

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Universitätsprofessor Dr. med. vet. M. Stangassinger

Angefertigt an der III. Medizinischen Klinik für
Kardiologie und Kreislaufkrankungen
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
(Prof. Dr. med. A. May)

**Zur Wirkung von Cyclophilin A bei der Thrombozyten-Endothel Interaktion und
bei ischämischen Kardiomyozyten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Katharina Julia Schuster
aus
Laupheim

München 2012

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Stangassinger
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Gerhards

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Atherosklerose: Entstehung und Folgen.....	3
2.1.1	Pathogenese von Atherosklerose.....	3
2.1.2	Komplikation Myokardinfarkt.....	8
2.1.3	Atherosklerose und Myokardinfarkt beim Tier.....	9
2.1.4	Die Rolle des Thrombozyten in der Pathogenese der Atherosklerose.....	9
2.1.4.1	Morphologie.....	9
2.1.4.2	Thrombozyten-Endothel Interaktion.....	14
2.1.4.3	Die Rolle der Thrombozyten in der Atherosklerose.....	15
2.2	Der <i>Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer</i> (EMMPRIN / CD147).....	16
2.3	Cyclophilin A.....	19
2.3.1	Cyclophilin A : Eine Peptidyl-Prolyl-cis / trans-Isomerase (PPIase).....	19
2.3.2	Verteilung von Cyclophilin A im Gewebe	20
2.3.3	Struktur von Cyclophilin A.....	20
2.3.4	Extrazelluläres Cyclophilin A als Entzündungsmediator.....	21
2.3.5	Interaktion Cyclophilin A / CD147 (EMMPRIN).....	22
2.3.6	Isoformen von Cyclophilin.....	23
2.4	Glykoprotein VI (GPVI).....	24
2.4.1	Struktur von Glykoprotein VI.....	24
2.4.2	Interaktion von Glykoprotein VI mit Kollagen.....	25
2.4.3	Glykoprotein VI und Atherosklerose.....	26
3	Eigene Untersuchungen	27
3.1	Zielsetzung	27
3.2	Material und Methoden.....	29
3.2.1	Material.....	29
3.2.1.1	Geräte.....	29
3.2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	29
3.2.1.3	Lösungen, Medien, Reagenzien.....	30
3.2.1.4	Puffer, Zellmedien.....	32
3.2.1.5	Rekombinante Proteine.....	33

	3.2.1.6	Antikörper.....	34
	3.2.1.7	Zellen und Zelllinien.....	34
	3.2.1.8	Mäusestamm.....	35
	3.2.1.9	Narkose.....	35
3.3		Methoden.....	36
	3.3.1	<i>In vitro</i> Versuch.....	36
	3.3.1.1	Isolierung humaner Thrombozyten.....	36
	3.3.1.2.	Kultivierung von menschlichen Endothelzellen	37
	3.3.1.3	Flusskammerversuch.....	37
	3.3.1.4	Beschichtung der <i>cover slips</i>	40
	3.3.1.5	Vorinkubation der Thrombozyten.....	40
	3.3.1.6	Auswertung.....	41
	3.3.1.7	Isolierung von Kardiomyozyten und Kultivierung	42
	3.3.1.8	Zymographie.....	43
	3.3.1.9	Immunfluoreszenzfärbung der Kardiomyozyten für die konfokale Mikroskopie.....	44
	3.3.1.10	Konfokale Mikroskopie.....	45
	3.3.2	<i>In vivo</i> Versuch.....	46
	3.3.2.1	Prinzip der Intravitalmikroskopie.....	46
	3.3.2.2	Aufbau des Arbeitsplatzes für die Intravitalmikroskopie.....	46
	3.3.2.3	<i>DCF</i> -Färbung von Thrombozyten.....	47
	3.3.2.4	Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	48
	3.3.2.5	Durchführung und Aufrechterhaltung der Narkose.....	48
	3.3.2.6	Vorbereitung der Mäuse für die Intravitalmikroskopie.....	49
	3.3.2.7	Vorbereitung des Darmes für die Aufnahmen	50
	3.3.2.8	Durchführung des Versuches.....	50
	3.3.2.9	Auswertung.....	51
	3.3.2.10	Statistische Auswertung.....	52
4		Ergebnisse.....	53
4.1		Flusskammerexperimente	53
	4.1.1	Cyclophilin A bzw. Cyclophilin B führt bei aktivierten humanen Endothelzellen (HUVEC) zu gesteigertem <i>Rolling</i> und zur Adhäsion von Thrombozyten.....	53

4.1.2	Inhibition des Cyclophilin A- und Cyclophilin B- vermittelten Adhäsionsprozesses.....	55
4.1.3	Inhibition des Cyclophilin A- und Cyclophilin B- vermittelten Adhäsionsprozesses mit Hilfe von anti-P-Selektin Glykoprotein Ligand 1.....	58
4.1.4	Cyclophilin A bzw. Cyclophilin B induzieren vermehrtes <i>Rolling</i> und Adhäsion auf Kollagen	61
4.1.5	Cyclophilin A und Cyclophilin B induzieren Thrombozytenadhäsion über CD147 (EMMPRIN).....	63
4.1.6	Glykoprotein VI ist in die verstärkte Adhäsivität von Thