie vor allem proinflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1β, IL-6 und Tumornekrosefaktor α (TNF-α) produzieren, die T-Zell-Proliferation stimulieren und eine hohe phagozytotische Aktivität aufweisen (Grage-Griebenow et al., 2001; Boyette et al., 2017). Sie sind mit ca. 90 % aller humanen Monozyten die größte Subpopulation. CD16-positive Monozyten mit einer geringen CD14-Expression ($CD14^{dim}/CD16^+$) werden als nicht-klassische Population bezeichnet. Sie sind kleiner und weisen eine geringere Dichte auf als klassische Monozyten. Sie exprimieren mehr Major Histocompatibility Complex II (MHC-II)-Moleküle und sind damit effektiver bei der Antigenpräsentation (Grage-Griebenow et al., 2001). Sie exprimieren zudem viele Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 und VLA-4 und „patrollieren“ mithilfe dieser Moleküle entlang der Gefäßwand (Woollard und Geissmann, 2010; Zawada et al., 2012). Bei Gefäßwandschäden oder inflammatorischen Stimuli treten sie in die Gefäßwand ein. Während die nicht-klassischen Monozyten nur schwach auf bakterielle Stimuli reagieren, weisen sie eine hohe Zytokinausschüttung nach Stimulation mit Viruspartikeln auf (Cros et al., 2010). Als Übergangsform zwischen diesen beiden Populationen gelten CD16-positive Monozyten mit einer starken CD14-Expression ($CD14^+/CD16^+$). Diese als intermediär bezeichnete Population besitzt sowohl Eigenschaften von der klassischen als auch von der nicht-klassischen Monozytenpopulation (Wong et al., 2011). Sie sind potente

Zytokinproduzenten und gleichzeitig durch die Expression von MHC-II-Molekülen an der Antigenpräsentation und T-Zell-Stimulation beteiligt (Zawada et al., 2012). Bei Stimulation mit bakteriellen Antigenen wie LPS oder Pam3Cys produzieren sie sowohl proinflammatorische Zytokine wie TNF- α als auch das antiinflammatorische IL-10 (Skrzeczynska-Moncznik et al., 2008). Bei Atherosklerose wurde eine Zunahme der intermediären Monozyten-Subpopulation beobachtet (Chelombitko et al., 2014) und diese als positiver Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse wie Myokardinfarkt oder ischämischen Hirninfarkt angesehen (Berg et al., 2012).

Da die Existenz einer intermediären Monozytensubpopulation erst seit ca. 10 Jahren anerkannt ist und Berücksichtigung fand (Ziegler-Heitbrock et al., 2010), wurde in früheren Studien oft nur zwischen CD16-negativen und CD16-positiven Monozyten unterschieden. Letzteren wird eine Rolle bei inflammatorischen Erkrankungen zugeschrieben. So treten die CD16-positiven Monozyten z.B. bei Sepsis, rheumatoider Arthritis, HIV oder einem Erysipel gehäuft auf (Fingerle et al., 1993; Ziegler-Heitbrock 2007).

Alle drei Monozytenpopulationen sind in der Lage, zu Makrophagen zu differenzieren (Boyette et al., 2017). Darüber hinaus entwickeln sich Makrophagen, vor allem Gewebsmakrophagen wie Langerhans-Zellen, Kupffer-Zellen oder Mikrogliazellen, direkt aus dem embryonalen Dottersack und der fetalen Leber ohne eine monozytäre Zwischenstufe (Italiani und Boraschi, 2014). Auf Makrophagen, die nicht monozytären Ursprungs sind, wird in der vorliegenden Arbeit nicht eingegangen.

Verschiedene Einflussfaktoren wie das Mikroklima des umgebenden Gewebes und die darin enthaltenen Zytokine und Wachstumsfaktoren entscheiden über den Subtyp der Makrophagen. Je nach ihrer Funktion werden M1- und M2-Makrophagen unterschieden. M1-Makrophagen gelten als inflammatorische Effektorzellen, da sie hohe Mengen antimikrobieller Stoffe wie ROS und NO und proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und TNF- α bei Stimulation mit bakteriellen Endotoxinen ausschütten und die Th1-Zellproliferation stimulieren. M2-Makrophagen produzieren die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β und sind an der Begrenzung inflammatorischer Prozesse sowie an Reparaturvorgängen im Gewebe und an der Neovaskularisation beteiligt (Italiani und Boraschi, 2014). Für die *in vitro*-Differenzierung existieren verschiedene Protokolle zur Generierung spezifischer Makrophagen-Subtypen. M1-Makrophagen entstehen vorrangig durch Stimulation der Monozyten mit Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF), LPS und Interferon- γ (IFN- γ), während sich M2-Makrophagen durch Stimulation mit M-CSF und anschließende Aktivierung mit IL-4 und IL-13 (M2a), Immunkomplexen und Toll-Like Rezeptor (TLR)-Agonisten (M2b) oder IL-10, TGF- β und Glukokortikoiden (M2c) herausbilden. Neben Makrophagen können auch dendritischen Zellen aus Monozyten entstehen (Gieseler et al., 1998). Hierbei gilt vor allem die klassische Monozyten-Subpopulation als potenter DZ-Vorläufer (Boyette et al., 2017).

Zur Identifizierung von Makrophagen in peripheren Geweben und in Zellkulturen werden verschiedene Oberflächenmarker genutzt. Obwohl kein Oberflächenantigen existiert, das exklusiv nur einen Makrophagentyp charakterisiert, haben sich einige Marker für die Differenzierung der Makrophagen-Subtypen in der Fachwelt etabliert. Zu den M1-Makrophagenmarkern gehören u.a. der Scavenger-Rezeptor MARCO, die MHC-II-Moleküle der Klasse HLA-DP, -DQ, -DR und die kostimulatorisch wirkenden T-Zell-Liganden CD80 und CD86 (Stöger et al., 2012; Liberale et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit wurde CD86 zur Detektion von M1-Makrophagen genutzt. CD86 ist ein Transmembranmolekül aus der Immunglobulin-Superfamilie, das von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wie B-Zellen, Makrophagen oder dendritischen Zellen exprimiert wird. Bei Bindung des T-Zell-Rezeptors an ein Antigen, welches durch die APZ mittels MHC-Molekülen präsentiert wird, übt CD86 durch Bindung an die Moleküle CD28 oder CTLA-4 auf der T-Zelle einen T-Zell-aktivierenden oder T-Zell-supprimierenden Effekt aus (Hathcock et al., 1994).

Zu den M2-Makrophagenmarkern zählen u.a. der Mannoserezeptor CD206, der Scavenger-Rezeptor CD163 und der Fraktalkin-Rezeptor CX3CR1. CD163 gehört zu den Muster-erkennenden Rezeptoren (engl. PRR, pattern recognition receptor) und findet sich nach bisherigen Erkenntnissen nur auf Monozyten und Makrophagen. Es bindet den Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex im Blut und schützt so vor der Bildung freier Radikale durch freies Hämoglobin (Fabriek et al., 2005). Darüber hinaus wird auch eine antiinflammatorische Rolle des Rezeptors vermutet, da er sich gehäuft an Orten der chronischen Inflammation und nach Behandlung der Zellen mit Glukokortikoiden findet (Van den Heuvel et al., 1999). Die Oberflächenantigene CD86 und CD163 finden sich beide in atherosklerotischen Plaques und sind mit einem Progress von Atherosklerose assoziiert (Stöger et al., 2012).

1.2 Monozyten sind entscheidend an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt

Atherosklerose ist die Hauptursache von kardiovaskulären Ereignissen wie Herzinfarkten, Schlaganfällen oder Extremitätenischämien und damit die Haupttodesursache in Europa (Loyola et al., 2012). Ihre Bildung wird durch Dyslipoproteinämie, arteriellen Bluthochdruck, Bildung freier Radikale z.B. aufgrund Zigarettenrauchens und durch Homocysteinämie begünstigt. Seit langem wird Atherosklerose jedoch vor allem als inflammatorische Erkrankung angesehen, die durch eine überschießende Immunantwort des menschlichen Organismus auf Alterationen der Gefäßwand entsteht (Ross, 1999). Vor diesem Hintergrund wurde die Rolle von Monozyten bei der Pathogenese atherosklerotischer Läsionen zunehmend Gegenstand der Forschung. Nach heutigen Erkenntnissen gehören Monozyten zu den Hauptakteuren bei der Entstehung und dem Progress von Atherosklerose. Nach der sog. „response-to-injury“-Hypothese wandern Monozyten bei Störungen der Gefäßwandintegrität in die Intima mittlerer und großer Arterien ein. Als Auslöser einer Gefäßwandschädigung werden sowohl endogene Faktoren wie ein gestörter Blutfluss oder eine Akkumulation von LDL-Partikeln in der Gefäßwand als auch

exogene Faktoren wie eine Endothelzellschädigung durch Bakterienendotoxine oder virale Antigene angesehen. Die Migration der Monozyten wird durch die Interaktion von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. dem Integrinliganden Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) und den Integrinrezeptoren Very Late Antigen-4 (VLA-4) und Lymphocyte Function-associated Antigen-1 (LFA-1), zwischen Endothelzellen und Monozyten vermittelt. Die Expression solcher Adhäsionsmoleküle ist an Stellen eines gestörten Blutflusses verstärkt (Brooks et al., 2002). Neben Monozyten wandern auch T-Lymphozyten in die Gefäßwand ein (Hansson und Libby, 2006). Beide sind in der Lage, Chemokine wie CCL2 (MCP-1) zu produzieren und durch deren Bindung an monozytären Chemokinrezeptoren die Zellrekrutierung zu fördern. Mausstudien zeigen, dass die Migration der Monozyten vor allem durch die Chemokinrezeptoren CCR2, CX3CR1 und CCR5 und ihren entsprechenden Liganden vermittelt wird (Combadière et al., 2008). Mit zunehmendem Progress der atherosklerotischen Plaque exprimieren auch glatte Gefäßmuskelzellen Chemokine und VCAM-1 und übernehmen somit die Chemotaxis weiterer Immunzellen (Hansson und Libby, 2006). Die eingewanderten Monozyten produzieren große Mengen proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und IL-6 und aktivieren dadurch T-Lymphozyten, Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen. Es kommt zur Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen und zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion durch positive Feedbackmechanismen (Loppnow et al., 2011a).

Im subendothelialen Raum differenzieren die Monozyten unter Einfluss von M-CSF, welches von Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen produziert wird, zu Makrophagen. Diese nehmen mittels Phagozytose oxidierte LDL-Partikel (oxLDL) auf und werden somit zu sogenannten Schaumzellen. Extrazelluläres oxLDL stimuliert außerdem die Zytokinausschüttung der Makrophagen durch Bindung an Toll-like-Rezeptoren und unterhält damit den inflammatorischen Prozess (Chávez-Sánchez et al., 2010).

Durch Akkumulation von Immunzellen und die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen wächst die atherosklerotische Plaque. Die glatten Gefäßmuskelzellen produzieren extrazelluläre Matrixproteine, insbesondere Kollagene, wodurch sich eine bindegewebsartige subendotheliale Schicht bildet. Im Kern dieser Schicht entsteht ein lipidreiches, nekrotisches Zentrum durch selbstinduzierte Apoptose oder Hypoxie-bedingte Nekrose von Schaumzellen, Lymphozyten und anderen Immunzellen. Gleichzeitig induzieren Zytokine die Produktion von Metalloproteinasen, wie Kollagenase oder Elastase, welche zu einem Abbau der extrazellulären Matrix und damit zum Ausdünnen der Bindegewebsschicht führen (Ross, 1999). Bei erhöhten mechanischen Belastungen, wie z.B. arteriellem Bluthochdruck, kann diese einreißen, wodurch es zu einer Exposition prothrombogenen Materials in die Blutbahn kommt. Dies führt zur Auslösung der Gerinnungskaskade und damit letztlich zu einem thrombotischen Verschluss des Gefäßes. Derartige Plaquerupturen sind der Hauptauslöser für kardiovaskuläre Ereignisse wie z.B. einen Myokardinfarkt. Welche Faktoren zur Stabilisierung bzw. Instabilisierung der atherosklerotischen Plaque führen, ist noch nicht abschließend geklärt. Eine starke Aktivierung von Th1-Zellen mit konsekutiver Bildung der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α

gilt als proatherosklerotisch und plaque-destabilisierend (Hansson und Libby, 2006). Eine vermehrte Bildung regulatorischer T-Zellen (Treg) und der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β wird hingegen als atheroprotektiv angesehen. Aktuelle therapeutische Strategien zielen auf eine Hemmung des Entzündungsprozesses und damit eines Fortschreitens der Atherosklerose ab. So wird zum Beispiel durch eine Beschichtung koronarer Stents mit dem Immunsuppressivum Sirolimus der lokale Entzündungsprozess unterdrückt und eine Restenose nach perkutaner Koronarintervention (PCI) verhindert (Morice et al., 2002).

Die meisten Erkenntnisse über die Pathogenese der Atherosklerose entstammen Tierstudien. Zur Erforschung der Faktoren, die zur Atherosklerose im Menschen führen, werden oft *in vitro*-Studien genutzt. Ein hierbei etabliertes Modell ist die Kokultur aus Monozyten oder mononukleären Zellen (MNZ) und glatten Gefäßmuskelzellen (GMZ). In diesen Kokulturen konnte nach Stimulation mit dem Bakterienendotoxin LPS eine überadditive Produktion von IL-6 und MCP-1 festgestellt werden, die auf eine gegenseitige Verstärkung der Zytokinproduktion schließen lässt (Chen et al., 2009). Bei Stimulation der Kokulturen mit 25-Hydroxycholesterol wurde ebenfalls eine synergistische Zytokinproduktion nachgewiesen, obwohl das Cholesterol keine messbare Zytokinproduktion induzierte, wenn die beiden Zellsorten getrennt voneinander kultiviert wurden (Fu et al., 2014). Über den Phänotyp der daran beteiligten Monozyten ist bisher wenig bekannt. Während die Verteilung der Monozyten-Subpopulationen in frisch isoliertem Spenderblut zu Beginn einer Zellkultivierung bereits gut erforscht ist, gibt es bisher kaum Angaben in der Fachliteratur über die Verteilung der Subpopulationen in Zellkulturen. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung der kultivierten Monozyten mittels Bestimmung verschiedener Oberflächenmarker, die sowohl eine Unterscheidung der einzelnen o.g. Monozytenpopulationen als auch den Nachweis von Differenzierungsvorgängen erlauben.

1.3 Statine haben immunmodulatorische Eigenschaften

Aufgrund des evidenten Zusammenhangs zwischen erhöhten Cholesterinspiegeln und dem Auftreten von Atherosklerose gelten cholesterinsenkende Medikamente als Mittel der Wahl zur Primär- und Sekundärprophylaxe kardiovaskulärer Ereignisse. Hierbei haben sich Statine als effektive Cholesterinsenker etabliert. Diese Medikamente blockieren über die Hemmung des Enzyms 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) die Cholesterinsynthese in der Leber. Durch eine kompensatorische Erhöhung der LDL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche werden vermehrt LDL-Partikel in die Zellen aufgenommen und so der LDL-Plasmaspiegel gesenkt. Neben der cholesterinsenkenden Wirkung nehmen Statine durch die Hemmung der Isoprenoidsynthese auch Einfluss auf die posttranslationale Modifizierung von Proteinen (Zhou und Liao, 2010). Als Zwischenprodukte der Cholesterinsynthese entstehen u.a. Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und Farnesylpyrophosphat (FPP), welche als Substrate zur Isoprenylierung kleiner G-Proteine beitragen. Durch die Hemmung der

Isoprenylierung werden intrazelluläre Signalkaskaden blockiert, welche die Zytokinproduktion von Monozyten beeinflussen. Über die Wirkung der Statine auf die Zytokinproduktion der Monozyten finden sich in der Literatur jedoch teils widersprüchliche Angaben. Während in einigen Studien ein Anstieg der IL-1 β -, MCP-1- und TNF- α -Produktion nach Behandlung der Zellen mit Statinen beschrieben wurde (Kiener et al., 2001; Kuijk et al., 2008), zeigte sich in anderen Arbeiten eine Reduktion der Zytokinproduktion (Lindholm und Nilsson, 2007; Nakagomi et al., 2012). In dem oben erwähnten Kokulturmodell aus mononukleären Zellen und glatten Gefäßmuskelzellen wurde die synergistische IL-6-Produktion durch Statine gehemmt (Loppnow et al., 2011b).

Darüber hinaus werden Statinen weitere atheroprotektive Effekte wie eine vermehrte NO-Produktion, eine Hemmung der Proliferation von GMZ und eine verminderte Migration von Immunzellen in atherosklerotische Plaques durch eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen zugeschrieben (Zhou und Liao, 2010). Wenig ist jedoch bisher über die Auswirkung von Statinen auf den Phänotyp der Monozyten bekannt. Sasidhar et al. zeigten, dass Statin die Differenzierung von THP-1-Zellen in Makrophagen verhinderte, was mit einer verminderten CD14-Expression einherging (Sasidhar et al., 2017). Weber et al. wiesen eine Steigerung der CD14-Expression auf der monozytären Leukämiezellreihe Mono-Mac-6 durch die Behandlung mit Lovastatin nach und werteten dies als Zeichen einer Differenzierung der Zellen in Makrophagen (Weber et al., 1995). Esfahani et al. konnten hingegen keine Änderung der CD14-Expression auf humanen Monozyten durch die Behandlung mit Lovastatin feststellen (Esfahani et al., 1993). Die Datenlage über den Einfluss von Statin ist demzufolge ebenfalls bezüglich der Antigenexpression von Monozyten inkonsistent. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen einer Statinbehandlung von Monozyten *in vitro* auf die Zytokinproduktion und die Expression der o.g. Oberflächenantigene untersucht. Es sollte geprüft werden, ob und inwiefern Statine Einfluss auf die Monozyten-Subpopulationen und die Zelldifferenzierung nehmen.

2. Zielstellung

Atherosklerose ist die Hauptursache für kardiovaskuläre Ereignisse und damit die Haupttodesursache in den westlichen Industrienationen. Sie gilt als inflammatorische Erkrankung, an der Monozyten und Makrophagen als Vertreter des angeborenen Immunsystems maßgeblich beteiligt sind. Diese Zellen fördern durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine die Entstehung und den Progress der Atherosklerose. In vorangegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass sich im *in vitro*-Modell frisch isolierte Monozyten in ihrer Responsivität auf den Stimulus LPS von vorinkubierten Monozyten unterscheiden. Es sollte daher die Produktion ausgewählter Zytokine zwischen sofort stimulierten (Typ A) und vorinkubierten (Typ B) Monozyten verglichen werden. Des Weiteren sollte der Phänotyp der daran beteiligten Monozyten charakterisiert werden. Hierzu sollte mittels Durchflusszytometrie die Expression ausgewählter Oberflächenantigene untersucht werden. Unter der Annahme, dass während der Vorinkubation Differenzierungsvorgänge einsetzen, sollte mithilfe von Makrophagenmarkern analysiert werden, ob und in welche Richtung sich die Monozyten differenzieren.

Statine sind eines der am häufigsten eingesetzten Arzneistoffe bei Bestehen und zur Prophylaxe von Atherosklerose. Ihnen werden neben der cholesterinsenkenden Wirkung auch immunmodulatorische Effekte zugeschrieben. Daher sollte der Einfluss von Statin auf die Zytokinproduktion und den Phänotyp der Monozyten in den hier genutzten Kulturmodellen untersucht werden. Widersprüchliche Ergebnisse früherer Studien über die Wirkung von Statinen auf die Monozytenfunktion ließen vermuten, dass die Dauer der Vorinkubation und damit der Einwirkzeit von Statinen eine entscheidende Rolle spielt. Es sollte daher untersucht werden, ob sich Statine unterschiedlich auf die hier verwendeten Monozyten ohne und mit Vorinkubation auswirken. Neben der Zytokinproduktion sollte auch der Effekt von Statinen auf die Antigenexpression untersucht werden. Durch den Vergleich statinfreier und statinhaltiger Kulturen sollte analysiert werden, ob Statine einen Einfluss auf die vermuteten Differenzierungsvorgänge ausüben.

Die vorliegende Arbeit soll zum Verständnis über Monozyten und ihre Funktionsweise beitragen und helfen, andere *in vitro*-Studien einzuordnen. Im weiteren Sinne könnte sie damit auch zum Verständnis der Pathogenese von Atherosklerose beitragen und damit womöglich Ansatzpunkte für therapeutische Strategien bieten. Des Weiteren soll sie einen Beitrag zur Aufklärung der pleiotropen Effekte von Statinen leisten.

3. Material und Methodik

3.1 Gewinnung humaner Monozyten

3.1.1 Kulturmedien und Zusätze

Alle Medien und Zusätze für die Kultivierung der Zellen wurden von der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) erstanden. Als Kulturmedium für die humanen Monozyten diente RPMI-1640 mit einem sehr geringen Endotoxin-Gehalt (very low endotoxin, VLE-RPMI). Dieses wurde vor der Verwendung jeweils mit 2 % Penicillin und Streptomycin versetzt, um ein Bakterienwachstum zu verhindern. Hinzugefügtes 2 %-iges L-Glutamin diente als Stickstoffquelle. Hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FKS) wurde entweder sofort oder zu einem späteren Zeitpunkt in 10 %-iger Konzentration dem Medium zugesetzt. FKS-haltiges, mit Antibiotika- und L-Glutamin-versetztes Medium wird im Folgenden mit „RPMI^{xxx}“ gekennzeichnet.

Zur Stimulation der Monozyten wurde Lipopolysaccharid des Bakteriums *Salmonella enterica* (Serovar Friedenau) genutzt, welches von Prof. Dr. H. Brade (Forschungszentrum Borstel) bereitgestellt wurde. Es wurde den Zellkulturen in einer Konzentration von 100 pg/ml zugesetzt. Zur Untersuchung des Statineinflusses kam Fluvastatin in einer Konzentration von 10 µg/ml zum Einsatz. Dieses wurde von der Firma Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) erworben.

3.1.2 Isolation humaner Monozyten

Als Quelle für humane Monozyten dienten buffy coats, die als Nebenprodukt bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten aus Vollblut entstehen. Diese wurden von der zentralen Blutspendebank des Universitätsklinikums Halle (Saale) aufbereitet und zur Verfügung gestellt. Das von uns verwendete Spenderblut stammte von jungen, gesunden, männlichen Probanden. Die Nutzung war durch die lokale Ethikkommission genehmigt. Alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilbank der Marke Heraeus (Schwerte, Deutschland) durchgeführt. Dadurch sollte eine Kontamination oder Schädigung der Zellen verhindert werden.

Zur Gewinnung der Monozyten wurden zunächst mononukleäre Zellen (MNZ) aus den buffy coats isoliert. Hierzu wurde die Dichtegradientenzentrifugation genutzt. Zur Vermeidung einer Thrombosierung wurden die buffy coats zunächst im Verhältnis 1:1 mit einer Pufferlösung (PBS, engl. phosphate buffered saline) verdünnt und mit unfraktioniertem Heparin versetzt. Anschließend wurden pro Zentrifugenröhrchen 25 ml der Trennlösung „Biocoll“ der Firma Biochrom mit dem verdünnten Spenderblut überschichtet. Alle Röhrchen wurden für 30 Minuten bei 400 x g (Beschleunigung 1, Abbremsung 0) zentrifugiert. Auf diese Weise sammelten sich die mononukleären Zellen ihrer Dichte folgend in einer schmalen Schicht

zwischen dem thrombozytenhaltigen Überstand und den zu Boden gesunkenen Granulozyten und Erythrozyten an. Der Überstand wurde vorsichtig mittels einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt. Die MNZ-haltige Schicht wurde mit einer Pipette abgenommen und in 10 ml RPMI^{xx} in einem frischen Zentrifugenröhrchen resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension wurde bei 200 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet resuspendiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, um eine möglichst reine und thrombozytenfreie MNZ-Population zu erhalten.

Da für die folgenden Experimente nur Monozyten benötigt wurden, wurden diese mittels CD14-microbeads der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) aus den MNZ isoliert. Dies sind gegen das Oberflächenmolekül CD14 gerichtete Antikörper, die an ein magnetisches Nanoteilchen gekoppelt sind. Lässt man CD14-tragende, mit den microbeads gekoppelte Zellen an einem Magneten entlang fließen, bleiben sie an diesem hängen und können so von den nicht CD14-tragenden Zellen separiert werden.

Die MNZ wurden zunächst in EDTA-haltiges PBS mit 2 %-igem FKS (MACS-Puffer) überführt und mit FcR-Blocking Reagent 10 Minuten inkubiert. Dies sollte verhindern, dass die Antikörper unspezifisch mit ihrem Fc-Teil an Fc-Rezeptoren der Zelloberfläche binden. Danach wurden die CD14-Microbeads in einer Konzentration von 20 µl pro 10×10^6 Zellen zugegeben und die Zellsuspension darin für weitere 15 Minuten inkubiert. Um noch ungebundene Microbeads und Zellen zu eliminieren, wurde die Zellsuspension anschließend in MACS-Puffer gewaschen. Danach wurde sie auf eine Filtersäule aufgetragen, welche an einem starken Magneten befestigt war. Während die CD14-positiven Zellen in dieser Säule zurückgehalten wurden, flossen die CD14-negativen Zellen hindurch und wurden in einem Röhrchen aufgefangen. Nachdem die komplette Zellsuspension die Filtersäule passiert hatte, wurde diese noch mehrfach mit MACS-Puffer gespült. Anschließend konnte sie vom Magneten entfernt und auf ein separates Röhrchen gestellt werden. Durch abermaliges Spülen mit 5 ml MACS-Puffer wurden die CD14-positiven Zellen aus dem Filter gelöst und in dem Röhrchen aufgefangen.

3.2 Zellkultivierung

3.2.1 Anlage der Monozytenkultur

Für die Monozytenkultur wurden 25 cm² große Flaschen der Firma Corning (Schwerte, Deutschland) genutzt. Diese wurden jeweils mit einem Gesamtvolumen von 5 ml befüllt, welches sich aus 3 ml RPMI, 500 µl Zellsuspension und 500 µl FKS zusammensetzte. Je nach Kulturbedingung wurden außerdem entweder je 500 µl Fluvastatin und LPS zugesetzt oder die fehlenden Volumina mit Medium (RPMI) ersetzt.

Zur Herstellung der Zellsuspension wurde die nach der Isolation gewonnene Monozytensuspension bei 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert, der überstehende MACS-Puffer

abgesaugt und das Zellpellet in 5ml RPMI^{xx} resuspendiert. Zur Quantifizierung der gewonnenen Zellzahl wurde eine repräsentative Probe der Zellsuspension abgenommen und mit Trypanblau versetzt. Die Zellen wurden anschließend in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Mithilfe des bekannten Volumens der Zellsuspension wurde die Gesamtmenge der zur Verfügung stehenden Zellen wie folgt berechnet:

Gesamt-Zellzahl = gezählte Zellzahl x 2500 (Kammerfaktor) x Verdünnungsfaktor mit Trypanblau x Volumen der Zellsuspension

Ebenso wurden separat die mit Trypanblau angefärbten Zellen gezählt. Dieser Farbstoff gelangt nur ins Zellinnere, wenn die Zellmembran einen Defekt aufweist, wie es bei einem beginnenden Zelltod der Fall ist. So konnte die Rate der toten Zellen ermittelt werden. Diese lag vor der Kultivierung stets unter 5 %. Da die Ausbeute der gewonnenen Monozyten variierte, schwankte die Zellkonzentration in den Kulturflaschen zwischen 50.000 und 95.000 Zellen/cm². Nach Befüllung der Flaschen wurden diese im Wärmeschrank bei 37 °C mit 7,5 % CO₂-Anteil für 24 – 48 Stunden inkubiert.

3.2.2 Experimenteller Aufbau

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von LPS, von Fluvastatin und der Dauer der Vorinkubationszeit auf die Zytokinproduktion und die Antigenexpression der Monozyten untersucht. Ein Experiment erstreckte sich über drei Tage (Abb. 1). Am ersten Tag erfolgte die Monozytenisolation und Bestückung der Zellkulturflaschen. Dabei wurden die Monozytenkulturen zu gleichen Teilen auf zwei Gruppen, A und B, aufgeteilt. Beide Gruppen wurden wiederum in statinfreie und statinhaltige Kulturen unterteilt. Den statinhaltigen Kulturen wurde Fluvastatin zugegeben, die statinfreien Kulturen erhielten eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx}. Die Typ A-Monozyten wurden im Anschluss sofort mit LPS stimuliert (+ LPS) oder erhielten abermals eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (- LPS). Die Typ B-Monozyten wurden zunächst für 24 Stunden in dem statinfreien oder statinhaltigen Medium vorinkubiert. Am zweiten Tag wurden die Kulturflaschen der Gruppe B ebenfalls mit LPS bzw. mit RPMI^{xx} versetzt. Die Zellen der Gruppe A wurden bereits geerntet. Am dritten Tag erfolgte die Ernte der Typ B-Kulturen. Die geernteten Zellen wurden jeweils am gleichen Tag gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Überstände der Zellkulturen wurden eingefroren und ihr Zytokingehalt zu einem späteren Zeitpunkt mittels ELISA gemessen.

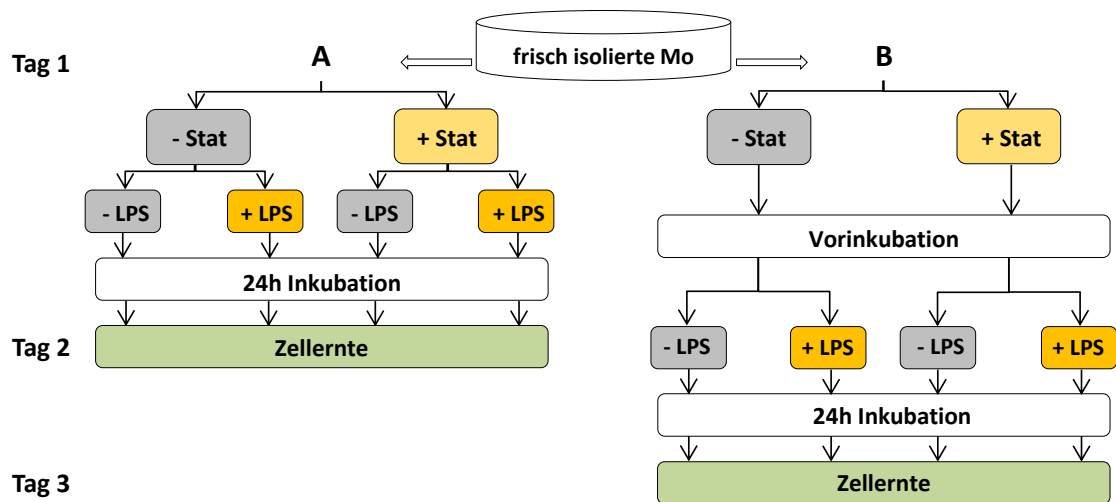


Abb. 1: Experimenteller Aufbau. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und auf zwei Kulturmodelle aufgeteilt. Sowohl von den Typ A- als auch den Typ B-Monozyten erhielt die Hälfte Fluvastatin (+ Stat). Typ A-Monozyten wurden anschließend sofort stimuliert (+ LPS) bzw. erhielten eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (- LPS). Typ B-Monozyten wurden hingegen erst vorinkubiert und danach stimuliert. Die Zellernte erfolgte jeweils nach 24 Stunden Inkubationszeit mit dem Stimulus.

3.3 Zellernte und -färbung

Die teilweise am Boden der Kulturflasche anhaftenden Monozyten wurden mit einem Zellscripper gelöst und der Flaschenboden mehrere Male mit dem zellhaltigen Medium gespült. Die Zellsuspension wurde schließlich vollständig mit einer Pipette aufgenommen und in sterile Röhrchen überführt. Zwischen allen im Folgenden beschriebenen Schritten wurden die Zellen auf Eis gelagert. Nach der Ernte wurden die Zellen wie oben beschrieben gezählt und zentrifugiert (300 x g, 10 min). Anschließend wurde das überstehende Kulturmedium mit einer Pipette in ein neues Röhrchen überführt, um es für spätere ELISA-Messungen aufzubewahren. Das zurückbleibende Zellpellet wurde in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert und die so entstandene Zellsuspension je nach Anzahl der verwendeten Antikörperkombinationen auf mehrere FACS-Röhrchen verteilt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und die Überstände vorsichtig abgekippt. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 µl MACS-Puffer resuspendiert. Vor der Zellfärbung wurde zunächst 2 µl FcR-Blocking Reagent zugegeben und die Monozyten wurden damit 10 Minuten inkubiert, um unspezifische Bindungen der Fluoreszenz-Antikörper zu verhindern. Daraufhin folgte die Zugabe von je 5 µl der Farbstoff-gekoppelten Antikörper. Die Zellsuspension wurde anschließend kurz gevortext und für 20 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die gefärbten Zellen im Anschluss mit MACS-Puffer gewaschen. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und das Zellpellet schließlich in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Hierin wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht.

3.4 Durchflusszytometrie

3.4.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie ermöglicht qualitative und quantitative Messungen verschiedener Moleküle, die sich auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren befinden. Dazu muss das entsprechende Antigen mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert werden. Dies geschieht meist über monoklonale Antikörper, an die der Farbstoff gekoppelt ist und die gezielt an das zu untersuchende Antigen binden.

Um das Fluoreszenzsignal detektieren zu können, muss der Farbstoff mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt (Exzitation) und die Intensität seiner Strahlung (Emission) gemessen werden. Ein Durchflusszytometer besteht daher aus einem oder mehreren Lasern, die die Fluoreszenzmoleküle anregen und mehreren Photomultipliern, die das emittierte Licht detektieren und in ein elektrisches Signal umwandeln. Linsen und Spiegel sorgen für eine möglichst geringe Streustrahlung und Fokussierung des Lichts.

Neben der Messung von Fluoreszenzsignalen werden auch die Größe und die Granularität einer Zelle bestimmt. Dies geschieht durch Detektoren, die sich zum einen direkt gegenüber der Lichtquelle befinden und somit das Licht aufnehmen, das an der Zelle vorbei streut (engl. FSC, forward scattered). Damit kann auf die Größe einer Zelle geschlossen werden. Zum anderen sind auch Detektoren im 90° Winkel zur Lichtquelle angebracht, die das seitwärts streuende Licht aufnehmen (engl. SSC, sideward scattered). Dieses ist abhängig von der Komplexität und inneren Struktur einer Zelle und lässt somit grob auf ihre Granularität schließen.

Anhand der Zelleigenschaften lassen sich Zellen durch bestimmte Geräte auch sortieren. Daher werden Durchflusszytometer im Englischen als „fluorescence-activated cell-sorter“ (FACS) bezeichnet. Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine Zellsortierung vorgenommen wurde, wird die Abkürzung FACS an einigen Stellen gebraucht. In der vorliegenden Arbeit wurde ein LSRFortessaTM der Firma Becton Dickinson verwendet, welcher vier Lasern besitzt, die Licht im blauen, roten, violetten und ultravioletten Bereich aussenden können.

Durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich parallel mehrere Antigene einer Zelle gleichzeitig messen. Dadurch ergeben sich jedoch Ungenauigkeiten in der Messung durch Überlappung der Emissionsspektren. So kann das Fluoreszenzsignal eines Farbstoffes teilweise in den Detektionsbereich eines anderen Farbstoffes hineinstrahlen. Um dennoch ein annähernd wirklichkeitsgetreues Ergebnis zu erhalten, müssen die Signale kompensiert werden. Dabei wird der prozentuale Anteil eines Farbstoffes an der Intensität eines anderen herausgerechnet. Dies kann entweder manuell erfolgen oder vor einer Messung vom Gerät mittels einzeln gefärbter Zellen berechnet werden.

Für die durchflusszytometrische Analyse wird eine repräsentative Probe der Zellkultur in ein spezielles Röhrchen (FACS-Röhrchen) überführt. Dieses wird auf ein Ansaugröhrchen gesteckt, das die Zellsuspension einem durch das Gerät fließenden Hüllstrom aus Pufferflüssigkeit zuführt. In diesem werden die Zellen einzeln im rechten Winkel an den Lasern vorbeigeführt. Die dabei detektierten Lichtsignale werden in elektrische Signale umgewandelt und durch eine entsprechende Software in einer Datei gespeichert. Die gewonnenen Daten werden in der Regel in zweidimensionalen Diagrammen, sog. Dot-Plots, dargestellt (Abb. 2). In diesen ist die Fluoreszenzintensität eines Antikörpers bzw. eine physikalische Zelleigenschaft jeweils einem anderen Antikörper oder physikalischen Größe gegenübergestellt. Die Werte der Fluoreszenzsignale werden dabei meistens auf einer logarithmischen Skala aufgetragen, da ihre Bandbreite von schwachen bis sehr starken Signalen reicht. Die Werte der Zellgröße oder -granularität sind linear aufgetragen. Eine Zelle entspricht einem Punkt im Diagramm. Häufen sich die Punkte an einer bestimmten Stelle, lässt sich eine Korrelation zwischen den dargestellten Parametern vermuten und so evtl. Populationen definieren. Liegen die Punkte über das gesamte Diagramm verstreut, ist eine Korrelation unwahrscheinlich.

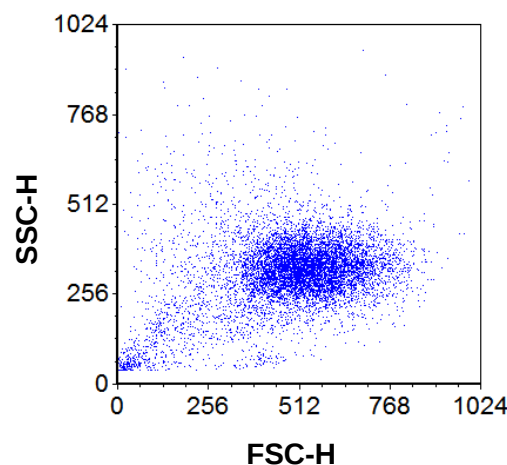


Abb. 2: Darstellung von Zellen in einem Dot-Plot anhand ihrer physikalischen Eigenschaften. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Anhand ihrer Zellgröße (FSC-H) und Zellgranularität (SSC-H) wurden sie in einem zweidimensionalen Diagramm dargestellt.

Eine weitere Möglichkeit der Darstellung sind Histogramme. In diesen werden alle Zellen, die in der gleichen Intensitätsstärke fluoreszieren, zusammengefasst und ihre Anzahl grafisch dargestellt (Abb. 3). So lässt sich die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzsignale abbilden.

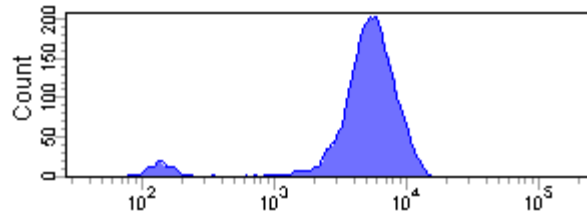


Abb. 3: Darstellung der Fluoreszenzintensität von Zellen in einem Histogramm. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert, gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Alle Zellen, die die gleiche Fluoreszenzintensität für einen bestimmten Marker aufwiesen, wurden zusammengefasst und ihre Zellzahl der Fluoreszenzintensität in einem Diagramm gegenübergestellt.

Zur Auswertung der Daten lassen sich bestimmte Bereiche in einem Diagramm markieren, die von Interesse sind. Anschließend können untergeordnete Diagramme erstellt werden, auf denen andere Eigenschaften angezeigt werden und in welchen nur die Zellen des zuvor ausgewählten Bereichs zur Darstellung kommen. Auf diese Art können Zellen nach den gewünschten Eigenschaften selektiert werden. Des Weiteren ist es möglich, ein Diagramm in Abschnitte zu unterteilen, wodurch sich ebenfalls Bereiche bestimmter Signalstärken abgrenzen lassen. Die absolute und relative Häufigkeit an Zellen in diesem Bereich lässt sich durch die Auswertungssoftware berechnen. Ebenso können Mittelwerte und Streuungsmaße angezeigt werden.

3.4.2 Puffer und Antikörper

Zum Färben der Zellen wurde MACS-Puffer aus EDTA-haltigem PBS und 2 % FKS verwendet (s. 3.1.2). Die farbkodierten Antikörper waren gegen humane Antigene gerichtet und stammten von Miltenyi, BD oder BioLegend (Tab. 1). Die zugehörigen Isotypen-Kontrollen wurden jeweils vom selben Hersteller erworben. FcR-Blocking Reagent stammte von Miltenyi. Zum Ausschluss toter Zellen aus der Analyse wurde 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) verwendet. Dieses dringt in Zellen mit defekter Zellmembran ein und interkaliert in die Zell-DNA. Dadurch wird die Eigenfluoreszenz der Zelle verändert, was sich durchflusszytometrisch detektieren lässt.

Tab. 1: Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Farbstoff	Ig-Klasse	Hersteller	Klon
CD11b	PE ^a	mIgG2b	Miltenyi	M1/70.15.11.5
	FITC ^b	mIgG2b	Miltenyi	M1/70.15.11.5
CD14	PE	mIgG2a	Miltenyi	TÜK4
	FITC	mIgG2a	Miltenyi	TÜK4
CD16	APC ^c	mIgM	Miltenyi	VEP13
CD86	PE	mIgG1	BD Pharmingen	2331 (FUN-1)
CD163	APC	mIgG1	BioLegend	GHI/61
CD192 (CCR2)	PE	mIgG2a	BioLegend	K036C2
CX3CR1	PerCP-Cy5.5 ^d	rIgG2b	BioLegend	2A9-1
7AAD	-	-	BD Pharmingen	-

^a Phycoerythrin; ^b Fluoresceinisothiocyanat; ^c Allophycocyanin; ^d Peridinin-Chlorophyll Protein-Complex-Cyanine

3.4.3 Messung

Für die Genauigkeit der Messungen war es wichtig, Einzelzellen zu erfassen. Dubletten und Zellverbände wurden daher aus der Analyse ausgeschlossen. Hierzu wurden die Zellen zunächst in einem Diagramm dargestellt, in dem das Maximum des Größensignals (FSC-H) der Fläche dieses Signals (FSC-A) gegenübergestellt war. Dabei ordneten sich einzelne Zellen proportional auf einer Linie an. Zellen, die außerhalb dieser Linie lagen, wiesen eine größere Fläche auf und ließen sich daher als Zellhaufen identifizieren. Durch Markierung des linearen Bereiches mithilfe eines „Gates“ (P1) wurden die zu analysierenden Zellen definiert und die außerhalb liegenden Zellaggregate ausgeschlossen (Abb. 4).

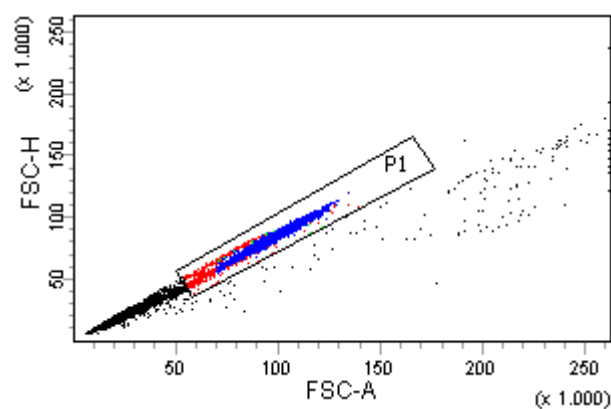


Abb. 4: Ausschluss von Zellverbänden. Die Fluoreszenzsignale der Monozyten wurden anhand ihres Höchstwertes (FSC-H) und der Fläche ihres Größensignals (FSC-A) in einem zweidimensionalen Diagramm aufgetragen. Einzelzellen ordneten sich dabei auf einer Linie an. Zellaggregate wurden durch Markierung der linear angeordneten Zellen mittels eines Gates (P1) ausgeschlossen.

Im zweiten Schritt wurde die Population der Monozyten anhand ihrer physikalischen Eigenschaften aufgesucht. Hierzu wurde ein zweidimensionales Diagramm aus „Forward Scatter“ (FSC) und „Sideward Scatter“ (SSC) erstellt, in dem sich die Monozyten im mittleren Granularitätsbereich zwischen den kleineren Lymphozyten und den größeren Granulozyten auffinden ließen. Die entsprechende Region wurde als Gate (P2) markiert (Abb. 5).

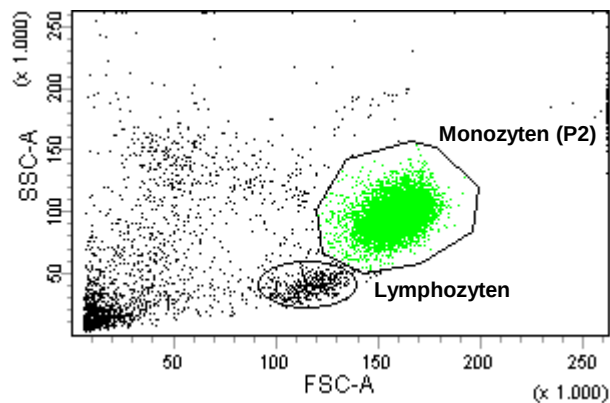


Abb. 5: Eingrenzen der Monozytenpopulation. Humane Monozyten wurden durchflusszytometrisch untersucht. Anhand ihrer Größe (FSC) und Zellgranularität (SSC) wurden sie in einem zweidimensionalen Diagramm dargestellt. Die Monozytenpopulation wurde durch Markierung mit einem Gate (P2) eingegrenzt.

Im Anschluss wurde diese Population durch den Ausschluss 7AAD-positiver Zellen auf vitale Zellen begrenzt (Abb. 6). Dies geschah mithilfe eines dritten Diagramms, in dem der Monozytenmarker CD14 und das Fluoreszenzsignal von 7AAD gegenübergestellt waren. Darin wurden durch ein weiteres Gate (P3) alle 7AAD-positiven Zellen ausgeschlossen

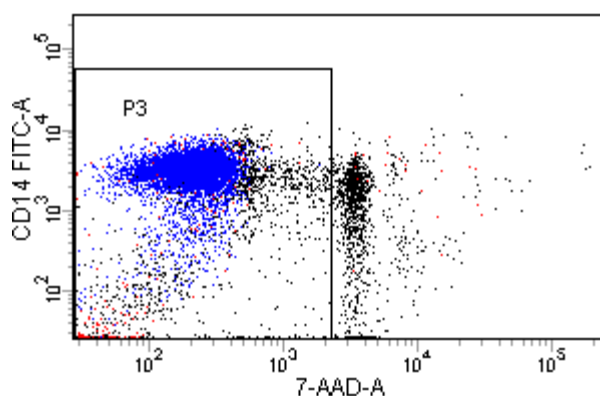


Abb. 6: Ausschluss toter Zellen durch Eingrenzung der 7AAD-negativen Zellen. Humane Monozyten wurden mit CD14-FITC und 7AAD gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Ihre Fluoreszenzintensität wurde logarithmisch in einem zweidimensionalen Diagramm aufgetragen. Durch Eingrenzen der 7AAD-negativen Zellen wurden tote Zellen aus den nachfolgenden Analysen ausgeschlossen.

Anschließend wurden weitere, untergeordnete Diagramme erstellt, in denen nur noch die lebenden Zellen zur Darstellung kamen. In diesen wurde auf der y-Achse meistens der Marker für CD14 gewählt und auf der x-Achse ein zweiter Marker, z.B. für CD16 oder CD163, gegenübergestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Zellpopulation als „positiv“ für ein Antigen bezeichnet, wenn sie von dem dazugehörigen Antikörper mit einer bestimmten Fluoreszenzintensität angefärbt wurde. „Negativ“ wurden Zellen bezeichnet, die keine oder nur eine geringfügige Fluoreszenzintensität aufwiesen. Zur Ermittlung der Grenze zwischen positivem und negativem Bereich wurden Isotyp-Kontrollen genutzt. Isotypen sind Antikörper, die nicht gezielt gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet sind oder mit Antigenen reagieren, die im menschlichen Organismus nicht vorkommen. Sie gehören derselben Unterklasse an wie der verwendete gerichtete Antikörper und haben den gleichen Farbstoff gekoppelt. Auf diese Art lässt sich der Bereich der unspezifischen Fluoreszenz bestimmen, die der Antikörper allein ohne Antigenbindung hervorruft. Fluoreszenzsignale, deren Intensität über die der Isotypen hinaus reichte, wurde auf eine spezifische Antigen-Fluoreszenzantikörper-Bindung zurückgeführt. Die so ermittelte Grenze zwischen unspezifischer und spezifischer Fluoreszenz wurde in den Diagrammen markiert. Dadurch entstanden vier Quadranten (Abb. 7). Im oberen rechten Quadranten befanden sich demzufolge die Zellen, die für beide dargestellten Marker positiv waren. Dieses Verfahren wurde u.a. bei der Einteilung der Monozytenpopulationen anhand ihrer CD14- und CD16-Expression genutzt.

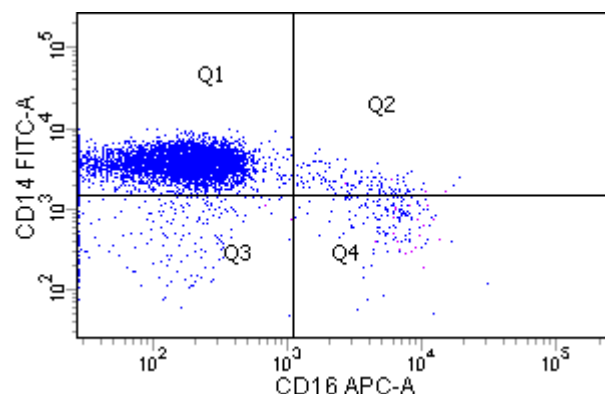


Abb. 7: Abgrenzung des positiven Bereichs eines Zellmarkers in Quadranten. Humane Monozyten wurden mit CD14-FITC und CD16-APC gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Ihre Fluoreszenzintensität wurde logarithmisch in einem zweidimensionalen Diagramm aufgetragen. Anhand von Isotypen-Kontrollen wurden die Grenzen zwischen spezifischer und unspezifischer Fluoreszenz bestimmt. Durch Ziehen einer Linie an dieser Grenze entstanden vier Quadranten (Q1-4).

Zur Ermittlung der mittleren Fluoreszenzintensität (engl. MFI, Mean fluorescence intensity) wurde eine Zellpopulation mit einem Gate markiert und ihre Fluoreszenzsignale in einem Histogramm dargestellt. Durch die Software wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der Fluoreszenzintensität berechnet. Hierzu wurde der geometrische

Mittelwert (engl. Geometric mean) genutzt, um einzelne nach oben abweichende Werte nicht zu stark ins Gewicht fallen zu lassen.

3.5 ELISA

3.5.1 Prinzip

Beim Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) werden Antigene durch spezifische Antikörper detektiert. An diese bindet ein sekundärer Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist. Dieses Enzym reagiert mit einem Substrat, wodurch es zu einem Farbumschlag kommt. Da mit der Zeit das gesamte Substrat auch von einer nur geringen Menge Enzym umgesetzt wird, muss die Reaktion nach Erreichen eines ausreichenden Kontrasts zwischen antigenhaltigen und antigenfreien Proben gestoppt werden. Im Anschluss wird die Intensität des Farbumschlags photometrisch bestimmt. Durch Nutzung von Standardkurven aus definierten Antigenkonzentrationen können auch quantitative Messungen durchgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA genutzt. Bei diesem wird das Antigen von zwei Antikörpern detektiert, die an unterschiedlichen Stellen des Antigens binden (Abb. 8). Dadurch erhöht sich die Spezifität der Methode. Der erste Antikörper ist mit dem Boden einer Lochplatte fest verbunden. Der zweite Antikörper wird in gelöster Form nach dem Auftragen der Probe zugegeben. Dieser zweite Antikörper ist biotinyliert. Im nächsten Schritt wird das an Streptavidin gebundene Enzym hinzugegeben. Aufgrund der starken Bindungsaffinität von Biotin und Streptavidin, werden die Antigen-Antikörper-Komplexe auf diese Weise mit dem Enzym gekoppelt. In dem genutzten Sandwich-ELISA handelte es sich um das Enzym Peroxidase, das Wasserstoffperoxid umsetzt. Dadurch werden Protonen frei, die ein in der Substratlösung enthaltenes Chromogen oxidieren, wodurch es zu einem Farbumschlag kommt.

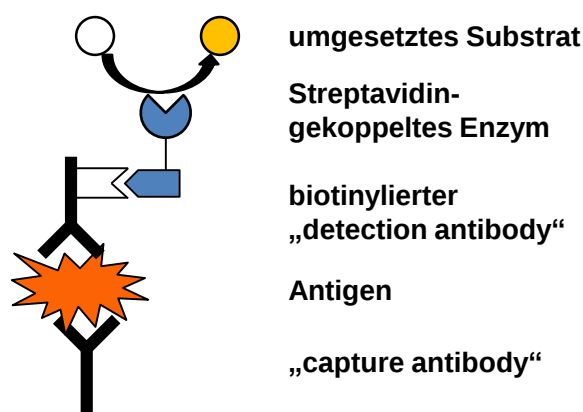


Abb. 8: schematischer Aufbau des verwendeten Sandwich-ELISAs

Beim Sandwich-ELISA wird das Antigen von zwei primären Antikörpern detektiert. Durch eine Biotin-Streptavidin-Bindung wurde der zweite Antikörper mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt. Das Vorhandensein des Antigens wurde nach Zugabe eines Substrats durch Farbumschlag sichtbar.

3.5.2 Puffer und Reagenzien

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten ELISAs sowie die 96-Loch-Platten stammten von BD Biosciences. Die verwendeten Puffer zur Verdünnung der Proben und Antikörper-Lösungen, der Waschpuffer und die Stopplösung wurden selbst hergestellt. Ihre Zusammensetzung ist im Folgenden dargestellt.

Coating-Puffer (pH 9,5)

Aqua dest.

8,4 g/l NaHCO_3

3,56 g/l Na_2CO_3

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, pH 7,4)

Aqua dest.

8,0 g/l NaCl

1,16 g/l Na_2HPO_4

0,2 g/l KH_2PO_4

0,2 g/l KCl

Blockierungslösung

PBS und 10% FCS

Waschpuffer

PBS und 0,05% Tween 20 (Polysorbat 20)

Stopplösung

1M H_2SO_4

3.5.3 Messung

Die Überstände der Zellkulturen wurden wie unter 3.3 beschrieben bei der Zellernte abgenommen und in separate Röhrchen überführt. Um eine möglichst zellfreie Lösung zu erhalten, wurden sie im Anschluss ein weiteres Mal zentrifugiert und der Überstand wurde in neue Röhrchen überführt. Von diesen wurden jeweils drei Aliquote abgenommen und diese in sterilen Eppendorf-Gefäßen bei -20°C eingefroren.

Der ELISA wurde so durchgeführt wie vom Hersteller empfohlen. Die Arbeitsschritte werden im Folgenden beschrieben. Zur Vorbereitung des ELISAs wurden am Vortag zunächst die 96-Lochplatten mit dem ersten Antikörper („Capture Antibody“) bestückt. Hierzu wurde die Antikörperlösung mit Coating-Puffer verdünnt und jeweils 100 μl in die Vertiefungen der Lochplatte aufgetragen. Anschließend wurden die Lochplatten über Nacht bei $+4^\circ\text{C}$ inkubiert. Am Tag der Messung wurden alle noch ungebundenen Antikörper entfernt, indem die

Antikörperlösung abgekippt wurde und die 96-Lochplatten mit Waschpuffer in einem dafür speziellen Gerät („microplate washer“) gespült wurden. Im Anschluss wurden eine Standardreihe mit einem absteigenden, definierten Zytokingehalt sowie die Proben in zwei verschiedenen Verdünnungsstufen aufgetragen. Zudem gab es auf jeder Platte einige Löcher, die keine Proben enthielten, um die Absorption der verwendeten Reagenzien zu bestimmen. Die Platten wurden anschließend 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Flüssigkeiten wurden anschließend abgekippt und ungebundene Zytokine durch mehrere aufeinanderfolgende Spülvorgänge entfernt. Danach wurde der zweite Antikörper („Detection Antibody“) aufgetragen. Im Falle der IL-6-Messung wurde die Enzymlösung, die an den zweiten Antikörper bindet, sofort hinzugegeben. Zur IL-1 β - und IL-10-Messung musste der zweite Antikörper erst eine Stunde inkubieren, bevor die Enzymlösung hinzugegeben werden konnte. Diese inkubierte eine weitere Stunde in der 96-Lochplatte. Zur Entfernung aller ungebundenen Antikörper und Enzyme wurde die Platte schließlich erneut gespült. Danach wurde das Substrat in die Vertiefungen der Lochplatte gegeben, welches von den gebundenen Enzymen umgesetzt wurde und dadurch seine Fluoreszenzaktivität änderte. Für diese Reaktion wurden die Platten im Dunkeln bei Raumtemperatur 15 - 30 Minuten lang inkubiert, bis eine ausreichende Farbentwicklung festgestellt werden konnte. Durch die Zugabe von verdünnter Schwefelsäure wurde die Reaktion gestoppt und ein Farbumschlag ausgelöst. Unmittelbar danach erfolgte die Messung der Extinktion in einem Spektrometer bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die gemessenen Daten wurden in eine Excel-Tabelle übertragen. Zur Umrechnung der Extinktion in die jeweils gemessene Zytokinkonzentration wurde eine Standardkurve erstellt und ihr Anstieg berechnet. Dieser stellte den Umrechnungsfaktor für die Berechnung der Zytokinkonzentration aus der Extinktion dar. Die so gewonnenen Daten wurden jeweils mit ihrem Verdünnungsfaktor multipliziert und der Mittelwert und die Standardabweichung aus den drei Aliquotes berechnet.

3.6 Datenauswertung

Die erhobenen Daten wurden in einer Tabelle festgehalten und Mittelwerte sowie Standardabweichungen mittels Excel 2010 der Firma Microsoft errechnet. Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS Statistics (IBM, Version 23 und 25) genutzt. Zur Berechnung von Signifikanzen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA und der Post-hoc-Test LSD (engl. least significant difference) verwendet. Ab einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde von einem signifikanten Unterschied zwischen zwei Variablen ausgegangen.

4. Ergebnisse

4.1 Monozyten sind potente Produzenten inflammatorischer Zytokine

Die humanen Monozyten wurden nach ihrer Isolation nach dem in Kap. 3.2.2 genannten Schema kultiviert. In den folgenden Kapiteln werden zunächst die Ergebnisse der Zytokinproduktion in den Typ A-Kulturen dargestellt.

Wie erwartet, zeigten die stimulierten Typ A-Monozyten eine potente Ausschüttung von IL-1 β , IL-6 und IL-10. Die unstimulierten Monozytenkulturen enthielten hingegen keine nennenswerten Konzentrationen dieser Zytokine. In Abbildung 9 sind die Konzentrationen der untersuchten Zytokine einer repräsentativen Typ A-Kultur gegenübergestellt. In dieser führte die Stimulierung mit LPS zu einem Anstieg des IL-1 β -Gehalts um das 2.600-Fache, des IL-6-Gehalts um das 2.700-Fache und des IL-10-Gehalts um das 161-Fache der unstimulierten Typ A-Kulturen. In den unstimulierten Typ A-Kulturen lag der Zytokingehalt an der unteren Nachweisgrenze des verwendeten ELISAs.

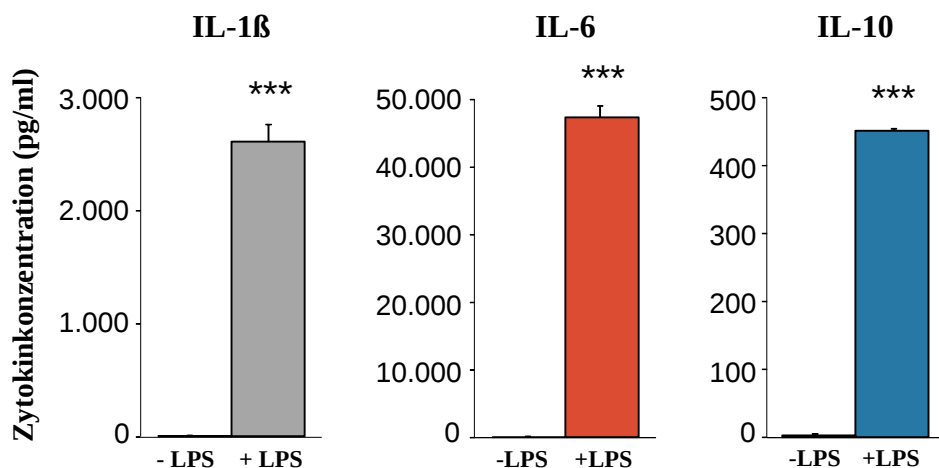


Abb. 9: LPS stimuliert die Zytokinproduktion der Typ A-Monozyten. Humane Monozyten wurden mittels CD14-microbeads aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Eine Hälfte der Kulturen wurde sofort mit 100 pg/ml LPS stimuliert (+LPS). Die andere Hälfte erhielt eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (-LPS). Nach 24 Stunden wurden die Überstände der Zellkulturen abgenommen und eingefroren. Die Bestimmung der Konzentrationen von IL-1 β , IL-6 und IL-10 erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt mittels ELISA. Dargestellt ist der Mittelwert + SD aus Triplikaten. Es wurden 8 vergleichbare Experimente durchgeführt. ***, $p < 0,001$; + LPS vs. - LPS.

4.2 Statin beeinflusst die Zytokinproduktion in den Typ A-Kulturen nicht

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war der Einfluss von Statin auf die Zytokinproduktion der Monozyten. Wie in Kap. 3.2 beschrieben, wurden hierzu parallel statinfreie (- Stat) und statinhaltige (+ Stat) Kulturen angelegt. Bei den Typ A-Kulturen wurden beide Ansätze sofort

mit LPS stimuliert und für 24 Stunden inkubiert. Als Negativkontrolle wurden begleitend unstimulierte Typ A-Kulturen angelegt. Wie in Abbildung 10 dargestellt, unterschieden sich die Zytokinkonzentrationen der statinhaltigen und der statinfreien, stimulierten Typ A-Kulturen kaum voneinander. In dem gezeigten Beispiel beträgt die Differenz der IL-1 β -Produktion 177 pg/ml und der IL-6-Produktion 3.966 pg/ml. In beiden Fällen waren diese Unterschiede nicht signifikant. Im Falle der IL-10-Konzentration zeigte sich in der statinhaltigen Typ A-Kultur ein Absinken um 74,6 pg/ml gegenüber der statinfreien Kultur, das in diesem Experiment signifikant war. Insgesamt zeigte sich in fünf von sieben Experimenten ein geringgradiger Abfall der IL-10-Konzentration unter Statineinfluss. Im Mittel aller Experimente konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen statinfreier und statinhaltiger Typ A-Kultur festgestellt werden.

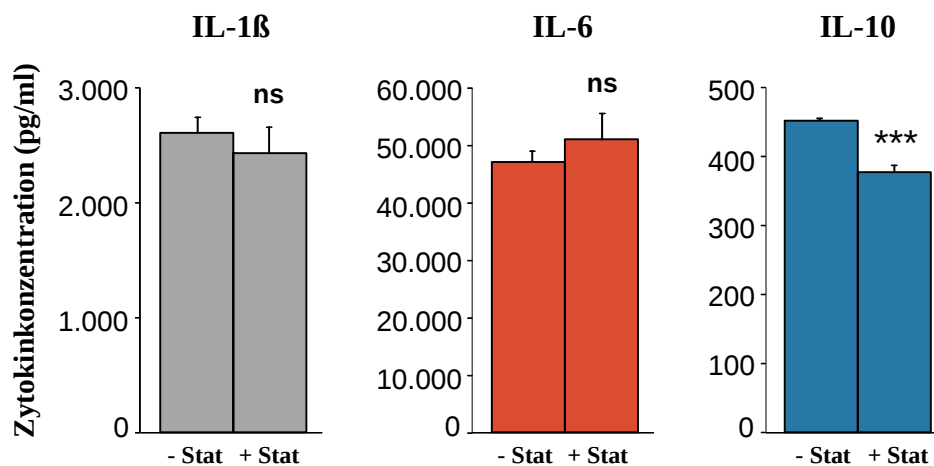


Abb. 10: Statin beeinflusst die Zytokinproduktion in den Typ A-Kulturen kaum. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Anschließend wurde die Hälfte der Kulturen mit 10 μ g/ml Fluvastatin versetzt (+Stat). Die andere Hälfte erhielt eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (-Stat). Alle Kulturen wurden sofort mit LPS stimuliert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand der Zellkulturen abgenommen und eingefroren. Die Bestimmung der Konzentrationen von IL-1 β , IL-6 und IL-10 erfolgten zu einem späteren Zeitpunkt mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von Triplikaten. ns, nicht signifikant; ***, $p < 0,001$; + Stat vs. - Stat.

In den unstimulierten Typ A-Kulturen kam es durch die Zugabe von Statin nicht zu einem Anstieg der Zytokinproduktion. Eine alleinige Stimulation der Monozyten durch Statin konnte damit ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

4.3 Typ B-Monozyten produzieren keine proinflammatorischen Zytokine

Die Typ B-Monozyten unterschieden sich durch eine 24-stündige Vorinkubation vor der Stimulation von den Typ A-Monozyten. Von den Typ B-Kulturen wurde ebenfalls die Hälfte zu

Beginn der Kultivierung mit Fluvastatin versetzt. Die Ergebnisse der Zytokinproduktion in den Typ B-Kulturen werden im Folgenden beschrieben.

In Abbildung 11 sind die Konzentrationen von IL-1 β , IL-6 und IL-10 in den statinfreien Typ B-Kulturen eines repräsentativen Experiments der zugehörigen Typ A-Kultur gegenübergestellt. Es wird deutlich, dass die IL-1 β - und die IL-6-Produktion in den Typ B-Kulturen deutlich geringer als in den Typ A-Kulturen war, während die IL-10-Konzentration gegenüber der stimulierten Typ A-Kultur anstieg. In dem gezeigten Experiment sank die IL-1 β -Konzentration auf $38,3 \pm 4,5$ pg/ml und lag damit nur noch knapp über dem Niveau der unstimulierten Typ B-Kulturen. Die IL-6-Konzentration ging auf 6.645 ± 145 pg/ml zurück und entsprach damit nur noch einem Siebtel der IL-6-Konzentration in der Typ A-Kultur. Die IL-10-Konzentration stieg hingegen in der statinfreien Typ B-Kultur signifikant um 239,6 pg/ml an. Die 24-stündige Vorinkubation senkte also die Fähigkeit der Monozyten die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 zu produzieren. Diese Hyporesponsivität zeigte sich in allen sieben Experimenten. Durchschnittlich sank die IL-1 β -Produktion um 99,3 % und die IL-6-Produktion um 88,3 %, jeweils verglichen mit der statinfreien stimulierten Typ A-Kultur.

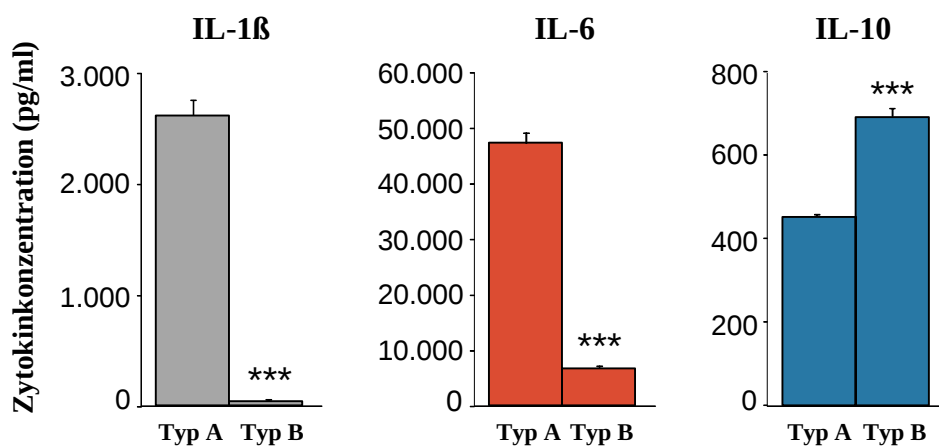


Abb. 11: Vorinkubierte Monozyten verlieren die Fähigkeit, IL-1 β und IL-6 zu produzieren. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Eine Hälfte der Kulturen wurde sofort mit 100 pg/ml LPS stimuliert (Typ A). Die andere Hälfte inkubierte zunächst über Nacht in statinfreiem Medium und wurde erst dann mit LPS stimuliert und für weiteren 24 Stunden inkubiert (Typ B). Im Anschluss wurden die Überstände abgenommen und eingefroren. Ihr Zytokingehalt wurde zu einem späteren Zeitpunkt mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von Triplikaten. ***, $p < 0,001$; Typ B vs Typ A.

Gleichzeitig war eine erhöhte IL-10-Produktion in den Typ B-Kulturen feststellbar. Im Gesamtdurchschnitt aller Experimente zeigte sich in den Typ B-Kulturen ein Anstieg der IL-10-Konzentration um 25 %. Bei Betrachtung der absoluten Zahlen erreichte dieser Anstieg jedoch aufgrund der großen Schwankungsbreite zwischen den Experimenten keine Signifikanz. Daher erfolgte die statistische Auswertung in diesem Falle auch mit relativen Zahlen. In Tabelle 2 wird dadurch der signifikante Anstieg der IL-10-Konzentration in den stimulierten Typ B-Kulturen

gegenüber den stimulierten Typ A-Kulturen deutlich. Die Tabelle enthält bereits die Daten der statinhaltigen Typ B-Kulturen, die im folgenden Kapitel 4.4 beschrieben werden.

Tab. 2: Statinfreie Typ B-Monozyten sezernieren mehr IL-10 als Typ A-Monozyten

Dargestellt sind die relativen IL-10-Konzentrationen in Prozent von sieben Experimenten. Die jeweils höchste IL-10-Konzentration eines Experiments wurde als 100% definiert. Die anderen Werte innerhalb des Experiments wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Anschließend wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung (SD) bestimmt. **, $p < 0,01$; Typ B - Stat vs. (Typ A - Stat, Typ A + Stat). a) Es fehlt Experiment 1, da von diesem kein Material vorlag.				
	Typ A		Typ B	
Exp. ^a	- Stat	+ Stat	- Stat	+ Stat
2	12,3	17,3	100	86,7
3	5,3	5,7	100	52,5
4	100	93,0	72,9	41,8
5	100	79,4	57,5	34,9
6	33,4	30,2	100	67,4
7	63,8	60,5	100	85,2
8	53,1	44,3	81,2	100
Mittelwert	52,6	47,2	87,4**	66,9
SD	±38,4	±32,2	±17,2	±24,8

In den unstimulierten Typ B-Kulturen wurden die Konzentrationen der drei untersuchten Zytokine durch die Vorinkubation nicht beeinflusst und lagen, wie in den Typ A-Kulturen, an der unteren Nachweisgrenze des ELISAs.

4.4 Statin erhält die Zytokinproduktion in den Typ B-Kulturen aufrecht

Während die Stimulierbarkeit der IL-1 β - und IL-6-Produktion in den statinfreien Typ B-Kulturen deutlich vermindert war, zeigten die statinhaltigen Typ B-Kulturen eine potente Zytokinproduktion. Dieser „schützende“ Effekt von Statin wird in Abbildung 12 veranschaulicht. In dem gezeigten Experiment betrug die IL-1 β -Konzentration in der statinhaltigen Typ B-Kultur 2.365 ± 88 pg/ml und war damit fast identisch mit den Typ A-Kulturen, welche zum besseren Vergleich erneut mit dargestellt sind. Die IL-6-Konzentration in der statinhaltigen Typ B-Kultur betrug 31.201 ± 2.548 pg/ml und stieg damit gegenüber der statinfreien Typ B-Kultur um das 4,7-Fache an. Gegenüber den Typ A-Kulturen ohne (47.209 ± 1.824 pg/ml) und mit Statin (51.175 ± 4.620 pg/ml) war sie leicht vermindert.

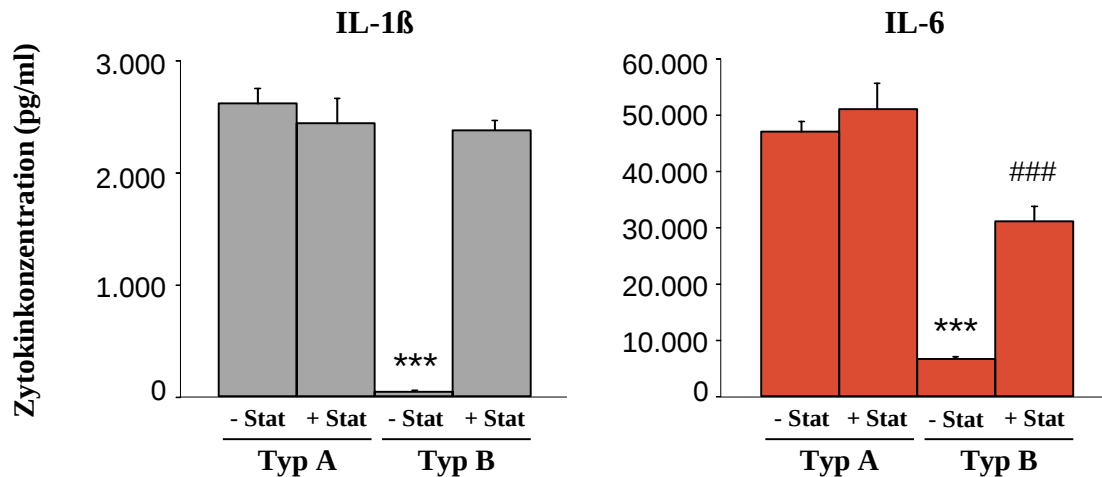


Abb. 12: Statin hält die IL-1β- und IL-6-Produktion in den Typ B-Kulturen aufrecht.

Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Die Hälfte der Monozytenkulturen wurde mit 10 µg/ml Fluvastatin versetzt (+ Stat), die andere Hälfte erhielt eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (- Stat). Die Typ A-Monozyten wurden sofort mit LPS stimuliert und ihre Überstände nach 24 Stunden abgenommen. Die Typ B-Monozyten wurden zunächst für 24 Stunden vorinkubiert und erst dann mit LPS stimuliert. Im Anschluss wurden auch ihre Überstände abgenommen und eingefroren. Der Zytokingehalt wurde zu einem späteren Zeitpunkt mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus Triplikaten eines repräsentativen Experiments.

***, $p < 0,001$; Typ B - Stat vs. (Typ A - Stat, Typ A + Stat, Typ B + Stat); ###, $p < 0,001$; Typ B + Stat vs. (Typ A - Stat, Typ A + Stat).

Alle Experimente zusammengefasst blieb die IL-1β-Konzentration in den statinhaltigen Typ B-Kulturen auf dem Niveau der Typ A-Kulturen erhalten. Die IL-6-Produktion in den statinhaltigen Typ B-Kulturen war gegenüber den Typ A-Kulturen im Durchschnitt um 39 % vermindert, betrug jedoch noch immer das rund 4-Fache der statinfreien Typ B-Kulturen. Die unstimulierten, mit Statin vorinkubierten Typ B-Kulturen produzierten keine nennenswerten Mengen IL-1β oder IL-6 (Daten nicht gezeigt). Eine alleinige Stimulation durch das Statin konnte somit auch nach einer Einwirkzeit von 24 Stunden nicht nachgewiesen werden.

Die IL-10-Produktion in den statinhaltigen Typ B-Kulturen war gegenüber den Typ B-Kulturen ohne Statin um 20 Prozentpunkte vermindert (s. Tab. 2). Demnach kam es unter dem Einfluss von Statin nicht zu einem Anstieg des IL-10-Gehalts wie in den Typ B-Kulturen ohne Statin. Im Durchschnitt lag die IL-10-Konzentration zwar leicht über dem Niveau der stimulierten Typ A-Kulturen, unterschied sich aber nicht signifikant von diesen.

In allen Experimenten konnte nach der Stimulation mit LPS eine potente Zytokinproduktion in den Typ A-Monozytenkulturen nachgewiesen werden. Diese betraf sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine. Eine Vorinkubation in reinem Medium verminderte die Fähigkeit der Typ B-Monozyten, die proinflammatorischen Zytokine IL-1β und IL-6 zu bilden.

Die Konzentration des antiinflammatorischen IL-10 nahm hingegen zu. Durch die Anwesenheit von Fluvastatin während der Vorinkubation konnte die Stimulierbarkeit der IL-1 β - und IL-6-Produktion in den Monozyten aufrechterhalten werden. Die Zunahme der IL-10-Produktion in den vorinkubierten Kulturen wurde durch Statin hingegen gedrosselt. Fluvastatin allein führte in den unstimulierten Monozytenkulturen nicht zu einer Veränderung der Zytokinproduktion.

4.5 Die Hyporesponsivität der Typ B-Monozyten ist abhängig von der Dauer der Vorinkubation

Das Unvermögen, proinflammatorische Zytokine zu produzieren, war nach der 24-stündigen Vorinkubation in allen Typ B-Kulturen feststellbar. Zu welchem Zeitpunkt die abnehmende Stimulierbarkeit einsetzte, war bisher nicht bekannt. Daher wurde in einem zusätzlichen Experiment die Dauer der Vorinkubation weiter unterteilt in 0, 3, 6, 12 und 24 Stunden. Im Anschluss an die unterschiedlich lange Vorinkubation erhielten alle Kulturen die gleiche Menge LPS und inkubierten für weitere 24 Stunden mit dem Stimulus. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der IL-1 β - und IL-6-Konzentration in den stimulierten Kulturen jeweils ohne und mit Statin dargestellt. Es wird deutlich, dass die Zytokinkonzentration in den statinfreien Monozytenkulturen bereits nach 3 Stunden sank. Mit zunehmender Dauer der Vorinkubation nahm die IL-1 β - und IL-6-Produktion kontinuierlich ab. In dem gezeigten Experiment kam es auch in den statinhaltigen Monozytenkulturen zu einem leichten Abfall der IL-1 β - und IL-6-Konzentration. Im weiteren Verlauf blieben diese Werte aber stabil und sanken trotz zunehmender Vorinkubationszeit nicht weiter ab. Die Hyporesponsivität der Monozyten setzte also bereits nach wenigen Stunden der Vorinkubation ein. Durch die Zugabe von Fluvastatin konnte die Stimulierbarkeit der Zellen für mindestens 24 Stunden aufrechterhalten werden.

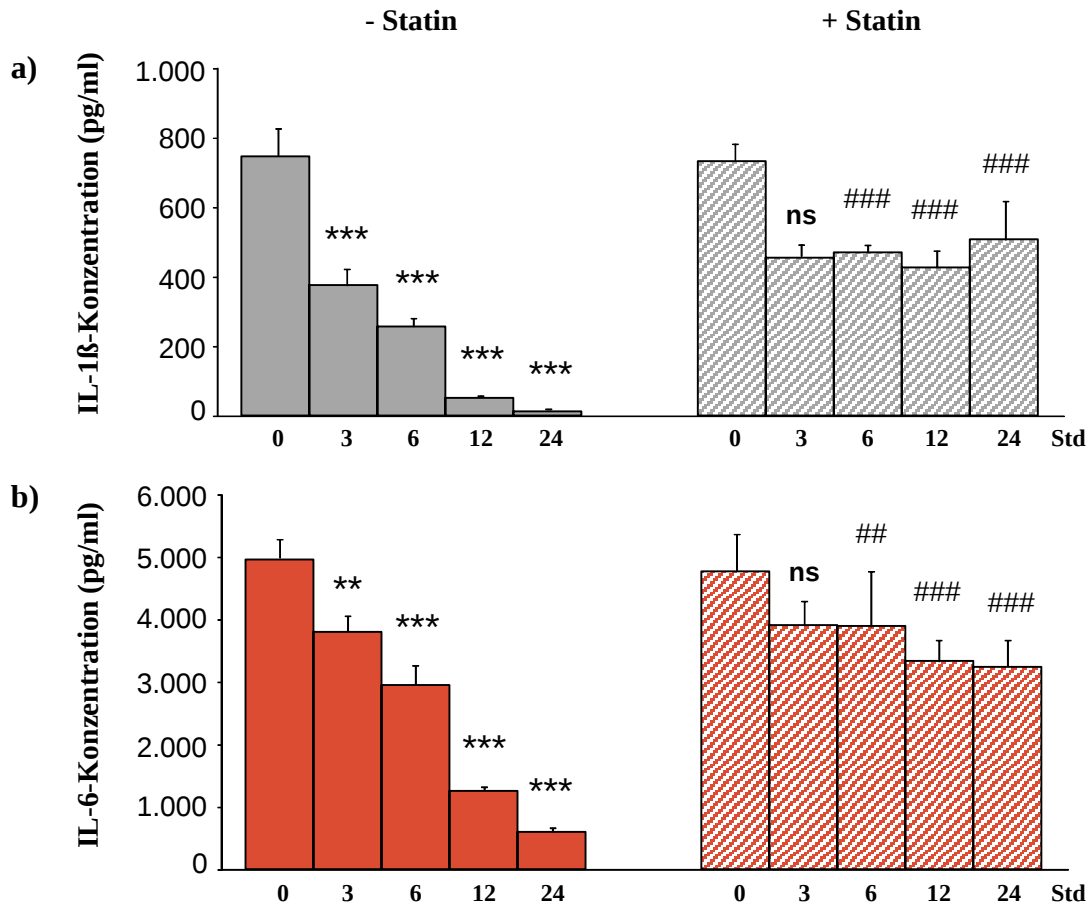


Abb. 13a und b: Die abnehmende Stimulierbarkeit der Monozyten tritt bereits nach 3 Stunden auf und wird durch Statin verhindert. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Die Hälfte der Kulturen erhielt zu Beginn 10 μ g/ml Fluvastatin, die andere Hälfte erhielt eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx}. Beide Hälften wurden in fünf Gruppen unterteilt, die sich jeweils in der Dauer der Vorinkubation unterschieden (0, 3, 6, 12 und 24 Stunden). Nach der entsprechenden Vorinkubation wurden die Monozyten mit 100 pg/ml LPS stimuliert und inkubierten damit für weitere 24 Stunden. Anschließend wurden ihre Überstände abgenommen und eingefroren. Der Zytokingehalt wurde zu einem späteren Zeitpunkt mittels ELISA bestimmt.

, $p < 0,01$; *, $p < 0,001$; 0 Std. - Statin vs. 3, 6, 12, 24 Std. - Statin; ns, nicht signifikant; ##, $p < 0,01$, ###, $p < 0,001$; 3, 6, 12, 24 Std. + Statin vs. 3, 6, 12, 24 Std. - Statin.

4.6 Klassische CD14⁺/CD16⁻-Monozyten bilden die Hauptpopulation frisch isolierter Monozyten

Neben der Messung der Zytokinproduktion war auch die Charakterisierung des Phänotyps der Monozyten Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Hierzu wurde die Expression ausgewählter Oberflächenantigene durchflusszytometrisch untersucht. Zur Bestimmung der Monozyten-Subpopulationen wurden der LPS-Rezeptor CD14 und der Fc-Rezeptor CD16 genutzt. Anhand der Ausprägung dieser Oberflächenantigene wurden in Anlehnung an die Fachliteratur vier verschiedene Populationen unterschieden: CD14⁺/CD16⁻, CD14⁺/CD16⁺, CD14⁻/CD16⁺, CD14⁻/CD16⁻. Die Bestimmung der Chemokinrezeptoren CCR2 und CX3CR1 wurde ebenfalls zur

Unterscheidung der Monozytenpopulationen herangezogen. Daneben gilt CX3CR1 auch als Marker für antiinflammatorische M2-Makrophagen. Ebenso wurden die Oberflächenantigene CD86 und CD163 als Makrophagenmarker verwendet. CD86 diente dabei der Markierung proinflammatorischer M1-Makrophagen, während CD163 zur Detektion von M2-Makrophagen genutzt wurde. Mithilfe der Durchflusszytometrie sollte in der vorliegenden Arbeit nachvollzogen werden, ob und unter welchen Bedingungen sich die verwendeten Monozyten zu Makrophagen differenzieren.

Um das Ausgangsstadium der Monozyten ex vivo möglichst unverfälscht zu erfassen, wurde die Expression der o.g. Oberflächenantigene unmittelbar nach der Isolation der Zellen bestimmt. Der überwiegende Teil der frisch isolierten Monozyten war CD14-positiv (Abb. 14). Unter diesen bildeten die CD14-positiven, CD16-negativen Monozyten ($CD14^+/CD16^-$) mit $85,1 \pm 4,4 \%$ die größte Subpopulation. Monozyten, die beide Antigene gleichzeitig exprimierten ($CD14^+/CD16^+$), stellten hingegen die kleinste Subpopulation dar ($1,8 \pm 1,6 \%$). Etwa ein Achtel der Monozyten war CD14-negativ oder nur schwach CD14-positiv ($CD14^-$). Von diesen exprimierte rund die Hälfte der Zellen CD16. Der Anteil der $CD14^-/CD16^+$ -Population betrug $5,6 \pm 3,1 \%$. Ein vergleichbarer Anteil von $7,5 \pm 3,1 \%$ war CD14-negativ und CD16-negativ ($CD14^-/CD16^-$).

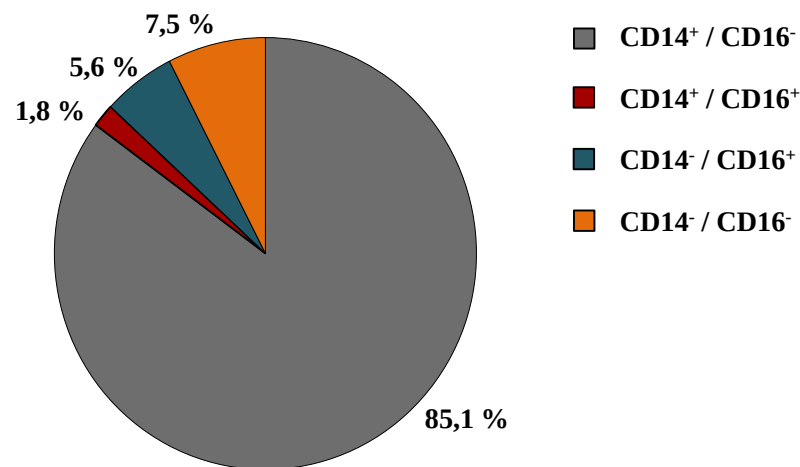


Abb. 14: Frisch isolierte Monozyten sind überwiegend CD14-positiv und CD16-negativ ($CD14^+/CD16^-$). Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und mit Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern, die gegen CD14 und CD16 gerichtet waren, gefärbt. Im Anschluss wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Die Fluoreszenzsignale der Zellen wurden in einem zweidimensionalen CD14-/CD16-Diagramm dargestellt. Zellen, die eine stärkere Fluoreszenzintensität aufwiesen als die entsprechende Isotyp-Kontrolle wurden als positiv (+) definiert. Zellen, die eine vergleichbare oder geringere Fluoreszenzintensität aufwiesen, wurden als negativ (-) definiert. Daraus ergaben sich die vier o.g. Monozyten-Subtypen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 8 Experimenten.

Neben CD14 und CD16 wurde auch die Expression der Chemokinrezeptoren CCR2 und CX3CR1 auf den frisch isolierten Monozyten bestimmt. Die frisch isolierten Monozyten waren zu $92,7 \pm 4,8$ % CCR2-positiv, aber nur $0,8 \pm 0,1$ % der Zellen exprimierten CX3CR1. Die als Makrophagenmarker geltenden Moleküle CD86 und CD163 konnten überraschenderweise bereits auf einem Großteil der frisch isolierten Monozyten nachgewiesen werden. So waren $85,0 \pm 28,9$ % der Zellen CD86-positiv und $88,4 \pm 4,5$ % CD163-positiv.

4.7 LPS erhält den Phänotyp frisch isolierter Monozyten in der Kultur aufrecht

Nach den frisch isolierten Monozyten wurde die Antigenexpression auch auf den kultivierten Monozyten untersucht. Dabei wurden zunächst die unstimulierten und die mit LPS stimulierten Typ A-Monozyten ohne Statin verglichen. Die Expression der untersuchten Marker in den Typ A-Kulturen wird im Folgenden einzeln beschrieben.

Wie in Kap. 4.6 dargestellt, gehörte die Mehrheit der Monozyten kurz nach ihrer Isolation zum klassischen $CD14^+/CD16^-$ -Subtyp. Im Gegensatz dazu wiesen unstimulierte Typ A-Monozyten deutliche Unterschiede zu den frisch isolierten Zellen auf (Abb. 15). Der Anteil der klassischen $CD14^+/CD16^-$ -Population sank auf $26,8 \pm 20,1$ %. Die nicht-klassische $CD14^-/CD16^+$ -Subpopulation nahm auf $1,1 \pm 1,3$ % ab. Der Anteil der intermediären $CD14^+/CD16^+$ -Population stieg dagegen um das 11,5-Fache auf $20,8 \pm 12,9$ % an. Ebenso stieg der Anteil der $CD14^-/CD16^-$ -Population. Diese bildeten mit $51,3 \pm 13,7$ % die größte Subpopulation in den unstimulierten Typ A-Kulturen. Insgesamt exprimierten damit nur noch $47,6 \pm 12,9$ % der unstimulierten Typ A-Monozyten CD14. Im Gegenzug bedeutet dies, dass 39,3 % der frisch isolierten Monozyten innerhalb der 24 Stunden in Kultur das Antigen von ihrer Oberfläche verloren ($p = 2,47 \times 10^{-7}$). Gleichzeitig stieg der Gesamtanteil CD16-positiver Zellen durch den Zuwachs der intermediären $CD14^+/CD16^+$ -Population in den unstimulierten Typ A-Kulturen gegenüber den frisch isolierten Zellen von 7,4 % auf 21,9 % an ($p = 0,025$).

Die mit LPS stimulierten Monozyten zeigten hingegen keine Änderung der CD14- oder CD16-Expression gegenüber den frisch isolierten Monozyten. Der Anteil der klassischen Subpopulation ($CD14^+/CD16^-$) betrug $82,6 \pm 6,8$ % und unterschied sich damit nicht von den frisch isolierten Zellen. Die intermediäre $CD14^+/CD16^+$ -Population stieg im Vergleich zu den frisch isolierten Zellen leicht auf $4,6 \pm 8,0$ % an, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied zu erreichen. Die nicht-klassische $CD14^-/CD16^+$ -Population ($2,2 \pm 3,4$ %) und die $CD14^-/CD16^-$ -Population ($10,6 \pm 6,6$ %) zeigten ebenfalls keine wesentlichen Veränderungen.

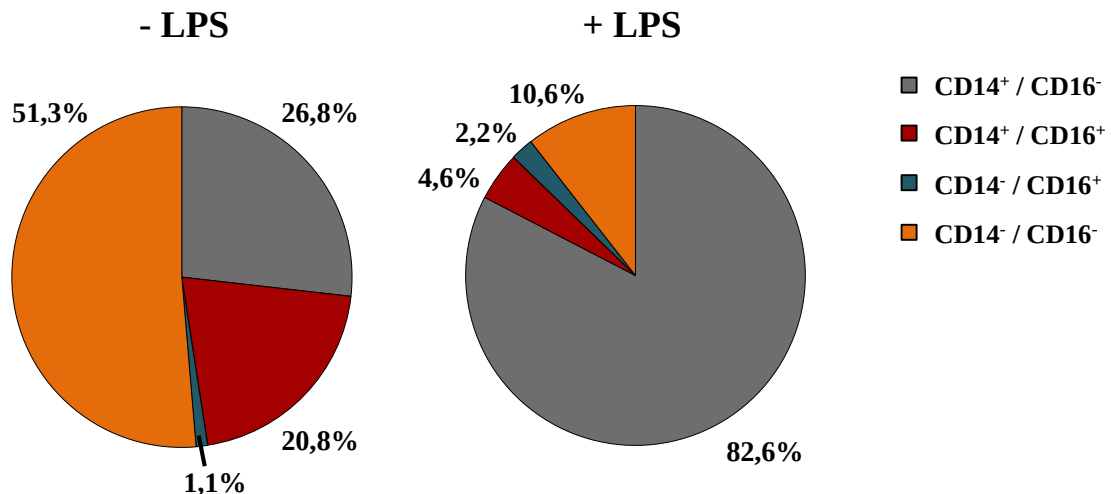


Abb. 15: LPS beeinflusst das Verhältnis der Monozyten-Subpopulationen in Kultur. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Eine Hälfte der Zellen wurde mit 100 pg/ml LPS stimuliert (+ LPS), die andere Hälfte erhielt eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (- LPS). Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Einteilung der vier Subpopulationen erfolgte wie unter Abb. 14 beschrieben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 8 Experimenten.

Die Expression von CCR2 veränderte sich durch die Kultivierung ebenfalls. Während der Anteil der CCR2-positiven Zellen in den unstimulierten Typ A-Kulturen mit $88,7 \pm 5,4 \%$ auf dem Niveau der frisch isolierten Zellen blieb, sank sie in den stimulierten Typ A-Kulturen signifikant ab (Abb. 16a). In den LPS-haltigen Kulturen exprimierten nur noch $47,9 \pm 18,2 \%$ der Monozyten CCR2 ($p = 1,55 \times 10^{-4}$). Bei Betrachtung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI) wurde der Rückgang der CCR2-Expression auf den stimulierten Typ A-Kulturen ebenfalls deutlich (Abb. 16b). In dem gezeigten Beispiel war die MFI der unstimulierten Kultur (12.460 RE) vergleichbar mit der MFI der frisch isolierten Zellen (11.918 RE). In der stimulierten Typ A-Kultur kam es hingegen zu einem Abfall auf 3.438 RE. Damit zeigte die CCR2-Expression eine zur CD14- und CD16-Expression gegensätzliche Entwicklung. Bei den frisch isolierten Monozyten gehörte der überwiegende Anteil der Zellen zur klassischen CD14⁺/CD16⁻-Population und war von einer hohen CCR2-Expression begleitet. Während die Stimulation mit LPS den Anteil des vorherrschenden klassischen Subtyps in den Typ A-Kulturen aufrechterhalten konnte, senkte sie die CCR2-Expression auf den stimulierten Typ A-Monozyten. Im Gegensatz dazu zeigten die unstimulierten Typ A-Kulturen eine anhaltend hohe CCR2-Expression im Vergleich zu den frisch isolierten Zellen.

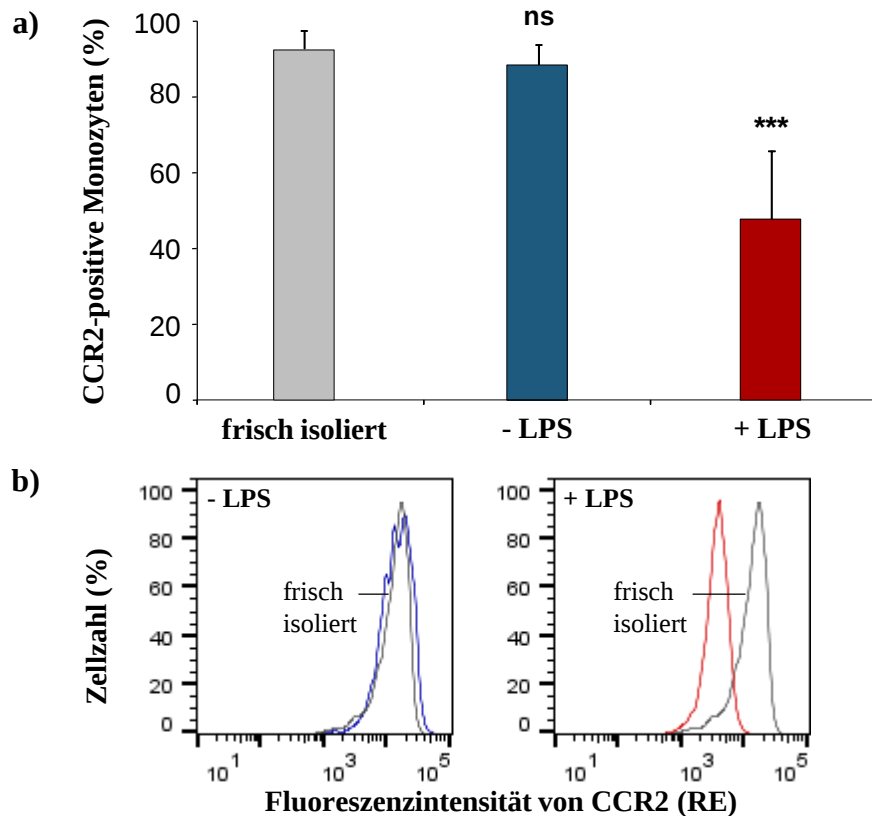


Abb. 16: LPS senkt die CCR2-Expression auf kultivierten Monozyten. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Die Hälfte der Zellen wurde mit LPS stimuliert (+ LPS), die andere Hälfte erhielt eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (- LPS). Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper, der gegen CCR2 gerichtet war, gefärbt. Der Anteil CCR2-positiver Zellen sowie die MFI von CCR2 wurden durchflusszytometrisch bestimmt. a) Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte + SD aus 5 Experimenten. ns, nicht signifikant; ***, $p < 0,001$; Typ A vs. frisch isoliert. b) Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment.

Die Expression des Fraktalkin-Rezeptors CX3CR1 blieb in den Typ A-Kulturen gegenüber den frisch isolierten Zellen unverändert. Der Anteil der CX3CR1-positiven Zellen war mit $0,43 \pm 0,24$ % in den unstimulierten und mit $0,40 \pm 0,22$ % in den stimulierten Typ A-Kulturen sehr gering. Ein Einfluss von LPS auf die CX3CR1-Expression der Typ A-Kulturen wurde nicht festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Die Expression von CD86 wurde durch die Kultivierung der Monozyten nur geringfügig beeinflusst. Nach 24 Stunden waren $74,4 \pm 13,5$ % der unstimulierten und $88,5 \pm 7,8$ % der stimulierten Typ A-Monozyten CD86-positiv (Abb. 17a). Damit sank die CD86-Expression in den unstimulierten Typ A-Kulturen gegenüber den frisch isolierten Zellen leicht ab ($p = 3,07 \times 10^{-5}$). Dieser Rückgang war auch gegenüber den stimulierten Typ A-Kulturen signifikant ($p = 0,003$). Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der unstimulierten Typ A-Kultur war hingegen gegenüber den frisch isolierten Zellen nicht vermindert (Abb. 17b). In dem gezeigten

repräsentativen Experiment ist diese mit 1.528 RE in der unstimulierten Typ A-Kultur vergleichbar mit der MFI der frisch isolierten Zellen (1.809 RE). Die stimulierte Typ A-Kultur weist mit 3.610 RE im Gegensatz dazu eine fast doppelt so hohe MFI auf. Insgesamt stieg die MFI von CD86 auf den stimulierten Typ A-Kulturen gegenüber den frisch isolierten Zellen um 42,2 % an, erreichte jedoch keine Signifikanz ($p = 0,272$). Diese Divergenz zwischen der Zahl CD86-Positiver und der MFI von CD86 deutet daraufhin, dass in den stimulierten Typ A-Kulturen zwar genauso viele Monozyten CD86 exprimierten wie von den frisch isolierten Zellen, die mit LPS stimulierten Monozyten aber eine höhere Dichte von CD86 aufwiesen.

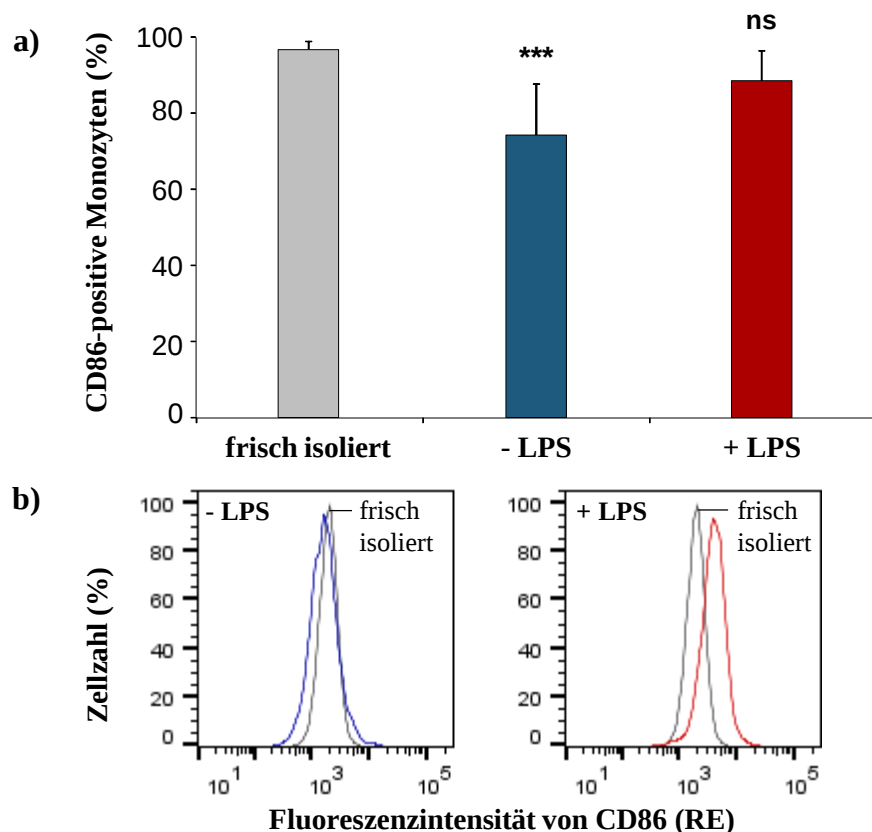


Abb. 17: Die CD86-Expression fällt auf unstimulierten Typ A-Monozyten leicht ab. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Die Hälfte der Zellen wurde mit LPS stimuliert (+ LPS), die andere Hälfte erhielt eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (- LPS). Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper, der gegen CD86 gerichtet war, gefärbt. Der Anteil CD86-positiver Zellen sowie die MFI von CD86 wurden durchflusszytometrisch bestimmt. a) Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte + SD aus 7 Experimenten. ns, nicht signifikant; ***, $p < 0,001$; Typ A vs. frisch isoliert. b) Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment.

Der Anteil des M2-Makrophagenmarkers CD163, welcher in den frisch isolierten Zellen ungewöhnlich hoch war, sank im Vergleich zu diesen in den Typ A-Kulturen ab (Abb. 18a). Von den unstimulierten Typ A-Monozyten waren $47,2 \pm 9,2$ % und von den stimulierten Typ A-

Monozyten $36,9 \pm 25,5$ % CD163-positiv. Dies entsprach gegenüber den frisch isolierten Zellen einem Rückgang auf rund die Hälfte der ursprünglichen CD163-positiven Zellzahl. Die MFI der Typ A-Monozyten sank hingegen nur in den stimulierten Kulturen ab, während sie in den unstimulierten Typ A-Kulturen sogar tendenziell höher ausfiel (Abb. 18b). In dem gezeigten Experiment sank die MFI in der stimulierten Typ A-Kultur auf 727 RE. In der unstimulierten Typ A-Kultur nahm sie mit 4.380 RE gegenüber den frisch isolierten Zellen (2.122 RE) auf über die Hälfte zu. Diese Differenz zwischen der unstimulierten und der stimulierten Typ A-Kultur zeigte sich in allen Experimenten, war jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0,068$). Durch die Kultivierung verminderte sich also der prozentuale Anteil der CD163-positiven Zellen, während die CD163-Dichte auf diesen Zellen relativ unbeeinflusst blieb.

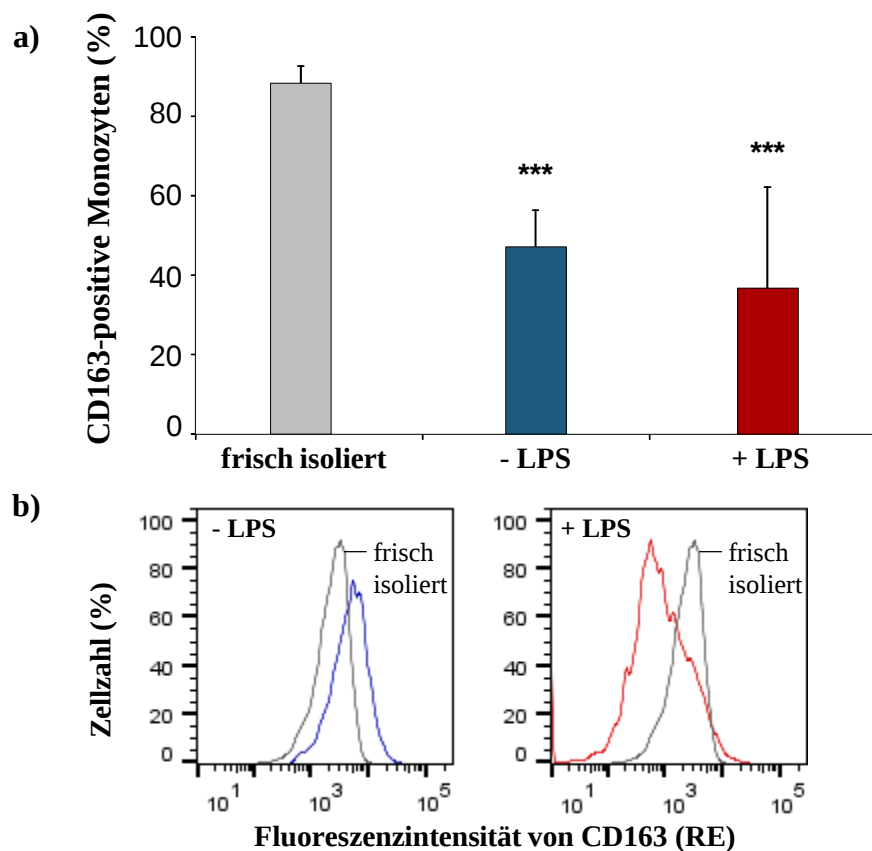


Abb. 18: Typ A-Monozyten exprimieren weniger CD163 als frisch isolierte Zellen. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Die Hälfte der Zellen wurde mit LPS stimuliert (+ LPS), die andere Hälfte erhielt eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (- LPS). Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper, der gegen CD163 gerichtet war, gefärbt. Der Anteil CD163-positiver Zellen sowie die MFI von CD163 wurden durchflusszytometrisch bestimmt. a) Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte + SD aus 8 Experimenten. ***, $p < 0,001$; frisch isoliert vs. (Typ A - LPS, Typ A + LPS). b) Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment.

In der gemeinsamen Betrachtung aller untersuchten Oberflächenantigene zeigte sich, dass die stimulierten Monozyten nach 24 Stunden in Kultur kaum Unterschiede gegenüber den frisch isolierten Monozyten aufwiesen. Das Verhältnis der Monozyten-Subpopulationen blieb während der Kultivierung mit LPS erhalten. Lediglich die CCR2-Expression und die CD163-Expression sanken signifikant in den stimulierten Typ A-Kulturen. Ohne LPS änderten die Monozyten hingegen ihren Subtyp, wie die Bestimmung der CD14- und CD16-Expression zeigte. Die Anteile der CD14⁺/CD16⁺-Population und der CD14⁺/CD16⁻-Population nahmen zu, während die klassischen CD14⁺/CD16⁻-Monozyten deutlich zurückgingen. Außerdem wurde in den unstimulierten Typ A-Kulturen eine verminderte Zahl CD86-positiver sowie CD163-positiver Zellen festgestellt. Der ebenfalls als Makrophagenmarker verwendete Fraktalkinrezeptor CX3CR1 wurde als einziges Oberflächenantigen während der 24-stündigen Kultivierung nicht beeinflusst.

4.8 Statin ändert den Phänotyp der Typ A-Monozyten nur geringfügig

Da in der Fachliteratur ein Einfluss von Statinen auf die Monozytenfunktion beschrieben wird, wurde untersucht, ob Statine auch den Phänotyp der Monozyten beeinflussen. Dazu erhielt sowohl die Hälfte der stimulierten als auch die Hälfte der unstimulierten Typ A-Kulturen zu Beginn Fluvastatin. Der weitere Ablauf verlief wie in den statinfreien Typ A-Kulturen.

In Abbildung 19 sind die prozentualen Anteile der Monozyten-Subpopulationen in den unstimulierten und stimulierten Typ A-Kulturen mit Statin dargestellt. Das Verhältnis der Monozyten-Subpopulationen änderte sich durch die Anwesenheit von Statin in den Typ A-Kulturen nicht. Wie in den statinfreien Typ A-Kulturen erhielt die Stimulation mit LPS den Phänotyp der frisch isolierten Monozyten in der statinhaltigen Typ A-Kultur aufrecht. Die unstimulierten Typ A-Monozyten mit Statin wiesen mit einem Anteil von $55,9 \pm 14,0$ % CD14-positiver Zellen einen vergleichbar starken Rückgang der CD14-Expression auf wie die unstimulierten Typ A-Monozyten, die ohne Statin inkubiert worden waren (vgl. Abb. 15). Der Anteil der intermediären CD14⁺/CD16⁺-Monozyten stieg gegenüber den frisch isolierten Zellen auf $24,5 \pm 18,9$ % an, was ebenfalls vergleichbar mit den unstimulierten Typ A-Monozyten ohne Statin war. Die stimulierten Typ A-Monozyten mit Statin blieben überwiegend CD14-positiv und CD16-negativ und ähnelten damit sowohl den frisch isolierten Monozyten als auch den stimulierten Typ A-Monozyten ohne Statin. Auch auf die anderen Subpopulationen in der stimulierten Typ A-Kultur nahm Statin keinen Einfluss.

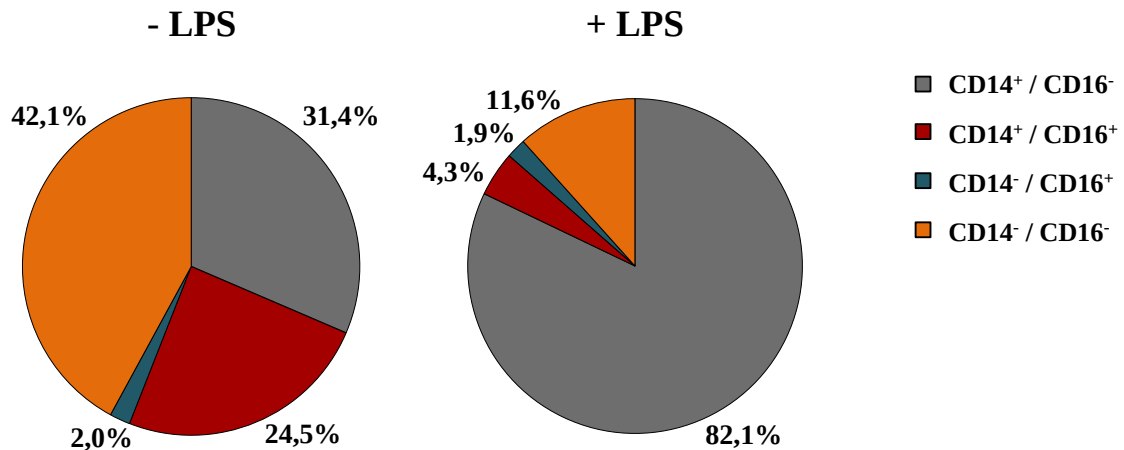


Abb. 19: Statin beeinflusst das Verhältnis der Monozyten-Subpopulationen nicht. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Nach der Zugabe von 10 µg/ml Fluvastatin wurde eine Hälfte der Zellen mit 100 pg/ml LPS stimuliert (+ LPS), die andere Hälfte erhielt eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (- LPS). Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Einteilung der vier Subpopulationen erfolgte wie unter Abb. 14 beschrieben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 8 Experimenten.

Relativ unbeeinflusst von Statin zeigte sich auch die CCR2-Expression. Wie in Kap. 4.7 dargestellt, senkte LPS in den stimulierten Typ A-Kulturen den Anteil CCR2-positiver Zellen, während die unstimulierten Typ A-Kulturen dieselbe hohe CCR2-Expression aufwiesen wie die frisch isolierten Zellen. Dieser LPS-Einfluss zeigte sich auch in den Typ A-Kulturen mit Statin. Die Zahl der CCR2-positiven Zellen in den unstimulierten Typ A-Kulturen blieb mit $84,2 \pm 9,3$ % vergleichbar mit den frisch isolierten Monozyten und mit den unstimulierten Typ A-Kulturen ohne Statin (Abb. 20a). In den stimulierten Typ A-Kulturen mit Statin waren $46,7 \pm 12,8$ % der Zellen CCR2-positiv. Die MFI von CCR2 sank hingegen in den unstimulierten Typ A-Kulturen durch die Statinzugabe leicht ab (Abb. 20b). In dem dargestellten Experiment bewirkte Statin einen Abfall von 12.460 RE in der statinfreien auf 7.910 RE in der statinhaltigen, unstimulierten Typ A-Kultur. Die Kurven der stimulierten Typ A-Kultur ohne (3.438 RE) und mit Statin (2.734 RE) sind hingegen annähernd deckungsgleich. Alle Experimente zusammen betrachtet nahm die MFI von CCR2 in den statinhaltigen unstimulierten Typ A-Kulturen um durchschnittlich 29,5 % gegenüber den statinfreien unstimulierten Kulturen ab ($p = 0,043$).

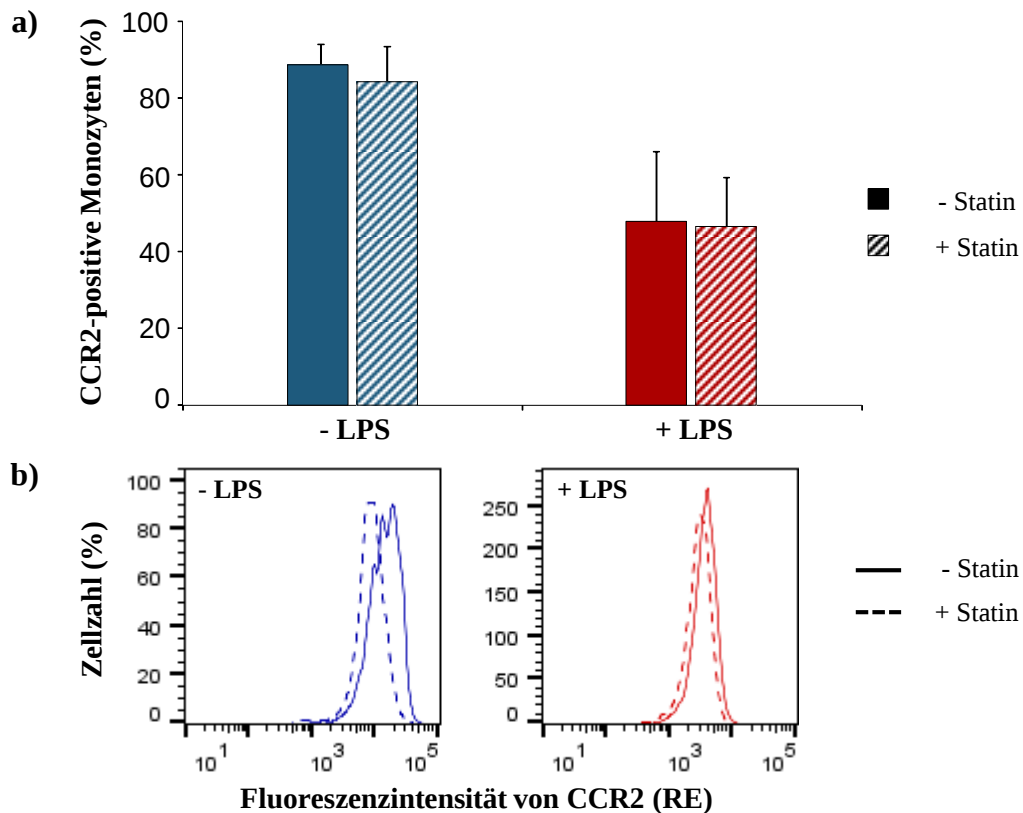


Abb. 20: Statin beeinflusst den Anteil der CCR2-positiven Zellen nicht. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Eine Hälfte der Kulturen erhielt zu Beginn 10 µg/ml Fluvastatin (+ Statin), die andere Hälfte eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (- Statin). Anschließend wurden die Zellen mit LPS stimuliert (+ LPS) oder erhielten abermals eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (- LPS). Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper, der gegen CCR2 gerichtet war, gefärbt. Der Anteil CCR2-positiver Zellen sowie die MFI von CCR2 wurden durchflusszytometrisch bestimmt. a) Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte + SD von 5 Experimenten. b) Das Histogramm zeigt ein repräsentatives Experiment.

Die Expression des Fraktalkin-Rezeptors CX3CR1 wurde durch die Zugabe von Statin nicht beeinflusst. Weder die Anzahl CX3CR1-positiver Zellen noch ihre MFI wiesen Unterschiede zwischen den statinfreien und den statinhaltigen Typ A-Kulturen auf (Daten nicht gezeigt).

Anders als bei den meisten der untersuchten Oberflächenantigene wurden bei der CD86-Expression durch die Zugabe von Statin Unterschiede in den Typ A-Kulturen festgestellt. Wie bei der CCR2-Expression waren diese jedoch nur in den unstimulierten Kulturen nachweisbar. Der durchschnittliche Anteil der CD86-positiven Zellen stieg in den unstimulierten statinhaltigen Typ A-Kulturen um 14,3 Prozentpunkte gegenüber den statinfreien Typ A-Kulturen an ($p = 0,037$, Abb. 21a). Damit glich sich die Zahl der CD86-positiven Zellen dem Ausgangswert in den frisch isolierten Monozyten an.

In der stimulierten statinhaltigen Typ A-Kultur waren $95,3 \pm 5,3$ % CD86-positiv und zeigten damit keine wesentliche Veränderung gegenüber der stimulierten Typ A-Kultur ohne Statin. Auch die MFI von CD86 wurde nur in den unstimulierten Typ A-Kulturen durch das Statin beeinflusst (Abb. 21b). In dem gezeigten Experiment stieg die MFI in der unstimulierten Kultur von 1.528 RE ohne Statin auf 3.938 RE mit Statin an. Im Mittel aller Experimente stieg die MFI der unstimulierten Typ A-Monozyten mit Statin um das 2,4-Fache der unstimulierten Typ A-Monozyten ohne Statin an ($p = 0,007$). Die MFI der stimulierten Typ A-Kulturen mit und ohne Statinzusatz unterschieden sich hingegen nicht.

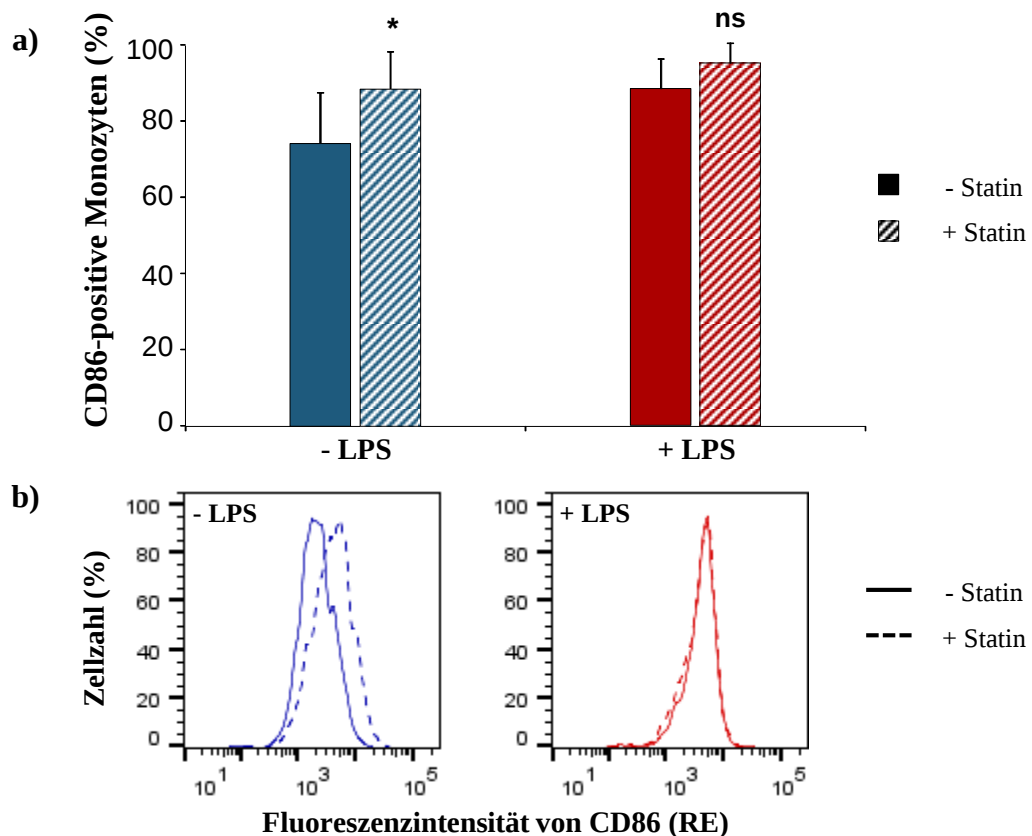


Abb. 21: Statin steigert die CD86-Expression auf unstimulierten Typ A-Monozyten. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Die Zugaben von Statin und LPS erfolgten wie unter Abb. 20 beschrieben. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper, der gegen CD86 gerichtet war, gefärbt. Der Anteil CD86-positiver Zellen sowie die MFI von CD86 wurden durchflusszytometrisch bestimmt. a) Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte + SD aus 7 Experimenten. ns, nicht signifikant; *, $p < 0,05$; Typ A - Statin vs. Typ A + Statin. b) Das Histogramm zeigt ein repräsentatives Experiment.

Der Makrophagenmarker CD163 wurde durch die Anwesenheit von Statin in den Typ A-Kulturen nicht beeinflusst. Die Anzahl der CD163-positiven Zellen in den unstimulierten Typ A-Kulturen mit Statin betrug $46,0 \pm 12,7$ % und unterschied sich damit nicht von der unstimulierten Typ A-Kultur ohne Statin ($47,2 \pm 9,2$ %). Wie in Kap. 4.7 für die statinfreien

Typ A-Kulturen dargestellt, zeigte sich auch in den statinhaltigen Typ A-Kulturen eine geringere CD163-Expression unter dem Einfluss von LPS (Abb. 22a). Bei den stimulierten Typ A-Kulturen mit Statin waren nur $29,3 \pm 23,1$ % CD163-positiv und damit signifikant gegenüber den unstimulierten Kulturen mit Statin vermindert ($p = 0,047$). Gegenüber den statinfreien stimulierten Typ A-Kulturen ($36,9 \pm 25,5$ %) ergab sich hingegen kein wesentlicher Unterschied. Die MFI von CD163 wurde, wie der Anteil CD163-positiver Zellen, durch das Statin in den Typ A-Kulturen nicht verändert (Abb. 22b). Sie beträgt in dem gezeigten Experiment in der unstimulierten Typ A-Kultur mit Statin 3.331 RE und ist damit vergleichbar mit der unstimulierten Typ A-Kultur ohne Statin (4.464 RE). In der stimulierten Typ A-Kultur ist der Unterschied zwischen der statinhaltigen (670 RE) und der statinfreien (802 RE) ebenfalls gering.

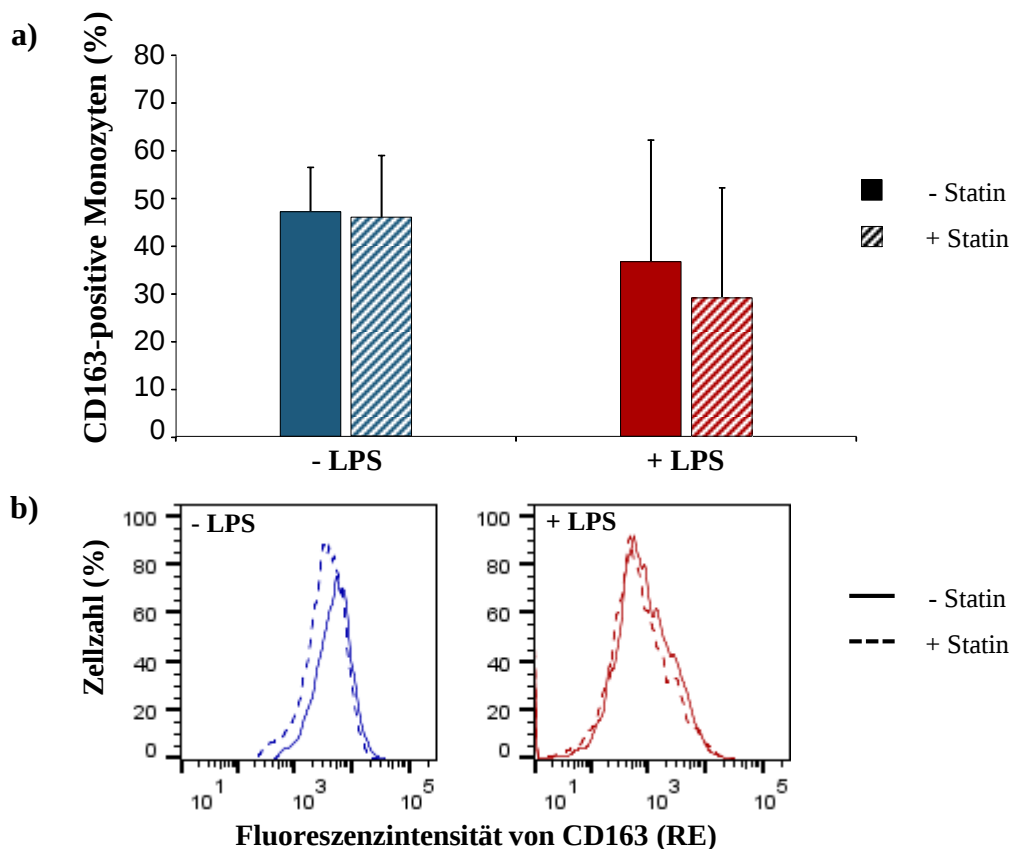


Abb. 22: Statin beeinflusst die CD163-Expression nicht. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Die Zugaben von Statin und LPS erfolgten wie unter Abb. 20 beschrieben. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit einem Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper, der gegen CD163 gerichtet war, gefärbt. Der Anteil CD163-positiver Zellen sowie die MFI von CD86 wurden durchflusszytometrisch bestimmt. a) Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte + SD aus 8 Experimenten. b) Das Histogramm zeigt ein repräsentatives Experiment.

Zusammenfassend betrachtet wirkte sich Statin in den Typ A-Kulturen nur geringfügig aus. In den unstimulierten Typ A-Kulturen kam es unter der Einwirkung von Statin zu einem leichten

Rückgang der MFI von CCR2, während der Anteil der CCR2-Positiven nicht beeinflusst wurde. Außerdem wurde eine leichte Zunahme der CD86-Expression in den unstimulierten Typ A-Kulturen mit Statin festgestellt. Alle anderen untersuchten Marker blieben unbeeinflusst. In den stimulierten Typ A-Kulturen bewirkte Fluvastatin hingegen keine Änderungen der Antigenexpression.

4.9 Vorinkubierte Monozyten exprimieren vermehrt M2-Makrophagenmarker

Während die Monozyten im Typ A-Kulturmodell nach der Isolierung sofort stimuliert wurden, wurden die Typ B-Kulturen zunächst für 24 Stunden vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurden sie mit LPS stimuliert oder erhielten eine volumenäquivalente Menge Medium. Nach der LPS- bzw. Mediumzugabe inkubierten sie für weitere 24 Stunden bis zur Ernte. Nach diesen insgesamt 48 Stunden wurde die Antigenexpression der Typ B-Monozyten ebenfalls durchflusszytometrisch untersucht.

Die vorinkubierten Typ B-Monozyten unterschieden sich phänotypisch sowohl von ihrem Ausgangszustand als frisch isolierte Zellen als auch von den Typ A-Monozyten. In den unstimulierten Typ B-Kulturen kam es zu einem noch stärkeren Rückgang der CD14-Expression als in den unstimulierten Typ A-Kulturen (Abb. 23). Nur noch 29,3 % der Zellen waren CD14-positiv, davon gehörten $17,7 \pm 8,0$ % zum klassischen CD14⁺/CD16⁻-Subtyp und $11,6 \pm 8,7$ % zum intermediären CD14⁺/CD16⁺-Subtyp. Der Anteil der nicht-klassischen CD14⁻/CD16⁺-Monozyten sank auf ein Minimum von $0,4 \pm 0,5$ % ab. Den größten Zuwachs verzeichnete die CD14⁻/CD16⁻-Population. Im Vergleich zu den unstimulierten Typ A-Kulturen nahm diese um 19 Prozentpunkte zu ($p = 0,006$).

Eine ähnliche Entwicklung wurde auch bei den stimulierten Typ B-Kulturen verzeichnet. Während die Stimulierung in den Typ A-Kulturen das Verhältnis der Monozyten-Subpopulationen im Stadium der frisch isolierten Zellen aufrechterhalten hatte, nahm in den Typ B-Kulturen die CD14-Expression trotz Stimulierung signifikant ab. Die klassische CD14⁺/CD16⁻-Population blieb jedoch mit $56,3 \pm 18,1$ % die größte Monozyten-Subpopulation. Die Anteile der intermediären CD14⁺/CD16⁺-Population und der nicht-klassischen CD14⁻/CD16⁺-Zellen zeigten gegenüber den stimulierten Typ A-Kulturen keine Veränderung. Der Anteil der CD14⁻/CD16⁻-Population stieg hingegen durch den Rückgang der CD14-Expression in den stimulierten Typ B-Kulturen auf $36,4 \pm 18,0$ % an. Dies entsprach einer Steigerung um mehr als das 3-Fache gegenüber den stimulierten Typ A-Kulturen ($p = 1,72 \times 10^{-4}$).

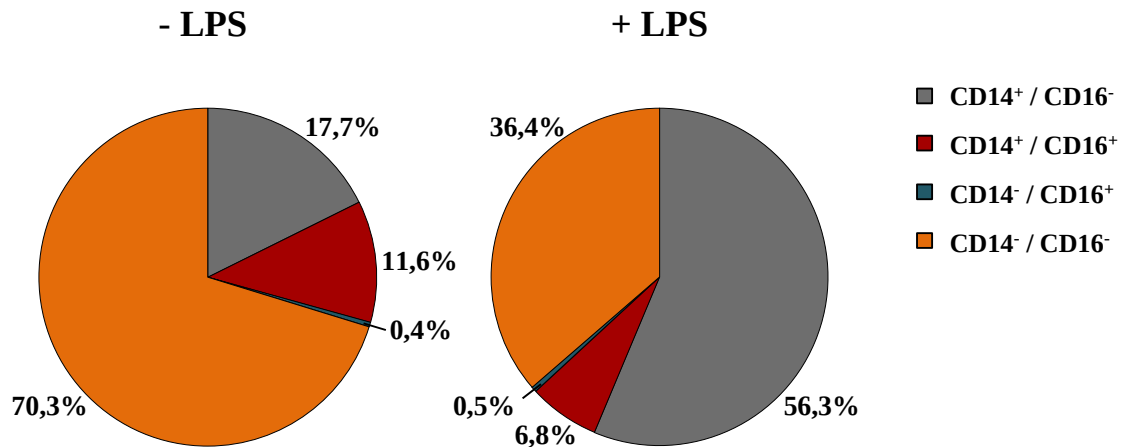


Abb. 23: Der Anteil der CD14⁻/CD16⁻-Population nimmt in unstimulierten Typ B-Kulturen deutlich zu. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und für 24 Stunden in Medium vorinkubiert. Anschließend erhielt die Hälfte der Zellen eine Stimulation mit LPS (+ LPS), die andere Hälfte eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (- LPS). Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Einteilung der vier Subpopulationen erfolgte wie unter Abb. 14 beschrieben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 8 Experimenten.

Die CCR2-Expression wurde durch die Vorinkubation nicht beeinflusst. Die Zahl der CCR2-positiven Zellen in den Typ B-Kulturen war vergleichbar mit den Typ A-Kulturen. In den unstimulierten Typ B-Kulturen waren $85,6 \pm 11,4 \%$ der Zellen CCR2-positiv und unterschieden sich damit auch von den frisch isolierten Zellen nicht (Daten nicht gezeigt). In den stimulierten Typ B-Kulturen betrug der Anteil der CCR2-Positiven nur $35,3 \pm 21,3 \%$ und zeigte damit einen vergleichbar starken Rückgang gegenüber den unstimulierten Typ B-Kulturen, wie er bereits in den Typ A-Kulturen festgestellt worden war (vgl. Abb. 16). Auch die MFI von CCR2 war in den stimulierten Typ B-Kulturen gegenüber den unstimulierten Typ B-Kulturen vermindert. Doch ebenso wie der Anteil der CCR2-positiven Zellen unterschied sich auch die MFI der Typ B-Kulturen nicht von den Typ A-Kulturen (Daten nicht gezeigt).

Die Expression von CX3CR1, die auf den frisch isolierten Monozyten sowie den kultivierten Typ A-Monozyten nahezu nicht nachweisbar war, nahm in den Typ B-Kulturen zu (Abb. 24a). In den unstimulierten Typ B-Kulturen stieg der Anteil der CX3CR1-positiven Zellen auf $11,8 \pm 9,0 \%$ an. Gegenüber den unstimulierten Typ A-Kulturen entsprach dies einem Zuwachs auf das 27-Fache ($p = 4,96 \times 10^{-5}$). In den stimulierten Typ B-Kulturen stieg die Zahl der CX3CR1-Positiven auf $3,0 \pm 2,7 \%$. Diese Steigerung war gegenüber den stimulierten Typ A-Kulturen jedoch nicht signifikant. Deutlicher wurde die erhöhte CX3CR1-Expression in den Typ B-Kulturen bei Betrachtung der MFI (Abb. 24b). In dem gezeigten repräsentativen Experiment stieg die MFI von CX3CR1 von 1.201 RE in der unstimulierten Typ A-Kultur auf 1.737 RE in der unstimulierten Typ B-Kultur. In dem gleichen Experiment kam es zu einem Anstieg von 590 RE in der stimulierten Typ A-Kultur auf 1.059 RE in der stimulierten Typ B-Kultur. Im Durchschnitt aller Experimente stieg die MFI von CX3CR1 durch die Vorinkubation

auf das 1,5-Fache bei den unstimulierten ($p = 1,02 \times 10^{-5}$) und das 1,6-Fache bei den stimulierten Typ B-Kulturen ($p = 0,002$) gegenüber den Typ A-Kulturen an.

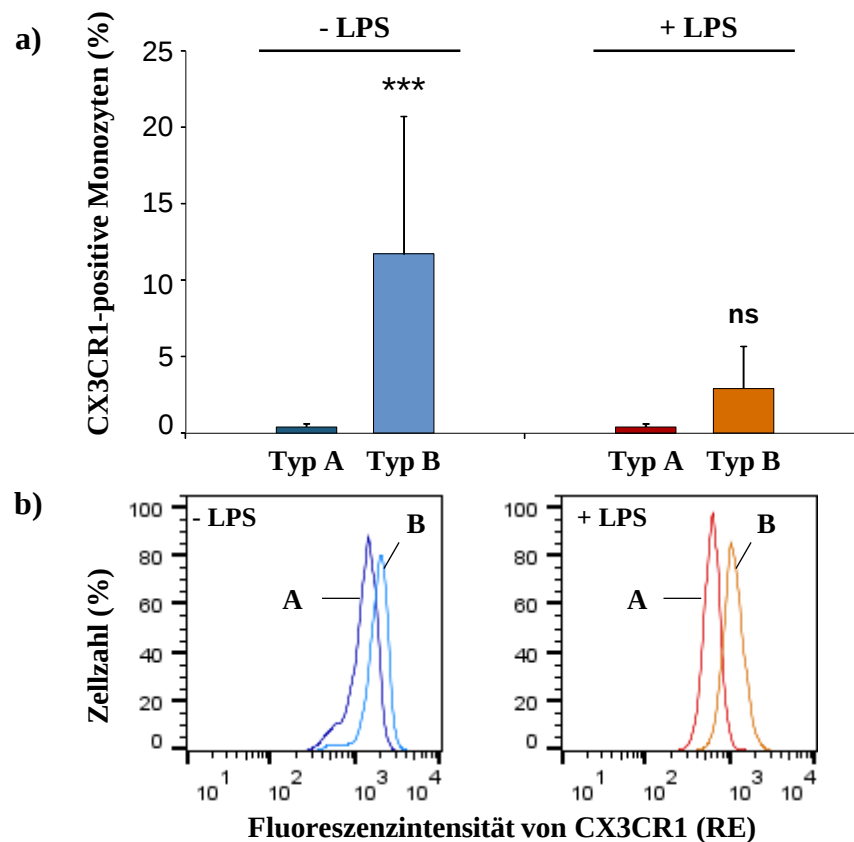


Abb. 24: Typ B-Monozyten exprimieren vermehrt CX3CR1. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Typ A-Monozyten wurden sofort stimuliert (+ LPS) bzw. erhielten eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (- LPS). Typ B-Monozyten inkubierten zunächst für 24 Stunden in Medium vor und erhielten anschließend ebenfalls LPS oder Medium. Nach der Zellernte wurden die Monozyten mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern, die gegen CX3CR1 gerichtet waren, gefärbt. Der Anteil CX3CR1-positiver Zellen sowie die MFI von CX3CR1 wurden durchflusszytometrisch bestimmt. a) Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte + SD von 4 Experimenten. ns, nicht signifikant; ***, $p < 0,001$; Typ B vs. Typ A. b) Das Histogramm zeigt ein repräsentatives Experiment.

Die CD86-Expression der Monozyten wurde durch die Vorinkubation nur in den unstimulierten Typ B-Kulturen beeinflusst (Abb. 25a). Die CD86-Expression, die in den unstimulierten Typ A-Kulturen gegenüber den frisch isolierten Zellen abgesunken war, stieg in den unstimulierten Typ B-Kulturen wieder leicht an und glich sich somit der CD86-Expression der stimulierten Monozyten an. Durchschnittlich stieg die Zahl der CD86-Positiven in den unstimulierten Typ B-Kulturen um 11,6 Prozentpunkte gegenüber den unstimulierten Typ A-Kulturen ($p = 0,013$). Der Anteil der CD86-positiven Zellen in den stimulierten Typ B-Kulturen blieb mit $80,0 \pm 12,4\%$ gegenüber der Typ A-Kultur unverändert. Auch bei Betrachtung der mittleren

Fluoreszenzintensität war der Anstieg der CD86-Expression in den unstimulierten Typ B-Kulturen nachvollziehbar. In dem gezeigten, repräsentativen Experiment (Abb. 25b) stieg die MFI von 2.031 RE in der unstimulierten Typ A-Kultur auf 3.988 RE in der unstimulierten Typ B-Kultur. Im Mittel aller Experimente kam es zu einem Anstieg der MFI um das 2,6-Fache ($p = 0,002$). Die MFI der stimulierten Typ B-Kultur zeigte hingegen keine signifikante Größenänderung.

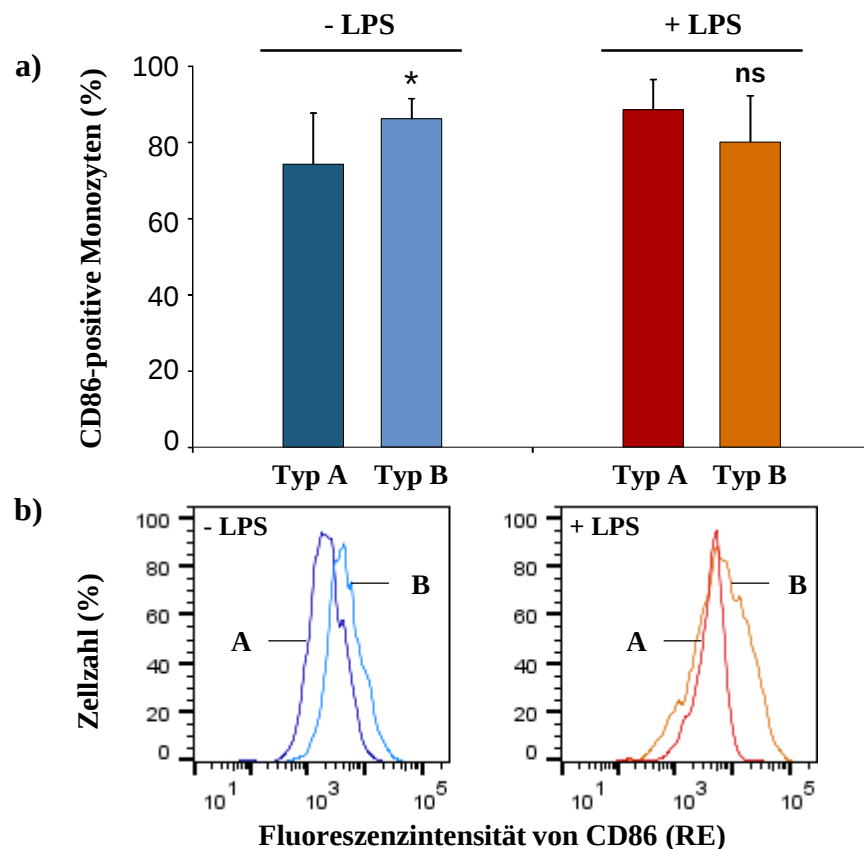


Abb. 25: Durch die Vorinkubation steigt die CD86-Expression auf unstimulierten Typ B-Monozyten. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Die Behandlung der Typ A- und Typ B-Monozyten erfolgte wie unter Abb. 15 beschrieben. Nach der Zellernte wurden die Monozyten mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper, der gegen CD86 gerichtet war, gefärbt. Der Anteil CD86-positiver Zellen sowie die MFI von CD86 wurden durchflusszytometrisch bestimmt. a) Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte + SD von 7 Experimenten. ns, nicht signifikant; *, $p < 0,05$; Typ B vs. Typ A. b) Das Histogramm zeigt ein repräsentatives Experiment.

Die Expression des M2-Makrophagenmarkers CD163 stieg auf den Typ B-Monozyten im Vergleich zu den Typ A-Monozyten an. Damit verhielt es sich konkordant zur Entwicklung des ebenfalls als M2-Makrophagenmarker genutzten CX3CR1. Bei Betrachtung des prozentualen Anteils der CD163-positiven Zellen war dieser Anstieg zunächst nur in den stimulierten Typ B-Kulturen feststellbar (Abb. 26a). In diesen nahmen die CD163-positiven Zellen um

durchschnittlich 23,4 Prozentpunkte gegenüber den stimulierten Typ A-Kulturen zu ($p = 0,006$). In den unstimulierten Kulturen kam es zu keinem signifikanten Unterschied zwischen Typ A- und Typ B-Monozyten. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von CD163 nahm hingegen in den unstimulierten und den stimulierten Typ B-Kulturen zu, wie in Abbildung 26b deutlich wird. In dem gezeigten Experiment stieg sie von 4.380 RE in der unstimulierten Typ A-Kultur auf 7.028 RE in der unstimulierten Typ B-Kultur. Bei den stimulierten Kulturen kam es mit einer Steigerung von 727 RE (Typ A) auf 23.772 RE (Typ B) zu einer noch deutlicheren Differenz. Im Durchschnitt stieg die MFI von CD163 in den unstimulierten Typ B-Kulturen um das 2,4-Fache ($p = 3,86 \times 10^{-4}$) und in den stimulierten Typ B-Kulturen um das 8,1-Fache ($p = 3,30 \times 10^{-7}$) der Typ A-Kulturen an.

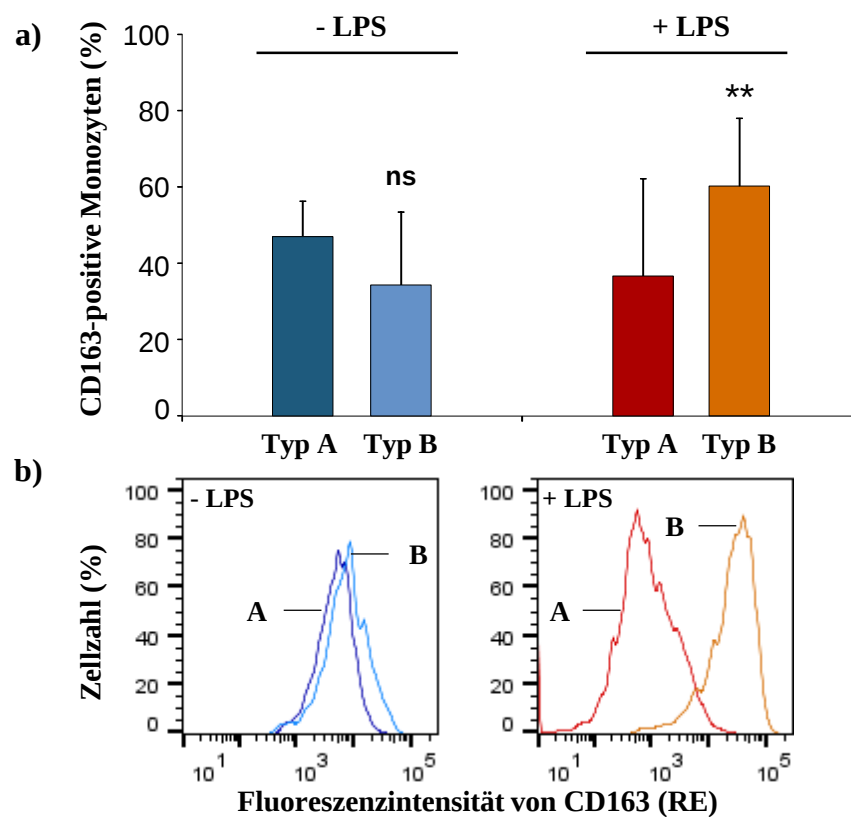


Abb. 26: Typ B-Monozyten exprimieren vermehrt den M2-Makrophagenmarker CD163. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Die Behandlung der Typ A- und Typ B-Monozyten erfolgte wie unter Abb. 15 beschrieben. Nach der Zellernte wurden die Monozyten mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper, der gegen CD163 gerichtet war, gefärbt. Der Anteil CD163-positiver Zellen sowie die MFI von CD163 wurden durchflusszytometrisch bestimmt. a) Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte + SD von 8 Experimenten. ns, nicht signifikant; **, $p < 0,01$; Typ B vs. Typ A. b) Das Histogramm zeigt ein repräsentatives Experiment.

Obwohl sich in dem oben genannten Experiment die MFIs von CD163 zwischen der unstimulierten und der stimulierten Typ B-Kultur relativ stark unterschieden, konnte im Mittel aller Experimente kein Unterschied der CD163-Expression innerhalb der Typ B-Kulturen

zwischen den unstimulierten und den stimulierten Zellen festgestellt werden. Die durchschnittliche MFI der unstimulierten Typ B-Monozyten betrug 12.311 ± 7.249 RE, jene der stimulierten Typ B-Monozyten 12.532 ± 7.455 RE.

Zusammenfassend betrachtet bewirkte die für die Typ B-Kulturen charakterisierende Vorinkubation eine Abnahme der CD14-Expression und eine dadurch bedingte Änderung im Verhältnis der Monozyten-Subpopulationen. Vor allem in den unstimulierten Typ B-Kulturen sank der Anteil des klassischen Monozyten-Subtyps $CD14^+/CD16^-$ zugunsten der $CD14/CD16^-$ -Population. Auch in den stimulierten Typ B-Kulturen war diese Umkehr im Verhältnis der Subpopulationen feststellbar, jedoch in geringerem Ausmaß. Die Stimulation mit LPS bewirkte einen teilweisen Erhalt der CD14-Expression in den Typ B-Kulturen. Des Weiteren kam es in den Typ B-Kulturen zu einer vermehrten Expression der M2-Makrophagenmarker CX3CR1 und CD163. Die Expressionsdichte von CX3CR1, gemessen an der MFI, stieg sowohl in den unstimulierten als auch den stimulierten Typ B-Kulturen auf das Doppelte der Typ A-Kulturen an. Die MFI von CD163 stieg in den unstimulierten Typ B-Kulturen ebenfalls auf das Doppelte, in den stimulierten Typ B-Kulturen sogar auf das 8-Fache der Typ A-Kulturen an. Somit kann von einer beginnenden Differenzierung der Monozyten in M2-Makrophagen während der Vorinkubation ausgegangen werden. Bei den unstimulierten Typ B-Kulturen wurde zudem eine leichte Zunahme der CD86-Expression festgestellt. Da diese, ausgehend von den frisch isolierten Zellen, in den Typ A-Kulturen jedoch abgefallen war, war diese Zunahme in den Typ B-Kulturen eher eine Rückkehr in das Ausgangsstadium als eine relevanter Anstieg des M1-Makrophagenmarkers. Die Expression von CCR2 blieb von der Vorinkubation hingegen sowohl in den unstimulierten als auch den stimulierten Typ B-Kulturen unbeeinflusst.

4.10 Statin blockiert die Differenzierung der Monozyten zu M2-Makrophagen

Wie bei den sofort stimulierten Typ A-Kulturen wurde auch bei den Typ B-Kulturen der Einfluss von Statin untersucht. Dazu wurde die Hälfte der Typ B-Kulturen mit Fluvastatin versetzt. Im Anschluss inkubierten die statinfreien und statinhaltigen Kulturen parallel für 24 Stunden vor, bevor sie entweder mit LPS stimuliert wurden oder durch die Zugabe von Medium unstimuliert blieben. Der weitere Ablauf erfolgte wie bei den Typ A-Kulturen.

Wie in Kap. 4.8 dargestellt, war in den Typ A-Kulturen nur eine geringe Beeinflussung der Antigenexpression durch Statin aufgetreten, die zudem ausschließlich die unstimulierten Typ A-Kulturen betraf. In den Typ B-Kulturen waren hingegen unstimulierte und stimulierte Monozyten durch die Statinzugabe von Veränderungen betroffen. In den statinhaltigen Typ B-Kulturen kam es gegenüber den Typ A-Kulturen zu einem stärkeren Rückgang der CD14-Expression als in den statinfreien Typ B-Kulturen (Abb. 27). Von den unstimulierten Typ B-Kulturen mit Statin waren nur noch 4,3 % der Zellen CD14-positiv. Dies entsprach einem Rückgang gegenüber den unstimulierten Typ B-Kulturen ohne Statin um 25 Prozentpunkte ($p =$

$1,55 \times 10^{-4}$). Dabei sank sowohl der Anteil der klassischen $CD14^+/CD16^-$ -Monozyten als auch gleichermaßen der intermediären $CD14^+/CD16^+$ -Population. Infolge dessen stieg der Anteil der $CD14^-/CD16^-$ -Population auf $95,2 \pm 4,0$ % an. In den stimulierten Typ B-Kulturen mit Statin ging die CD14-Expression auf 29 % zurück. Davon gehörten $24,9 \pm 15,8$ % zur $CD14^+/CD16^-$ -Population und $4,1 \pm 7,2$ % zur $CD14^+/CD16^+$ -Population. Wie auch bei den Typ B-Kulturen ohne Statin konnte also ein Teil der CD14-Expression durch die Stimulation mit LPS erhalten werden. Die Mehrheit der stimulierten Typ B-Monozyten mit Statin nahm allerdings den $CD14^-/CD16^-$ -Subtyp an ($70,0 \pm 18,3$ %).

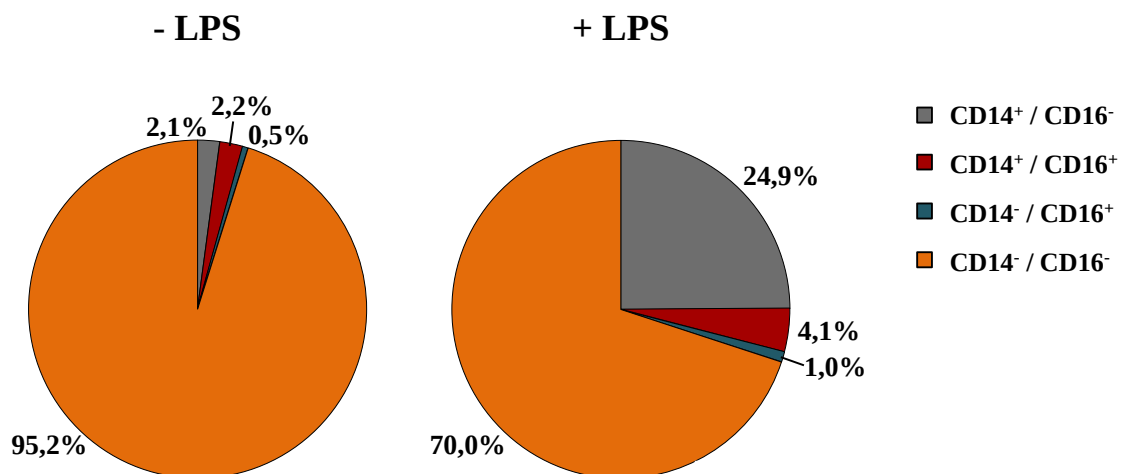


Abb. 27: Statin senkt die CD14-Expression in den Typ B-Kulturen. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Sie wurden mit 10 µg/ml Fluvastatin versetzt und für 24 Stunden vorinkubiert. Anschließend erhielt die Hälfte der Zellkulturen eine Stimulation mit LPS (+ LPS), die andere Hälfte eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (- LPS). Nach weiteren 24 Stunden wurden sie geerntet, gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Einteilung der vier Subpopulationen erfolgte wie unter Abb. 14 beschrieben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 8 Experimenten.

Anders als bei der Expression von CD14 und CD16 wurde die CCR2-Expression nur in den unstimulierten Typ B-Kulturen durch Statin beeinflusst. In diesen kamen prozentual weniger CCR2-positive Zellen vor als in den unstimulierten Typ B-Kulturen ohne Statin (Abb. 28a). Der Unterschied von 17,9 Prozentpunkten erreichte jedoch keine Signifikanz ($p = 0,08$). Die Abnahme der MFI in den unstimulierten Typ B-Kulturen mit Statin war hingegen hochsignifikant (Abb. 28b). In dem gezeigten Experiment fiel die MFI von 10.371 RE in der unstimulierten Typ B-Kultur ohne Statin auf 2.313 RE mit Statin. Insgesamt sank die MFI von CCR2 in den unstimulierten Typ B-Kulturen durch die Zugabe von Statin um 41,3 % ($p = 0,009$). Eine Suppression der CCR2-Expression durch das Statin um 29,5 % war auch in den unstimulierten Typ A-Kulturen beobachtet worden (vgl. Abb. 20). Demzufolge bewirkte Statin in der unstimulierten Typ B-Kultur einen stärkeren Rückgang der MFI von CCR2 als in der unstimulierten Typ A-Kultur ($p = 0,017$, nicht in Abb. 29 enthalten). Bei den stimulierten Typ

B-Kulturen traten nach Statinzugabe keine Änderungen der CCR2-Expression auf. Sowohl der Anteil CCR2-positiver Zellen als auch die MFI von CCR2 waren mit den stimulierten Typ B-Kulturen ohne Statin vergleichbar.

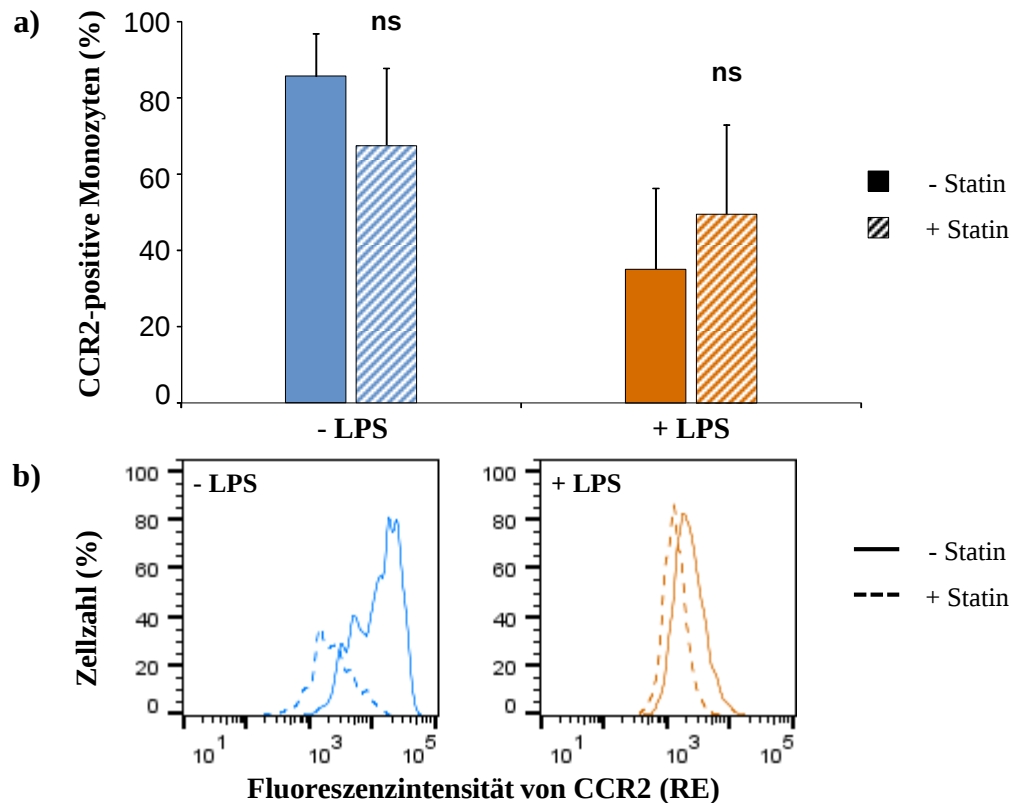


Abb. 28: Statin senkt die CCR2-Expression in den unstimulierten Typ B-Kulturen. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Eine Hälfte der Typ B-Kulturen erhielt 10 µg/ml Fluvastatin (+ Statin), die andere Hälfte eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (- Statin). Nach einer 24-stündigen Vorinkubation wurden die Zellen mit LPS stimuliert (+ LPS) oder erhielten abermals eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (- LPS). Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper, der gegen CCR2 gerichtet war, gefärbt. Der Anteil CCR2-positiver Zellen und die MFI von CCR2 wurden durchflusszytometrisch bestimmt. a) Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte + SD aus 5 Experimenten. ns, nicht signifikant; Typ B + Statin vs. Typ B - Statin. b) Das Histogramm zeigt ein repräsentatives Experiment.

Der Fraktalkin-Rezeptor CX3CR1 fand sich in den statinhaltigen Typ B-Kulturen nur auf einem geringen Prozentsatz der Zellen. Die Zahl der CX3CR1-positiven Zellen in den unstimulierten Typ B-Kulturen mit Statin unterschied sich mit $2,3 \pm 1,7$ % nicht von den unstimulierten Typ A-Kulturen (Abb. 29a). Der Anstieg der CX3CR1-Expression, welcher in den statinfreien unstimulierten Typ B-Kulturen beobachtet worden war, trat in den statinhaltigen Typ B-Kulturen also nicht auf. In den stimulierten Typ B-Kulturen mit Statin wurde dieser Anstieg ebenfalls blockiert. Die Zahl der CX3CR1-positiven Zellen blieb mit $2,0 \pm 1,8$ % vergleichbar

mit den stimulierten Typ A- und Typ B-Kulturen ohne Statin. Die MFI von CX3CR1, die in den statinfreien Typ B-Kulturen sowohl bei den unstimulierten als auch den stimulierten Zellen angestiegen war, blieb in den statinhaltigen Typ B-Kulturen auf dem Niveau der Typ A-Kulturen (Abb. 29b).

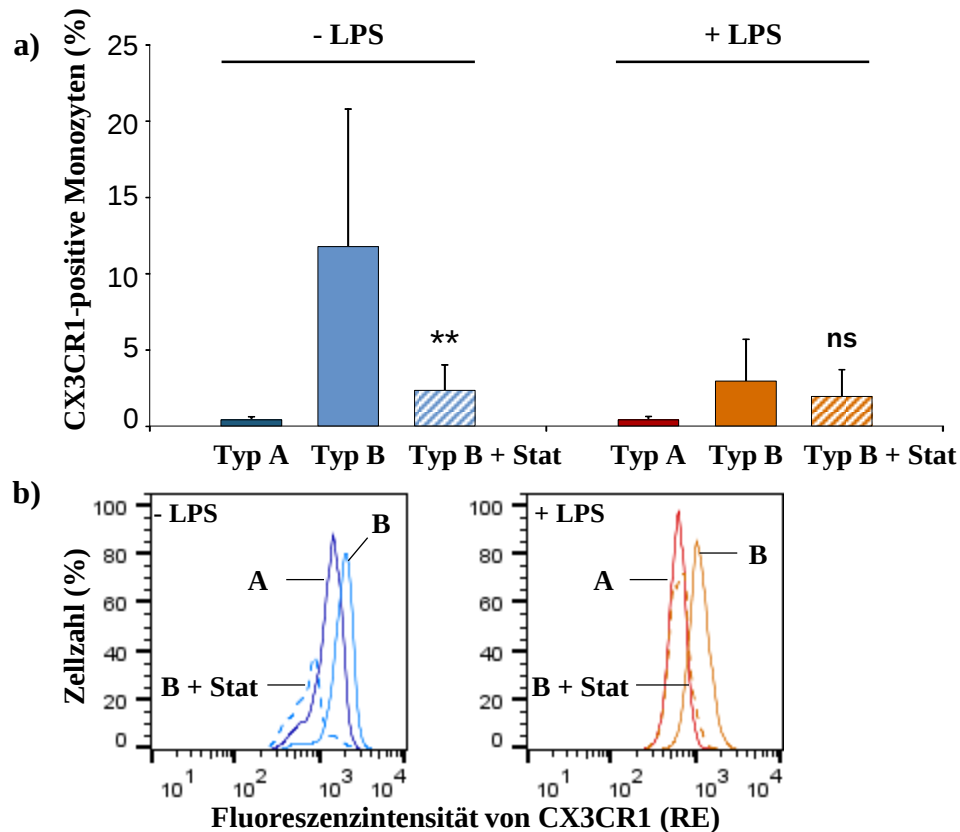


Abb. 29: Statin verhindert den Anstieg der CX3CR1-Expression auf Typ B-Monozyten. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Typ A-Monozyten wurden sofort mit LPS stimuliert (+ LPS) oder erhielten eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (-LPS). Die Typ B-Monozyten inkubierten für 24 Stunden in statinfreiem oder statinhaltigem Medium vor und erhielten im Anschluss die Stimulation mit LPS bzw. RPMI^{xx}. Nach der Ernte wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper, der gegen CX3CR1 gerichtet war, gefärbt. Der Anteil CX3CR1-positiver Zellen und die MFI von CX3CR1 wurden durchflusszytometrisch bestimmt. a) Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte + SD aus 4 Experimenten. ns, nicht signifikant; **, p<0,001; Typ B + Statin vs. Typ B - Statin. b) Das Histogramm zeigt ein repräsentatives Experiment.

Auf die Expression von CD86 nahm Statin in den Typ B-Kulturen keinen Einfluss. Sowohl die Anzahl der CD86-positiven Zellen als auch ihre MFI zeigten keinen Unterschied zu den statinfreien Typ B-Kulturen. Zwischen den stimulierten und den unstimulierten Typ B-Kulturen bewirkte Statin ebenfalls keine nennenswerten Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

Ähnlich dem M2-Makrophagenmarker CX3CR1 reagierte auch die CD163-Expression auf Statin. Der bei den stimulierten Typ B-Kulturen beobachtete Anstieg der CD163-positiven Zellen blieb unter Statineinfluss aus. Die Zahl der CD163-positiven Zellen war gegenüber den statinfreien Typ B-Kulturen deutlich vermindert und sank sogar unter das Niveau der Typ A-Kulturen. So waren nur noch $2,4 \pm 1,9$ % der unstimulierten und $20,7 \pm 15,2$ % der stimulierten Typ B-Monozyten mit Statin CD163-positiv (Abb. 30a). Auch die MFI von CD163 war in den statinhaltigen Typ B-Kulturen gegenüber den statinfreien Typ B-Kulturen vermindert, wie in Abbildung 30b verdeutlicht wird. In dem gezeigten Experiment sank die MFI von 7.028 RE in der unstimulierten Typ B-Kultur ohne Statin auf 5.178 RE in der unstimulierten Typ B-Kultur mit Statin. In der stimulierten Typ B-Kultur kam es zu einem Rückgang von 23.772 RE ohne Statin auf 2.882 RE mit Statin. Im Mittel aller Experimente unterschied sich die MFI der statinhaltigen Typ B-Kulturen nicht von den statinfreien Typ A-Kulturen. Durch die Vorinkubation in statinhaltigem Medium wurde die CD163-Expression und somit die Differenzierung der Zellen in M2-Makrophagen supprimiert.

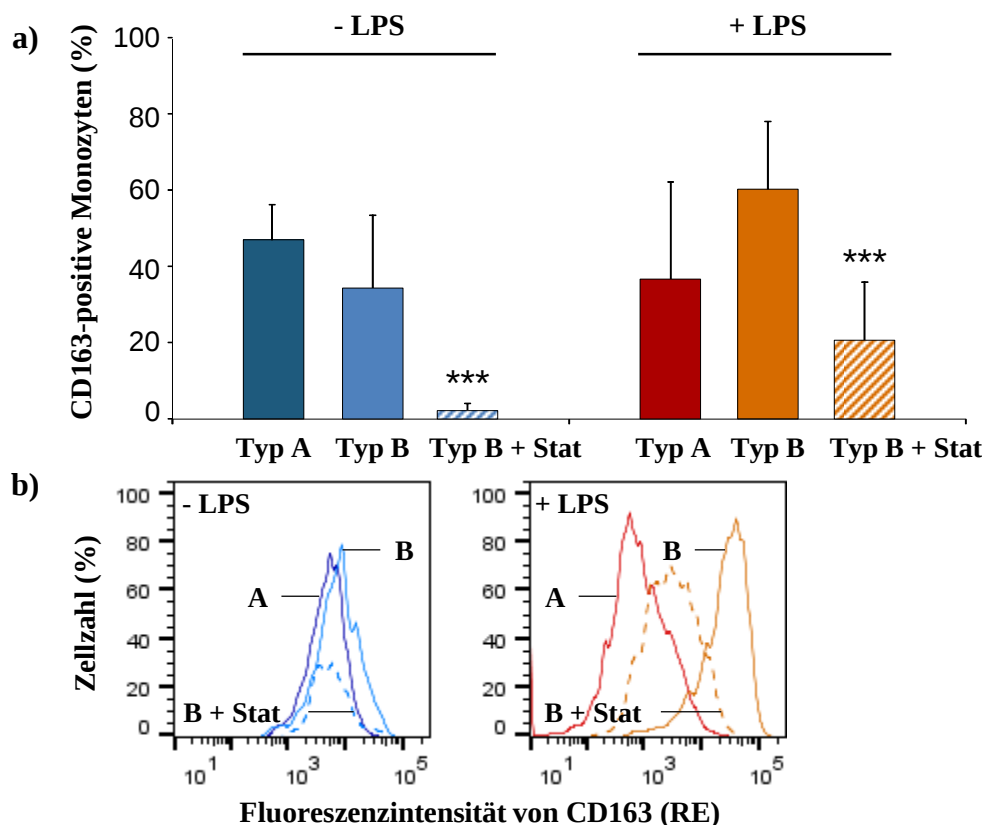


Abb. 30: Statin senkt die CD163-Expression auf Typ B-Monozyten. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Die Behandlung der Typ A- und Typ B-Monozyten erfolgte wie unter Abb. 20 beschrieben. Nach der Ernte wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper, der gegen CD163 gerichtet war, gefärbt. Der Anteil CD163-positiver Zellen und die MFI von CD163 wurden durchflusszytometrisch bestimmt. a) Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte + SD aus 8 Experimenten. ***, $p < 0,001$; Typ B + Stat vs. Typ B. b) Das Histogramm zeigt ein repräsentatives Experiment.

Im Gegensatz zu den Typ A-Kulturen zeigte sich in den Typ B-Kulturen ein Einfluss des Statins auf fast alle der untersuchten Oberflächenantigene. Die CD14-Expression der Typ B-Monozyten nahm während der Vorinkubation mit Statin stärker ab als während der Vorinkubation ohne Statin. Die Expression von CCR2 wurde durch das Statin in den unstimulierten Typ B-Kulturen supprimiert. Der Anstieg der M2-Makrophagenmarker CX3CR1 und CD163, welcher auf den statinfreien Typ B-Monozyten beobachtet worden war, wurde in statinhaltigem Medium blockiert. Somit schien das Statin einen Einfluss auf die zuvor beobachteten Differenzierungsvorgänge zu haben. Die Expression des M1-Makrophagenmarkers CD86 wurde als einziges Antigen in den Typ B-Kulturen durch Statin nicht verändert.

4.11 Statin erhöht nicht die Rate toter Zellen

Anhand des Peptids 7-AAD wurde die Rate avitaler Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Diese lag unmittelbar nach der Isolation bei $0,3 \pm 0,4$ % (Abb. 31). Nach der Kultivierung der Monozyten stieg dieser Anteil in unterschiedlichem Maße an. So wiesen Typ B-Kulturen eine höhere Sterberate auf als die Typ A-Kulturen, was aufgrund der längeren Inkubationszeit zu erwarten war. Der Anteil 7-AAD-positiver Zellen in den unstimulierten Typ A-Kulturen war mit $2,1 \pm 1,1$ % gegenüber den stimulierten Typ A-Monozyten mit $1,1 \pm 0,8$ % leicht erhöht. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant. In den Typ B-Kulturen fiel ebenfalls eine höhere Sterberate der unstimulierten als der stimulierten Kulturen auf. Der Unterschied von 3,5 Prozentpunkten zwischen den statinfreien Typ B-Kulturen ohne LPS und der statinfreien Typ B-Kultur mit LPS war signifikant ($p = 0,006$). Wie in Abbildung 31 ersichtlich, erhöhte Statin die Zahl toter Zellen weder in den unstimulierten noch in den stimulierten Typ A- oder Typ B-Kulturen. Die beobachteten Unterschiede zwischen den statinfreien und den statinhaltigen Kulturen, die in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurden, sind somit nicht auf einen Einfluss des Statins auf die Vitalität der Zellen zurückzuführen.

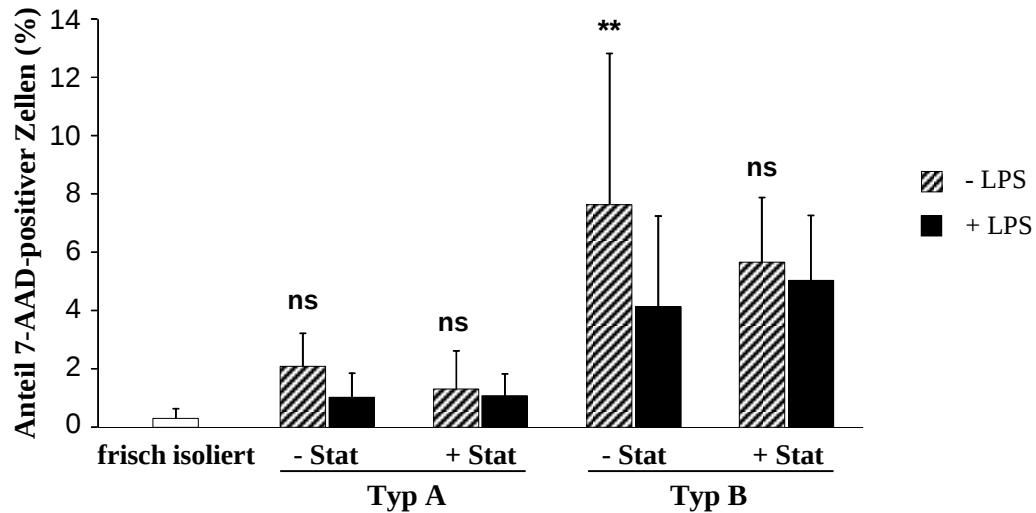


Abb. 31: Unstimulierte Monozyten-Kulturen enthalten mehr tote Zellen als stimulierte Kulturen. Humane Monozyten wurden aus buffy coats isoliert und in RPMI^{xx} kultiviert. Jeweils die Hälfte der Typ A- und Typ B-Monozyten erhielt 10 µg/ml Fluvastatin (+ Stat). Die andere Hälfte erhielt eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (- Stat). Typ A-Monozyten wurden sofort mit LPS stimuliert (+ LPS) oder erhielten eine volumenäquivalente Menge RPMI^{xx} (- LPS). Typ B-Monozyten inkubierten für 24 Stunden vor und erhielten im Anschluss die Stimulation mit LPS bzw. RPMI^{xx}. Nach der Ernte wurden die Zellen mit 7-AAD gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte + SD aus 8 Experimenten. ns, nicht signifikant; **, p<0,01; - LPS vs. + LPS.

5. Diskussion

5.1 Vorinkubierte Monozyten sind hyporesponsiv gegenüber LPS

In der vorliegenden Arbeit wurde der Unterschied zwischen sofort stimulierten Monozyten (Typ A) und 24 Stunden vorinkubierten Monozyten (Typ B) bei der Produktion ausgewählter Zytokine sowie der Expression von Oberflächenmolekülen untersucht. Die Zytokinausschüttung von Monozyten *in vitro* und der Einfluss verschiedener Stimuli war bereits häufig Gegenstand experimenteller Studien. Dabei wurde nachgewiesen, dass (frisch isolierte) stimulierte Monozyten potente Produzenten von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α oder MCP-1 sind (Ziegler-Heitbrock et al., 1992; Frankenberger et al., 1996). Die in dieser Arbeit verwendeten und mit LPS stimulierten Typ A-Monozyten zeigten ebenfalls die erwartete Ausschüttung von IL-1 β , IL-6 und IL-10. Die vorinkubierten Typ B-Monozyten verloren hingegen die Fähigkeit, IL-1 β und IL-6 zu sezernieren, während die Produktion von IL-10 gegenüber den Typ A-Monozyten sogar anstieg. Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass Monozyten bereits nach 3 Stunden Inkubation mit einer geringeren IL-1 β - und IL-6-Ausschüttung auf den Stimulus LPS reagieren als sofort stimulierte Monozyten. Nach 24 Stunden Vorinkubation sanken die IL-1 β - und IL-6-Konzentrationen trotz Stimulierung auf ein kaum noch messbares Niveau.

Bereits 1984 zeigten Wewers und Kollegen, dass Alveolarmakrophagen auf LPS mit einer geringeren IL-1 β -Ausschüttung reagieren als frisch isolierte Monozyten (Wewers et al., 1984). Eine andere Arbeitsgruppe konnte diese Daten ebenfalls mit Alveolarmakrophagen reproduzieren. Sie zeigte darüber hinaus, dass Makrophagenkulturen, welche durch *in vitro*-Kultivierung aus Monozyten ohne einen weiteren Wachstumsfaktor gewonnen wurden, nach 3-4 Tagen nahezu kein IL-1 β mehr enthielten (Elias et al., 1985). Neben Makrophagen wurde auch für dendritische Zellen die Abnahme der IL-1 β -Sekretion nachgewiesen (Netea et al., 2009). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Hyporesponsivität der Typ B-Monozyten auf eine Differenzierung der Zellen in Makrophagen zurückführen ist.

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die IL-6-Ausschüttung u.a. durch IL-1 β induziert wird (Bauer et al., 1989; Tosato und Jones 1990). Durch diese Abhängigkeit der IL-6-Sekretion von der IL-1 β -Konzentration erscheint es folgerichtig, dass der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Rückgang der IL-1 β -Sekretion in den vorinkubierten Typ B-Zellen von einem Rückgang der IL-6-Sekretion begleitet wurde. Zum anderen wurde jedoch auch eine gegensätzliche Regulation der IL-1 β - und IL-6-Produktion beschrieben. So wiesen Schindler und Kollegen eine verminderte IL-1 β -Sekretion in LPS-stimulierten PBMC nach, die mit IL-6 vorinkubiert wurden (Schindler et al., 1990). Eine weitere Arbeitsgruppe stellte einen Anstieg

des IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1Ra) durch IL-6 in humanen Makrophagenkulturen fest (Tilg et al., 1994).

Anders als bei den IL-1 β - und IL-6 Messungen wurde in den stimulierten Typ B-Kulturen ein Anstieg der IL-10 Konzentration festgestellt. Teixeira-Coelho et al. wiesen eine potente IL-10-Produktion in Makrophagen von Mäusen nach Stimulierung mit LPS nach (Teixeira-Coelho et al., 2014). Eligini et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen mit humanen Makrophagen, die durch 7-tägige Kultivierung aus Monozyten gewonnen worden waren. Dabei stieg die Expression und die mRNA von IL-10 vor allem in den antiinflammatorischen M2-Makrophagen an, wie anhand morphologischer Kriterien festgestellt wurde (Eligini et al., 2013). In einer Arbeit von Quero et al. wurde gezeigt, dass humane M2-Makrophagen im Gegensatz zu M1-Makrophagen die Hauptproduzenten von IL-10 sind. Gleichzeitig produzierten diese nach Stimulierung mit LPS kaum IL-1 β oder IL-6 (Quero et al., 2017). Im Hintergrund dieser Studien weisen die Zytokindaten der vorliegenden Arbeit auf eine Differenzierung der vorinkubierten Typ B-Monozyten in M2-Makrophagen hin.

5.2 Frisch isolierte humane Monozyten sind CD14⁺/CCR2⁺/CD16⁻/CX3CR1⁻

Zur näheren Charakterisierung der verwendeten Zellen wurde ihr Phänotyp mittels Durchflusszytometrie untersucht. In Anlehnung an die etablierte Einteilung von Monozyten in verschiedene Subpopulationen anhand ihrer CD14- und CD16-Expression wurden in der vorliegenden Arbeit vier Subtypen unterschieden: CD14⁺/CD16⁻, CD14⁺/CD16⁺, CD14⁻/CD16⁺ und CD14⁻/CD16⁻. In der Fachliteratur werden Monozyten meistens in die drei Subtypen klassisch (CD14⁺⁺/CD16⁻), intermediär (CD14⁺⁺/CD16⁺) und nicht-klassisch (CD14⁺/CD16⁺⁺) eingeteilt. Dabei definiert Ziegler-Heitbrock CD14⁺⁺-Monozyten als Zellen, deren MFI von CD14 sich um den Faktor 100 von der MFI der zugehörigen Isotypen-Kontrolle unterscheidet. Im Gegensatz dazu ist die MFI von CD14⁺-Zellen nur um den Faktor 10 höher als jene der Isotypen-Kontrolle (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Andere Autoren nutzen auch die Nomenklatur CD14⁺ für hohe Fluoreszenzintensitäten und CD14^{dim} (engl. diminished) für niedrige Fluoreszenzintensitäten von CD14 (Grage-Griebenow et al., 2001; Cros et al., 2010). In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzintensität der CD14-positiven Zellen nicht weiter unterteilt. Die als CD14⁺-definierten Zellen wiesen eine um den Faktor 50-100 höhere MFI als die zugehörigen Isotyp-Kontrollen auf und entsprachen damit eher den CD14⁺⁺-Zellen nach Ziegler-Heitbrock. Die als CD14⁻ bezeichneten Zellen waren demzufolge Zellen mit einer zu den Isotyp-Kontrollen geringfügig höheren oder vergleichbaren MFI von CD14. Im Blut junger gesunder Spender sind die klassischen Monozyten die am häufigsten vorkommende Subpopulation. In der vorliegenden Arbeit fanden sich kurz nach der Isolation ebenfalls vorwiegend die klassischen CD14⁺/CD16⁻-Monozyten. Auch der Anteil der intermediären CD14⁺/CD16⁺-Population und der nicht klassischen CD14⁻/CD16⁺-Population war mit den Daten der Fachliteratur vergleichbar. Allerdings waren unter den frisch isolierten Zellen bereits

7,5 ± 3,1% der Zellen CD14⁻ und CD16⁻-negativ. Da zur CD14⁻/CD16⁻-Population auch Monozyten gehörten, die eine leicht höhere CD14-Fluoreszenzintensität als die Isotyp-Kontrolle aufwiesen, ist ein Teil dieser Population vermutlich noch der klassischen CD14⁺/CD16⁻-Population zuzuordnen. Die restlichen Zellen repräsentieren womöglich eine geringe Verunreinigung der Monozytenkulturen durch Lymphozyten. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, dass es sich um Zellen handelt, die durch die Isolationsmethode mittels CD14-microbeads spontan die Antigene CD14 und CD16 von ihrer Oberfläche verloren. Bazil und Strominger zeigten, dass ein Teil frisch isolierter Monozyten spontan CD14 von der Zelloberfläche verliert und führten dies auf eine enzymatische Abspaltung des Antigens während des Isolationsverfahrens zurück (Bazil und Strominger, 1991).

Neben der CD14- und CD16-Expression werden gelegentlich auch der MCP-1-Rezeptor CCR2 und der Fraktalkinrezeptor CX3CR1 zur Klassifizierung des Monozytensubtyps herangezogen. Diese werden vor allem bei der Analyse von murinen Monozyten genutzt, finden sich aber auch auf humanen Zellen. Die klassische Monozytenpopulation zeichnet sich durch eine hohe CCR2-Expression aus, während CX3CR1 überwiegend von intermediären und nicht-klassischen Monozyten exprimiert wird (Gautier et al., 2009; Italiani und Boraschi, 2014). Entsprechend waren auch die frisch isolierten Monozyten in der vorliegenden Arbeit größtenteils CCR2-positiv und nur ein geringer Anteil CX3CR1-positiv. Überraschenderweise sank die CCR2-Expression nach 24-stündiger Kultivierung auf den stimulierten Typ A-Monozyten, während sich der Anteil der klassischen CD14⁺/CD16⁻-Population gegenüber den frisch isolierten Monozyten nicht änderte. In mehreren Arbeiten wurde eine derartige Reduktion der CCR2-Expression nach Stimulation mit LPS nachgewiesen (Sica et al., 1997; Parker et al., 2004). Der Chemokinrezeptor CCR2 spielt eine wichtige Rolle bei der Migration von klassischen Monozyten in atherosklerotische Plaques (Tacke et al., 2007; Gautier et al., 2009) und zu Orten der Inflammation, wie z.B. bei Lungeninfekten (Maus et al., 2005). Die Reduktion der CCR2-Expression unter LPS-Einfluss könnte Folge einer Autoregulation des Rezeptors sein, um die Chemotaxis von Zellen und damit den Entzündungsprozess zu begrenzen. Sica et al. diskutieren zudem die Möglichkeit, dass durch die Supprimierung von CCR2 Monozyten am Ort der Inflammation gehalten werden und eine Emmigration verhindert werden soll (Sica et al., 1997). Dem Fraktalkin-Rezeptor CX3CR1 wird ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Chemotaxis von Monozyten in atherosklerotische Plaques zugeschrieben. Eine Beeinflussung durch LPS konnte im Gegensatz zu CCR2 in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die Expression von CX3CR1 scheint demzufolge anderen Steuerungsmechanismen zu unterliegen als jene von CCR2. Allerdings war die CX3CR1-Expression auf den frisch isolierten Monozyten insgesamt nur gering ausgeprägt, sodass eine Beeinflussung durch äußere Faktoren möglicherweise in nicht messbare Bereiche fiel.

5.3 Vorinkubierte Monozyten differenzieren spontan zu M2-Makrophagen

Die Verteilung der Monozyten-Subpopulationen in den frisch isolierten Zellen entsprach den Angaben der Fachliteratur. Während der Kultivierung der Monozyten änderte sich allerdings ihr Subtyp. Diese Veränderungen betrafen in den Typ A-Kulturen zunächst nur die unstimulierten Monozyten. In diesen sank die Gesamtexpression von CD14 deutlich ab, während der Anteil der intermediären CD14⁺/CD16⁺-Population anstieg. In den stimulierten Typ A-Kulturen blieb die CD14-Expression hingegen erhalten. Ein passagerer Anstieg der intermediären CD14⁺/CD16⁺-Population konnte in den stimulierten Typ A-Kulturen nicht festgestellt werden. In den Typ B-Kulturen war sowohl bei den unstimulierten als auch bei den stimulierten Zellen ein Rückgang der CD14-Expression feststellbar, unter Einfluss von LPS allerdings in geringerem Ausmaß. Bisher gibt es keine vergleichbaren Studien, die die Verteilung der Monozyten-Subpopulationen nach ihrer Kultivierung untersuchten. Denkbar ist, dass unstimulierte Monozyten durch das Fehlen eines Aktivierungssignals apoptotisch werden und ihre Rezeptordichte dadurch abnimmt. Solange die Zellmembran noch intakt ist, sind solche frühen Apoptosevorgänge durch 7-AAD nicht detektierbar. Demzufolge erhielt die Stimulation mit LPS die Monozyten länger in einem monozytären, aktivierten Zustand. Heidenreich und Kollegen zeigten, dass die Apoptose von Monozyten durch eine Stimulation mit LPS für ca. 48 Stunden verhindert werden konnte. Gleichzeitig wiesen die Autoren eine zunehmende Annexin V-Bindung als Nachweis von frühen Apoptosevorgängen mit abnehmender CD14-Expression in unstimulierten Monozytenkulturen nach (Heidenreich et al., 1997). Eine andere mögliche Erklärung des CD14-Verlusts ist, dass Differenzierungsvorgänge einsetzen, die eine Änderung des Phänotyps der Monozyten bewirken. Mehrere Studien an humanen Monozyten zeigten eine abnehmende CD14-Expression mit steigendem Differenzierungsgrad der Zellen (Gantner et al., 1997; Escate et al., 2016). Eine ähnlich starke CD14-Reduktion ist auch bei der Differenzierung von Monozyten in dendritische Zellen nachweisbar (Gieseler et al. 1997; Gouwy et al., 2014). Ausgereifte Alveolarmakrophagen exprimieren deutlich weniger CD14 als undifferenzierte Monozyten (Droemann et al., 2005). Es wurde daher angenommen, dass der Verlust der CD14-Expression auf den kultivierten Monozyten auf eine beginnende Differenzierung der Zellen in Makrophagen und/oder dendritische Zellen hinweist. In den unstimulierten Typ A-Kulturen fiel eine Zunahme der intermediären CD14⁺/CD16⁺-Population auf. Mehrere Autoren gehen davon aus, dass die intermediären CD14⁺/CD16⁺-Monozyten eine reifere Monozytenpopulation darstellen, da ihr Anteil nach Behandlung mit M-CSF steigt und sie Oberflächenmoleküle exprimieren, die auch auf Makrophagen zu finden sind (Ziegler-Heitbrock, 2007). Der passagere Anstieg der intermediären Monozytenpopulation könnte somit Folge beginnender Differenzierungsvorgänge sein. Obwohl mehrere Arbeiten eine Zunahme der intermediären Population unter inflammatorischen Bedingungen beschreiben (Fingerle et al., 1993; Wong et al., 2012; Ziegler-Heitbrock, 2013), kam es in den mit LPS stimulierten Typ A-Kulturen erstaunlicherweise nicht zu einer Zunahme der CD14⁺/CD16⁺-Population. Möglicherweise ist das auf die relativ niedrige LPS-Konzentration zurückzuführen, die in dieser Arbeit genutzt wurde. Zudem setzte der Rückgang der CD14-Expression in den stimulierten Kulturen erst

später ein als in den unstimulierten Kulturen. Die Differenzierungsvorgänge waren unter dem Einfluss von LPS möglicherweise verzögert, sodass eine Expansion der intermediären Subpopulation erst zu einem späteren Zeitpunkt zu beobachten gewesen wäre.

Zur weiteren Verifizierung der Differenzierungsvorgänge wurden die Makrophagenmarker CD163 und CD86 auf den kultivierten Monozyten bestimmt. Während CD86 nur in den unstimulierten Typ B-Kulturen zunahm, nahm die CD163-Expression sowohl auf den unstimulierten als auch den stimulierten Typ B-Kulturen zu. Damit wurde erstmalig gezeigt, dass Differenzierungsprozesse in Monozyten bereits durch eine 24-stündige Inkubation der Zellen ohne einen Zusatz von Wachstumsfaktoren oder anderen Stimuli einsetzen.

Van den Heuvel und Kollegen beschrieben eine exklusive CD163-Expression nur auf Gewebemakrophagen und auf Makrophagen, welche aus Monozyten gewonnen wurden (Van den Heuvel et al., 1999). Auch andere Autoren bezeichnen CD163 als spezifisch für M2-Makrophagen (Liberale et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit fiel jedoch bereits ein großer Anteil an CD163-positiven Monozyten kurz nach der Isolation auf. Wie anhand der MFI-Messungen deutlich wurde, unterschied sich die Dichte von CD163 auf den frisch isolierten Monozyten jedoch nicht von den Typ A-Kulturen, wo nur eine geringe Prozentzahl der Zellen CD163-positiv war. Möglicherweise wurde die CD163-Expression durch das Isolationsverfahren auf den Monozyten kurzzeitig in geringer Dichte induziert. CD163 ist jedoch nicht ausschließlich auf Makrophagen vertreten. Einige Autoren beschreiben eine CD163-Expression auch auf frisch isolierten Monozyten (Tippett et al., 2011; Hudig et al., 2014). Dabei wird CD163 vor allem von der reiferen intermediären Monozyten-Subpopulation exprimiert (Buechler et al., 2000; Tippett et al., 2011). Obwohl in dieser Arbeit die CD163-Expression der einzelnen Subpopulationen nicht bestimmt wurde, fiel in den unstimulierten Typ A-Kulturen mit dem höheren CD14⁺/CD16⁺-Anteil auch eine höhere MFI von CD163 als in den stimulierten Typ A-Kulturen auf, in denen die intermediäre Monozytenpopulation kleiner war. CD163 befindet sich also möglicherweise nicht nur auf ausdifferenzierten Makrophagen, sondern bereits auf deren monozytären Vorstufen. Des Weiteren weist die höhere CD163-Expression in den unstimulierten Zellkulturen ebenfalls auf eine raschere Differenzierung der unstimulierten Monozyten als der stimulierten Monozyten hin, wie bereits oben postuliert.

Eine Stimulation der Monozyten mit LPS führt kurz nach der Zugabe des Stimulus zu einer Abspaltung der extrazellulären Domäne von CD163, während nach einer 24- bis 48-stündigen LPS-Stimulation die CD163-Expression auf den Zellen wieder ansteigt und den Ausgangswert sogar übertrifft (Sulahian et al., 2004; Weaver et al., 2007). Der in dieser Arbeit beobachtete hohe Anteil CD163-positiver Zellen unter den frisch isolierten Monozyten und ihr rascher Rückgang in den Typ A-Kulturen ist möglicherweise durch eine derartige Abspaltung bedingt. Nach insgesamt 48-stündiger Inkubation stieg in den Typ B-Kulturen sowohl der Anteil CD163-positiver Zellen als auch die MFI von CD163 und deutete damit stark auf eine Differenzierung der Monozyten in M2-Makrophagen hin.

CD163 wird durch IL-10 auf mit LPS stimulierten Monozyten und Makrophagen induziert (Buechler et al., 2000; Sulahian et al., 2004; Weaver et al., 2007). Auch in dieser Arbeit zeigten die stimulierten Typ B-Monozyten einen konkordanten Anstieg der IL-10-Produktion und der CD163-Expression. Gleichzeitig stieg die CD163-Expression allerdings auch auf den unstimulierten Typ B-Monozyten, in denen keine IL-10-Produktion nachgewiesen werden konnte. Somit scheint die CD163-Expression auch durch andere Faktoren induziert zu werden, wie z.B. durch eine zunehmende Adhäsion der Zellen oder Zell-Zell-Interaktionen.

Neben CD163 wurde auch der Fraktalkin-Rezeptor CX3CR1 als M2-Makrophagenmarker beschrieben (Tedesco et al., 2015). Damit weist der Anstieg der CX3CR1-Expression in den Typ B-Kulturen ebenfalls auf eine spontane Differenzierung der Monozyten in M2-Makrophagen hin. Ramos et al. stellten nach einer 20-stündigen Kultivierung von humanen Monozyten eine Reduktion der CX3CR1-Expression gegenüber frisch isolierten Monozyten fest. Durch die Zugabe von rekombinantem IL-10 konnte dieser Rückgang hingegen verhindert werden (Ramos et al., 2010). Die Expression von CX3CR1 scheint somit ebenso wie jene von CD163 einer Regulation durch IL-10 zu unterliegen. Gleichzeitig gelten M2-Makrophagen als Produzenten von IL-10 (Fabriek et al., 2005; Liberale et al., 2017). Dies deutet darauf hin, dass die CD163- und CX3CR1-Expression durch eine positive Rückkopplung gesteuert wird, möglicherweise um inflammatorische Prozesse zu begrenzen. CX3CR1 ist neben der Migration von Immunzellen auch an antiapoptotischen Prozessen beteiligt (Gautier et al., 2009). Mehrere Autoren postulieren eine Rolle des Fraktalkinrezeptors bei dem Überleben von Monozyten während ihrer Differenzierung in Makrophagen. Es wird angenommen, dass durch die Produktion von CX3CL1 (Fraktalkin) durch Endothelzellen, Makrophagen in atherosklerotischen Plaques der Apoptose entgehen (Gautier et al., 2009; White et al., 2014; Rahman et al., 2017). Dadurch trägt CX3CR1 auf den Monozyten und Makrophagen nicht nur durch eine Chemotaxis der Zellen, sondern auch als Überlebenssignal zum Progress der Atherosklerose bei.

CD86 wurde als M1-Makrophagenmarker beschrieben (Stöger et al., 2012; Xue et al. 2014). Ein hoher Anteil CD86-positiver Zellen fand sich jedoch bereits unter den frisch isolierten Monozyten und den Typ A-Monozyten. Da mehrere Autoren ebenfalls eine CD86-Expression auf frisch isolierten Monozyten beschreiben (Hudig et al., 2014; Patel et al., 2017), waren diese Ergebnisse zu erwarten. Ähnlich wie bei der CD163-Expression kann eine Induktion der CD86-Expression durch den Isolationsvorgang jedoch nicht ausgeschlossen werden. In den unstimulierten Typ B-Kulturen stieg die CD86-Expression nur leicht, in den stimulierten Typ B-Kulturen nicht. Somit sprechen diese Ergebnisse allenfalls für eine geringe Entwicklung von M1-Makrophagen in den unstimulierten Kulturen. Als weiterer M1-Makrophagenmarker wird gelegentlich CCR2 herangezogen. Auch dieser zeigte in den Typ B-Kulturen keine Zunahme, sodass eine Entstehung von M1-Makrophagen in dem genutzten Kulturmodell unwahrscheinlich erscheint. LPS gilt neben IFN- γ als ein Induktor der Differenzierung von Monozyten zu M1-Makrophagen (Italiani und Boraschi, 2014; Vogel et al., 2014; Smith et al., 2016). In der

vorliegenden Arbeit herrschten jedoch auch in den mit LPS stimulierten Typ B-Kulturen die M2-Makrophagen vor. Die Differenzierung der Typ B-Zellen in M2-Makrophagen setzte, wie oben erwähnt, vermutlich bereits während der Vorinkubation ein und war durch eine anschließende Stimulation mit LPS nicht mehr in einen anderen Subtyp umkehrbar. Denkbar ist auch, dass der Beobachtungszeitraum von 24 Stunden nach der Stimulation nicht ausreichte, um einen Anstieg von M1-Makrophagen zu verzeichnen oder dass zur Induktion von M1-Makrophagen höhere LPS-Konzentrationen notwendig sind als in der vorliegenden Arbeit verwendet. Makrophagen sind in der Lage, zwischen den verschiedenen Phänotypen zu wechseln. Haben sie jedoch einmal den M2-Subtyp angenommen, können nur hohe LPS-Konzentrationen einen Anstieg des M1-Makrophagenmarkers CD86 bewirken (Smith et al., 2016).

5.4 Statine verhindern die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen

Neben der Analyse der Zytokinproduktion und des Phänotyps der Monozyten bzw. Makrophagen war ein weiterer wesentlicher Aspekt der vorliegenden Arbeit die Untersuchung des Einflusses von Statin auf diese Parameter. Es fiel auf, dass Fluvastatin in den Typ A-Kulturen nur geringfügige Veränderungen in der Antigenexpression der Zellen bewirkte. Die Zytokinproduktion der Typ A-Monozyten wurde nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu veränderte Statin in den Typ B-Kulturen sowohl die Zytokinproduktion als auch die Antigenexpression erheblich. Der Rückgang der IL-1 β - und IL-6-Ausschüttung der Makrophagen konnte durch eine Vorinkubation der Zellen mit Statin verhindert werden. Gleichzeitig blockierte das Statin einen Anstieg des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in den stimulierten Typ B-Kulturen. Dies suggeriert, dass Statine die Vorinkubationsphase brauchen, um ihre Wirkung zu entfalten. Wie anhand verschieden langer Vorinkubationszeiten deutlich wurde, setzte eine Verminderung der IL-1 β - und IL-6-Produktion in den stimulierten Monozytenkulturen bereits nach 3 Stunden Vorinkubation ein. Ein signifikanter Erhaltungseffekt der Zytokinproduktion wurde ab 6 Stunden Vorinkubation mit dem Statin ersichtlich. Wurden das Statin und LPS gleichzeitig zu den Zellkulturen hinzugegeben, wie in den Typ A-Kulturen erfolgt, konnte keine Veränderung der Zytokinkonzentration festgestellt werden.

In mehreren Studien wurde angenommen, dass Statine die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in Monozyten induzieren. Montero et al. zeigten einen Anstieg der IL-1 β -Sekretion in mit *Mycobacterium tuberculosis*-Antigen stimulierten MNZ-Kulturen, welche Fluvastatin enthielten. Allerdings wurden die Zellen 12 Stunden vor der Stimulation in dem statinhaltigen Medium vorinkubiert (Montero et al., 2000). Ein ähnliches Versuchsprotokoll wurde durch Kuijk und Kollegen genutzt, welche eine Induktion der IL-1 β -Sekretion durch Simvastatin in stimulierten THP-1-Zellen postulierten. Auch in dieser Arbeit wurden die Zellen 24 Stunden vor der Stimulation mit Simvastatin vorinkubiert (Kuijk et al.,

2008). In beiden Arbeiten lagen keine Vergleichsdaten mit sofort stimulierten Monozyten vor. Kiener et al. zeigten einen Anstieg der IL-1 β -Produktion nach Behandlung humaner Monozyten mit weiteren lipophilen Statinen wie Atorvastatin oder Lovastatin. Das hydrophile Pravastatin hatte hingegen keinen Effekt auf die IL-1 β -Sekretion (Kiener et al., 2001). Auch in dieser Studie waren die Monozyten zuvor 24 Stunden in dem statinhaltigen Medium vorinkubiert worden. Gleichzeitig wiesen die Autoren auch eine geringe IL-1 β -Produktion durch die Statine allein nach. Diese trat jedoch nur bei unphysiologisch hohen Statinkonzentrationen auf. In der vorliegenden Arbeit konnte durch das Fluvastatin allein kein Anstieg der Zytokinkonzentrationen in den ansonsten unstimulierten Monozytenkulturen beobachtet werden. Es wird somit deutlich, dass Statine nicht selbst Induktoren der Zytokinproduktion sind, sondern den Rückgang der Zytokinproduktion, welcher durch Differenzierungsprozesse einsetzt, verhindern. Somit ist die Schlussfolgerung naheliegend, dass Statine einen direkten Einfluss auf die Differenzierung der Monozyten in Makrophagen ausüben. Da angenommen wurde, dass die abnehmende CD14-Expression auf den Differenzierungsprozess zurückzuführen ist, wäre unter Statin ein Anstieg der CD14-Positiven zu erwarten gewesen. Das Statin senkte jedoch die CD14-Expression in den Typ B-Kulturen unter das Niveau der Typ B-Kulturen ohne Statin. Möglich ist, dass Statin eine Apoptose der Typ B-Monozyten induzierte. In diesem Fall wäre jedoch auch ein Anstieg der 7-AAD-positiven Zellen zu erwarten gewesen. Die Zahl der 7-AAD-positiven Zellen unterschied sich jedoch zwischen den unbehandelten und den mit Fluvastatin behandelten Monozyten nicht. Unklar bliebe auch, warum die mit LPS stimulierten Typ B-Monozyten weiterhin hohe Mengen IL-1 β und IL-6 sezernierten. Vamvakopoulos und Green wiesen eine steigende Rate apoptotischer Monozyten mit steigender Einwirkzeit von Mevastatin nach (Vamvakopoulos und Green, 2003). Allerdings nutzten sie hohe Konzentrationen des Statins und untersuchten nicht die Auswirkungen der Apoptose auf die Oberflächenantigene der Monozyten. Die Ergebnisse einer Studie von Yadav et al. deuten darauf hin, dass auch andere Arbeitsgruppen eine Reduktion der CD14-Expression nach Statinbehandlung beobachteten (Yadav et al., 2016). In dieser Studie wurde jedoch ein vermehrter Zelltod durch das Statin ausgeschlossen. Die Ursache des vermehrten CD14-Verlusts unter Statin bleibt in dieser Arbeit unklar. Auffällig ist jedoch, dass die Stimulation mit LPS die CD14-Expression teilweise aufrechterhalten konnte. Somit scheinen Statine und LPS Gegenspieler bei der Steuerung der CD14-Expression zu sein. Da angenommen wurde, dass Statine die Monozyten in einen aktiven undifferenzierten Zustand erhalten, ist die Supprimierung von CD14 als LPS-Korezeptor möglicherweise die Folge eines negativen Feedback-Mechanismus, um eine Überproduktion von proinflammatorischen Zytokinen zu verhindern. Ob das Oberflächenantigen dabei von den Zellen internalisiert oder von der Zellmembran abgespalten wird, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Neben den Zytokindaten wies vor allem der fehlende Anstieg der makrophagentypischen Oberflächenantigene CD163 und CX3CR1 auf den in Statin vorinkubierten Typ B-Monozyten auf eine Hemmung von Differenzierungsvorgängen durch das Statin hin. Die zugrundeliegenden Mechanismen hierfür sind noch unklar. In einer Arbeit von Sasidhar und

Kollegen wurde anhand morphologischer Kriterien gezeigt, dass Statine einen monozytären Phänotyp von mit PMA differenzierten THP-1-Zellen aufrechterhielten. Durch die Zugabe von GGPP und anderen Metaboliten der Isoprenoidsynthese konnte dieser Erhaltungseffekt reversiert werden, sodass ein Teil der THP-1-Zellen einen differenzierten Phänotyp annahm (Sasidhar et al., 2017). Die Isoprenylierung von Proteinen ist auch an dem Signalweg zur IL-1 β -Produktion beteiligt. Mehrere Autoren postulieren, dass die anhaltende Ausschüttung von IL-1 β in statinhaltigen Monozytenkulturen ein posttranslationales Phänomen ist. So konnten Netea et al. in Monozyten und Makrophagen IL-1 β -mRNA nachweisen, eine Akkumulation von IL-1 β -precursor-Protein jedoch nur in Makrophagen (Netea et al., 2009). Das reife IL-1 β wird durch eine enzymatische Spaltung aus seinem precursor-Protein mittels Caspase-1 gebildet. Diese wiederum wird durch kleine G-Proteine wie Rac-1 reguliert. Eine Hemmung der Isoprenoidsynthese durch Statine führt zu einer verminderten Bildung von GGPP und FPP. Durch eine fehlende Isoprenylierung der kleinen G-Proteine dissoziieren diese von der Zellmembran, was zu einer Enthemmung intrazellulärer Signalkaskaden führt. Es kommt zu einer vermehrten Oligomerisation von Caspase-1, die dadurch aktiviert wird und vermehrt IL-1 β -Vorstufen zu reifem IL-1 β spaltet (Normand et al., 2009). Die verminderte IL-1 β -Sekretion von Makrophagen ist demnach einem Mangel an posttranslationaler Modifikation des IL-1 β -precursor Proteins geschuldet, der mit zunehmender Differenzierung einsetzt. Möglicherweise werden auch andere Proteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, auf diese Weise von Statinen beeinflusst und so die morphologischen Veränderungen während der Differenzierung blockiert. Da die Bildung und das Wachstum atherosklerotischer Plaques von der Differenzierung eingewanderter Monozyten in Makrophagen abhängen, ist die positive Wirkung von Statinen auf kardiovaskuläre Ereignisse möglicherweise auch auf die hier gezeigte Hemmung der Zelldifferenzierung zurückzuführen.

5.5 Limitationen

In vitro-Studien tragen zum Verständnis von Vorgängen *in vivo* bei, können jedoch nicht direkt auf physiologische Ereignisse im menschlichen Organismus übertragen werden. Während der positive Effekt von Statinen in klinischen Studien nachgewiesen werden konnte, ist der zugrundeliegende Mechanismus auf zellulärer Ebene noch weitestgehend unklar. Die Einteilung von Makrophagen in einen pro- und einen antiinflammatorischen Subtyp ist ebenfalls ein Phänomen der *in vitro*-Kultivierung. Es wird angenommen, dass Makrophagen *in vivo* weitaus heterogener sind und zwischen den Subtypen je nach erforderlicher Funktion wechseln (Italiani und Boraschi, 2014; Nahrendorf und Swirski, 2016). Eine weitere Limitation der Arbeit ist die Betrachtung reiner Monokulturen. Im menschlichen Organismus sind neben den Monozyten auch Lymphozyten, Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt. Ein erster Schritt in Richtung physiologischeren Verhältnissen wäre damit die Übertragung der hier genutzten Kulturbedingungen auf Kokulturen aus den o.g. Zellen.

Aufgrund des hohen Aufwands zur Gewinnung humaner Monozyten, ihrer Kultivierung und Charakterisierung wurden insgesamt nur acht Experimente durchgeführt. Die Bestimmung des Markers CX3CR1 erfolgte hierbei nur in vier Experimenten. Obwohl alle Experimente dieselben Ergebnisse zeigten und in der vorliegenden Arbeit kein Experiment aufgrund großer Abweichungen ausgeschlossen werden musste, sind weitere Studien dieser Art notwendig, um die hier gezeigten Ergebnisse zu bestätigen.

5.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine spontane Differenzierung von Monozyten in M2-Makrophagen nachgewiesen, wodurch weniger IL-1 β und IL-6, aber mehr IL-10 von diesen Zellen sezerniert wurde. Ausgehend davon lassen sich weitere Untersuchungen zur Funktion von Monozyten und Makrophagen konzipieren. Um die These einer Einwirkung von M2-Makrophagen in den vorinkubierten Monozytenkulturen zu erhärten, wäre die Messung weiterer M2-makrophagentypischer Faktoren wie die Produktion von TGF- β oder die Expression von CD206 interessant. Zudem könnte durch eine Verlängerung der Inkubationszeit der sofort stimulierten Typ A-Kulturen untersucht werden, ob auch Typ A-Monozyten im Verlauf M2-Makrophagenmarker exprimieren oder ob diese einen anderen Subtyp annehmen. Dadurch ließe sich unterscheiden, ob die Dauer der Vorinkubation vor einer Stimulation entscheidend für die Entwicklung von M2-Makrophagen ist oder die Inkubationsdauer insgesamt. Außerdem sollten die hier durchgeführten Untersuchungen auch mit anderen Statinen, wie z.B. Simvastatin oder Pravastatin erfolgen, um die gezeigten Effekte der gesamten Klasse der Statine zuordnen zu können.

Um die Wirkung der Statine auf Monozyten und Makrophagen *in vivo* zu erforschen, eignen sich vor allem klinische Studien. Es existieren bereits Studien, die den Effekt einer Statintherapie auf die Verteilung der Monozyten-Subpopulationen oder die Produktion von Zytokinen untersuchten (Fildes et al., 2008; Nakagomi et al., 2012). Interessant wäre jedoch auch die Wirkung von Statinen auf die Expression von Makrophagenmarkern der peripheren Blutzellen *in vivo* bzw. der Makrophagen in atherosklerotischen Plaques. Zudem sind die zugrundeliegenden molekularen Effekte von Statinen bisher nur unvollständig erforscht. Statine greifen bereits an einer frühen Stelle in die Isoprenoidsynthese ein. Durch ein besseres Kenntnis des Zusammenhangs zwischen Isoprenylierung von Proteinen und Differenzierungsvorgängen in der Zelle ließen sich womöglich gezieltere Arzneistoffe mit einem geringeren Nebenwirkungsspektrum entwickeln. Da Makrophagen neben der Atherosklerose auch an anderen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt sind (Wynn et al., 2013), könnten auf diese Weise neue Therapiemöglichkeiten entstehen.

6. Zusammenfassung

Monozyten und Makrophagen bilden heterogene Populationen mit unterschiedlichen Aufgaben im menschlichen Organismus. Durch die Ausschüttung von Zytokinen und zytotoxischen Substanzen sowie die Expression von Oberflächenantigenen üben sie ihre Funktionen aus. Statine sind Arzneistoffe, die durch die Hemmung des Enzyms HMG-CoA-Reduktase die Cholesterinbiosynthese in der Leber hemmen. Darüber hinaus haben sie immunmodulatorische Eigenschaften, die vermutlich durch die Hemmung der Isoprenoidsynthese vermittelt werden. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass Statine die Zytokinproduktion von Monozyten unterschiedlich beeinflussen. Diese Unterschiede entstanden vor allem durch verschiedene Vorinkubationszeiten mit dem Statin. In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss der Vorinkubation auf die Produktion ausgewählter Zytokine von humanen *in vitro*-kultivierten Monozyten untersucht sowie der Phänotyp der Zellen charakterisiert werden. Hierzu wurden die Zellen in zwei verschiedene Kulturmodelle, Typ A und Typ B, eingeteilt. Typ A-Monozyten erhielten keine Vorinkubationszeit und wurden sofort stimuliert, während Typ B-Monozyten zunächst 24 Stunden vorinkubiert und erst im Anschluss stimuliert wurden. Als Stimulus wurde das Bakterienendotoxin LPS genutzt. Begleitend wurden auch unstimulierte Kulturen angelegt. Sowohl im Typ A- als auch im Typ B-Modell wurde die Hälfte der Kulturen mit Fluvastatin versetzt um den Einfluss des Statins auf die Zytokinproduktion und die Antigenexpression zu untersuchen. Für die Messungen der Konzentrationen von IL-1 β , IL-6 und IL-10 wurden ELISAs genutzt. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression von CD14, CD16, CCR2, CX3CR1, CD163 und CD86 auf den Zellen bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass sofort stimulierte Monozyten sowohl hohe Mengen der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 als auch des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 produzieren. Eine Vorinkubation von 24 Stunden vor Zugabe des Stimulus blockierte die proinflammatorische Antwort der Zellen vollständig. Gleichzeitig blieb die IL-10-Produktion unbeeinträchtigt und stieg durch die Vorinkubation sogar um 25 % an. Näher betrachtet traten die Änderungen der Zytokinproduktion bereits nach drei Stunden Vorinkubation auf und konnten durch die Zugabe von Fluvastatin verhindert werden. Das Statin sorgte in den stimulierten Typ B-Kulturen für eine erhaltene IL-1 β - und IL-6-Produktion und verhinderte den Anstieg von IL-10. Diese Vorgänge wurden von phänotypischen Veränderungen der Monozyten begleitet. Die frisch isolierten Zellen wiesen überwiegend den klassischen CD14⁺/CD16⁻-Subtyp sowie eine hohe CCR2- und eine niedrige CX3CR1-Expression auf. Während ihrer Kultivierung änderten die Typ A-Monozyten ihren Phänotyp, vor allem in den unstimulierten Kulturen. Statin hatte dabei nur einen geringfügigen Einfluss auf die Antigenexpression in den Typ A-Kulturen. Die Typ B-Monozyten waren hingegen von größeren Veränderungen betroffen. Sie exprimierten signifikant mehr die M2-Makrophagenmarker CD163 und CX3CR1, während die Expression des M1-Makrophagenmarkers CD86 nicht anstieg. Die vermehrte Expression der M2-Makrophagenmarker wurde durch eine Vorinkubation der Zellen mit Statin

komplett blockiert. Dies führte zu der Annahme, dass die Hyporesponsivität der Typ B-Monozyten auf eine Differenzierung der Zellen in antiinflammatorische M2-Makrophagen zurückzuführen ist und Statine diese Differenzierung hemmen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Monozyten auch ohne die Zugabe von Wachstumsfaktoren fähig sind, spontan zu Makrophagen zu differenzieren. Sie nehmen dabei vorwiegend einen antiinflammatorischen M2-Subtyp an, der vermehrt CX3CR1 und CD163 exprimiert. Beide Oberflächenantigene sind an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt. Durch die Suppression dieser Moleküle und der Differenzierungsvorgänge wirken Statine daher möglicherweise nicht nur durch die Senkung des Cholesterinspiegels atheroprotektiv.

Literaturverzeichnis

Bauer J, Bauer TM, Kalb T, Taga T, Lengyel G, Hirano T, Kishimoto T, Acs G, Mayer L, Gerok W (1989) Regulation of interleukin 6 receptor expression in human monocytes and monocyte-derived macrophages. Comparison with the expression in human hepatocytes. *J Exp Med* 170:1537–1549.

Bazil V, Strominger JL (1991) Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immunol* 147:1567–1574.

Berg KE, Ljungcrantz I, Andersson L, Bryngelsson C, Hedblad B, Fredrikson GN, Nilsson J, Björkbacka H (2012) Elevated CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes predict cardiovascular events. *Circ Cardiovasc Genet* 5:122–131.

Boyette LB, Macedo C, Hadi K, Elinoff BD, Walters JT, Ramaswami B, Chalasani G, Taboas JM, Lakkis FG, Metes DM (2017) Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS ONE* 12(4):e0176460.

Brooks AR, Lelkes PI, Rubanyi GM (2002) Gene expression profiling of human aortic endothelial cells exposed to disturbed flow and steady laminar flow. *Physiol Genomics* 9:27–41.

Buechler C, Ritter M, Orsó E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G (2000) Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 67:97–103.

Chávez-Sánchez L, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Zenteno E, Ledesma-Soto Y, Montoya-Díaz E, Tesoro-Cruz E, Madrid-Miller A, Blanco-Favela F (2010) The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL induces IL-1 β , IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages. *Lipids Health Dis* 9:117.

Chelombitko MA, Shishkina VS, Ilyinskaya OP, Kaminnyi AI, Pavlunina TO, Samovilova NN, Gracheva EV, Tararak EM, Prokazova NV (2014) A cytofluorometric study of membrane rafts in human monocyte subsets in atherosclerosis. *Acta naturae* 6:80–88.

Chen L, Frister A, Wang S, Ludwig A, Behr H, Pippig S, Li B, Simm A, Hofmann B, Pilowski C, Koch S, Buerke M, Rose-John S, Werdan K, Loppnow H (2009) Interaction of vascular smooth muscle cells and monocytes by soluble factors synergistically enhances IL-6 and MCP-1 production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296:H987-H996.

Combadière C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B, Merval R, Proudfoot A, Tedgui A, Mallat Z (2008) Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytoysis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 117:1649–1657.

Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang S, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C, Jais J, D'Cruz D, Casanova J, Trouillet C, Geissmann F (2010) Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33:375–386.

Droemann D, Goldmann T, Tiedje T, Zabel P, Dalhoff K, Schaaf B (2005) Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res* 6:68.

Elias JA, Schreiber AD, Gustilo K, Chien P, Rossman MD, Lammie PJ, Daniele RP (1985) Differential interleukin 1 elaboration by unfractionated and density fractionated human alveolar macrophages and blood monocytes: relationship to cell maturity. *J Immunol* 135:3198–3204.

Eligini S, Crisci M, Bono E, Songia P, Tremoli E, Colombo GI, Colli S (2013) Human monocyte-derived macrophages spontaneously differentiated in vitro show distinct phenotypes. *J Cell Physiol* 228:1464–1472.

Escate R, Padro T, Badimon L (2016) LDL accelerates monocyte to macrophage differentiation: Effects on adhesion and anoikis. *Atherosclerosis* 246:177–186.

Esfahani M, Bigler RD, Gressen E (1993) Effect of lovastatin on cell surface expression of Fc receptors or CD14 antigen in human monocytes. *Biochem Pharmacol* 46:2333–2336.

Fabrick BO, Dijkstra CD, van den Berg, Timo K (2005) The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology* 210:153–160.

Fildes JE, Shaw SM, Mitsidou A, Rogacev K, Leonard CT, Williams SG, Yonan N (2008) HMG-CoA reductase inhibitors deplete circulating classical and non-classical monocytes following human heart transplantation. *Transpl Immunol* 19:152–157.

Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Ströbel M, Ziegler-Heitbrock HW (1993) The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 82:3170–3176.

Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW (1996) Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 87:373–377.

Fu H, Spieler F, Großmann J, Riemann D, Larisch M, Hiebl B, Schlecht K, Jaschke C, Bartling B, Hofmann B, Unverzagt S, Koch S, Pilowski C, Simm A, Silber R, Gielen S, Seliger B, Schlitt A, Ebel H, Müller-Werdan U, Buerke M, Werdan K, Loppnow H (2014) Interleukin-1 potently contributes to 25-hydroxycholesterol-induced synergistic cytokine production in smooth muscle cell-monocyte interactions. *Atherosclerosis* 237:443–452.

Gantner F, Kupferschmidt R, Schudt C, Wendel A, Hatzelmann A (1997) In vitro differentiation of human monocytes to macrophages: change of PDE profile and its relationship to suppression of tumour necrosis factor- α release by PDE inhibitors. *Br J Pharmacol* 121:221–231.

Gautier EL, Jakubzick C, Randolph GJ (2009) Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1412–1418.

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)* 327:656–661.

Gieseler R, Heise D, Soruri A, Schwartz P, Peters JH (1998) In-vitro differentiation of mature dendritic cells from human blood monocytes. *Dev Immunol* 6:25–39.

Gouwy M, Struyf S, Leutenez L, Pörtner N, Sozzani S, van Damme J (2014) Chemokines and other GPCR ligands synergize in receptor-mediated migration of monocyte-derived immature and mature dendritic cells. *Immunobiology* 219:218–229.

Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M (2001) Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 69:11–20.

Hansson GK, Libby P (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature reviews. Immunology* 6:508–519.

Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ (1994) Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med* 180:631–640.

Heidenreich S, Schmidt M, August C, Cullen P, Rademaekers A, Pauels HG (1997) Regulation of human monocyte apoptosis by the CD14 molecule. *J Immunol* 159:3178–3188.

Hudig D, Hunter KW, Diamond WJ, Redelman D (2014) Properties of human blood monocytes. II. Monocytes from healthy adults are highly heterogeneous within and among individuals. *Cytometry B Clin Cytom* 86:121–134.

Italiani P, Boraschi D (2014) From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol* 5:514.

Kiener PA, Davis PM, Murray JL, Youssef S, Rankin BM, Kowala M (2001) Stimulation of inflammatory responses in vitro and in vivo by lipophilic HMG-CoA reductase inhibitors. *Int Immunopharmacol* 1:105–118.

Kuijk LM, Mandey SH, Schellens I, Waterham HR, Rijkers GT, Coffe PJ, Frenkel J (2008) Statin synergizes with LPS to induce IL-1 β release by THP-1 cells through activation of caspase-1. *Mol Immunol* 45:2158–2165.

Liberal L, Dallegri F, Montecucco F, Carbone F (2017) Pathophysiological relevance of macrophage subsets in atherogenesis. *Thromb Haemost* 117:7–18.

Lindholm MW, Nilsson J (2007) Simvastatin stimulates macrophage interleukin-1 β secretion through an isoprenylation-dependent mechanism. *Vasc Pharmacol* 46:91–96.

Loppnow H, Buerke M, Werdan K, Rose-John S (2011a) Contribution of vascular cell-derived cytokines to innate and inflammatory pathways in atherogenesis. *J Cell Mol Med* 15:484–500.

Loppnow H, Zhang L, Buerke M, Lautenschläger M, Chen L, Frister A, Schlitt A, Luther T, Song N, Hofmann B, Rose-John S, Silber R, Müller-Werdan U, Werdan K (2011b) Statins potently reduce the cytokine-mediated IL-6 release in SMC/MNC cocultures. *J Cell Mol Med* 15:994–1004.

Loyola E, Sadana R, Stein C (2012) Der europäische Gesundheitsbericht 2012: Ein Wegweiser zu mehr Wohlbefinden. <http://www.euro.who.int/de/data-and-evidence/european-health-report/european-health-report-2012>. Online abgerufen am 30.01.2019

Maus UA, Wellmann S, Hampl C, Kuziel WA, Srivastava M, Mack M, Everhart MB, Blackwell TS, Christman JW, Schlöndorff D, Bohle RM, Seeger W, Lohmeyer J (2005) CCR2-positive monocytes recruited to inflamed lungs downregulate local CCL2 chemokine levels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L350-8.

Montero MT, Hernández O, Suárez Y, Matilla J, Ferruelo AJ, Martínez-Botas J, Gómez-Coronado D, Lasunción MA (2000) Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition stimulates caspase-1 activity and Th1-cytokine release in peripheral blood mononuclear cells. *Atherosclerosis* 153:303–313.

Morice M, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnàr F, Falotico R (2002) A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* 346:1773–1780.

Moutzouri E, Tellis CC, Rousouli K, Liberopoulos EN, Milionis HJ, Elisaf MS, Tselepis AD (2012) Effect of simvastatin or its combination with ezetimibe on Toll-like receptor expression and lipopolysaccharide - induced cytokine production in monocytes of hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 225:381–387.

Nahrendorf M, Swirski FK (2016) Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function. *Circ Res* 119:414–417.

Nakagomi A, Seino Y, Kohashi K, Kosugi M, Endoh Y, Kusama Y, Atarashi H, Mizuno K (2012) Effects of statin therapy on the production of monocyte pro-inflammatory cytokines, cardiac function, and long-term prognosis in chronic heart failure patients with dyslipidemia. *Circ J* 76:2130–2138.

Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LAB, Opitz B, van der Meer, Jonathan H M, van de Veerdonk, Frank L, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, van der Meer, Jos W M, Dinarello CA (2009) Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood* 113:2324–2335.

Normand S, Massonnet B, Delwail A, Favot L, Cuisset L, Grateau G, Morel F, Silvain C, Lecron J (2009) Specific increase in caspase-1 activity and secretion of IL-1 family cytokines: a putative link between mevalonate kinase deficiency and inflammation. *Eur Cytokine Netw* 20:101–107.

Parker LC, Whyte MKB, Vogel SN, Dower SK, Sabroe I (2004) Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 Agonists Regulate CCR Expression in Human Monocytic Cells. *J Immunol* 172:4977–4986.

Patel VK, Williams H, Li SCH, Fletcher JP, Medbury HJ (2017) Monocyte inflammatory profile is specific for individuals and associated with altered blood lipid levels. *Atherosclerosis* 263:15–23.

Quero L, Hanser E, Manigold T, Tiaden AN, Kyburz D (2017) TLR2 stimulation impairs anti-inflammatory activity of M2-like macrophages, generating a chimeric M1/M2 phenotype. *Arthritis Res Ther* 19:245.

Rahman K, Vengrenyuk Y, Ramsey SA, Vila NR, Girgis NM, Liu J, Gusarova V, Gromada J, Weinstock A, Moore KJ, Loke P, Fisher EA (2017) Inflammatory Ly6Chi monocytes and their conversion to M2 macrophages drive atherosclerosis regression. *J Clin Invest* 127:2904–2915.

Ramos MV, Fernández GC, Brando RJF, Panek CA, Bentancor LV, Landoni VI, Isturiz MA, Palermo MS (2010) Interleukin-10 and interferon-gamma modulate surface expression of fractalkine-receptor (CX(3)CR1) via PI3K in monocytes. *Immunology* 129:600–609.

Ross R (1999) Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138:S419-20.

Saha P, Geissmann F (2011) Toward a functional characterization of blood monocytes. *Immunol Cell Biol* 89:2–4.

Sasidhar MV, Chevoor SK, Eickelberg O, Hartung H, Neuhaus O (2017) Downregulation of monocytic differentiation via modulation of CD147 by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *PloS ONE* 12:e0189701.

Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA (1990) Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75:40–47.

Sica A, Sacconi A, Borsatti A, Power CA, Wells TN, Luini W, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A (1997) Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. *J Exp Med* 185:969–974.

Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J (2008) Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* 67:152–159.

Smith TD, Tse MJ, Read EL, Liu WF (2016) Regulation of macrophage polarization and plasticity by complex activation signals. *Integr Biol (Camb)* 8:946–955.

Stöger JL, Gijbels MJJ, van der Velden S, Manca M, van der Loos CM, Biessen EAL, Daemen MJAP, Lutgens E, de Winther MPJ (2012) Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis* 225:461–468.

Sulahian TH, Pioli PA, Wardwell K, Guyre PM (2004) Cross-linking of FcγR triggers shedding of the hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 76:271–277.

Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van Rooijen N, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ (2007) Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 117:185–194.

Tedesco S, Bolego C, Toniolo A, Nassi A, Fadini GP, Locati M, Cignarella A (2015) Phenotypic activation and pharmacological outcomes of spontaneously differentiated human monocyte-derived macrophages. *Immunobiology* 220:545–554.

Teixeira-Coelho M, Guedes J, Ferreira P, Howes A, Pedrosa J, Rodrigues F, Lai WS, Blackshear PJ, O'Garra A, Castro AG, Saraiva M (2014) Differential post-transcriptional regulation of IL-10 by TLR2 and TLR4-activated macrophages. *Eur J Immunol* 44:856–866.

Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW (1994) Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83:113–118.

Tippett E, Cheng W, Westhorpe C, Cameron PU, Brew BJ, Lewin SR, Jaworowski A, Crowe SM (2011) Differential expression of CD163 on monocyte subsets in healthy and HIV-1 infected individuals. *PloS ONE* 6:e19968.

Tosato G, Jones KD (1990) Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. *Blood* 75:1305–1310.

Vamvakopoulos JE, Green C (2003) HMG-CoA reductase inhibition aborts functional differentiation and triggers apoptosis in cultured primary human monocytes: a potential mechanism of statin-mediated vasculoprotection. *BMC Cardiovasc Disord* 3:6.

Van den Heuvel MM, Tensen CP, van As JH, Van den Berg, T K, Fluitsma DM, Dijkstra CD, Döpp EA, Droste A, van Gaalen FA, Sorg C, Högger P, Beelen RH (1999) Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J Leukoc Biol* 66:858–866.

Vogel DYS, Glim JE, Stavenuiter AWD, Breur M, Heijnen P, Amor S, Dijkstra CD, Beelen RHJ (2014) Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology* 219:695–703.

Weaver LK, Pioli PA, Wardwell K, Vogel SN, Guyre PM (2007) Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 81:663-671.

Weber C, Erl W, Weber PC (1995) Lovastatin induces differentiation of Mono Mac 6 cells. *Cell Biochem Funct* 13:273–277.

Wewers MD, Rennard SI, Hance AJ, Bitterman PB, Crystal RG (1984) Normal human alveolar macrophages obtained by bronchoalveolar lavage have a limited capacity to release interleukin-1. *J Clin Invest* 74:2208–2218.

White GE, McNeill E, Channon KM, Greaves DR (2014) Fractalkine promotes human monocyte survival via a reduction in oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:2554–2562.

Wong KL, Tai JJ, Wong W, Han H, Sem X, Yeap W, Kourilsky P, Wong S (2011) Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118:e16-e31.

Wong KL, Yeap WH, Tai JJY, Ong SM, Dang TM, Wong SC (2012) The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* 53:41–57.

Woollard KJ, Geissmann F (2010) Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nature reviews. Cardiology* 7:77–86.

Wynn TA, Chawla A, Pollard JW (2013) Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496:445–455.

Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, Nardo D de, Gohel TD, Emde M, Schmidleithner L, Ganesan H, Nino-Castro A, Mallmann MR, Labzin L, Theis H, Kraut M, Beyer M, Latz E, Freeman TC, Ulas T, Schultze JL (2014) Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 40:274-288.

Yadav A, Betts MR, Collman RG (2016) Statin modulation of monocyte phenotype and function: implications for HIV-1-associated neurocognitive disorders. *J Neurovirology* 22:584–596.

Zawada AM, Rogacev KS, Schirmer SH, Sester M, Böhm M, Fliser D, Heine GH (2012) Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease. *Immunobiology* 217:1273–1284.

Zhou Q, Liao JK (2010) Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives. *Circ J* 74:818–826.

Ziegler-Heitbrock HW, Ströbel M, Kieper D, Fingerle G, Schlunck T, Petersmann I, Ellwart J, Blumenstein M, Haas JG (1992) Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood* 79:503–511.

Ziegler-Heitbrock L (2007) The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 81:584–592.

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu Y, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116:e74-80.

Ziegler-Heitbrock L, Hofer TPJ (2013) Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol* 4:23.

Thesen

1. Monozyten und Makrophagen sind an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt.
2. Sofort stimulierte Monozyten sind potente Produzenten von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen.
3. Statine beeinflussen die Zytokinproduktion sofort stimulierter Monozyten nicht.
4. Vorinkubierte, stimulierte Monozyten verlieren die Fähigkeit, IL-1 β und IL-6 zu produzieren.
5. Statine allein stimulieren die Zytokinausschüttung der Monozyten nicht.
6. Statin erhält die Zytokinausschüttung vorinkubierter, stimulierter Monozyten für mind. 24 Stunden aufrecht.
7. Monozyten ändern während ihrer Kultivierung ihren CD14/CD16-Subtyp.
8. Monozyten differenzieren während der Vorinkubation spontan zu M2-Makrophagen.
9. Statine verhindern die Differenzierung von Monozyten zu M2-Makrophagen.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet. Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe. Dies ist der erste Promotionsversuch, der von mir unternommen wird.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich danke in erster Linie meinem Betreuer Herr Prof. Dr. Harald Loppnow, der mir diese Arbeit ermöglichte, mich inhaltlich und methodisch in meiner Zeit als Doktorandin begleitete und mich mit viel Geduld bei der Erstellung der Dissertation unterstützte. Des Weiteren danke ich den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Claudia Pilowski und Frau Susanne Koch, die mich in das sterile Arbeiten mit Zellkulturen und in verschiedene Messverfahren einführten und mich bei der Durchführung der Experimente unterstützten. Herrn Andreas Renker danke ich für die orthografische Korrektur der Dissertation.

Darüber hinaus danke ich allen Freunden und Verwandten, die mir während meiner Zeit als Promoventin motivierend und beratend zur Seite standen.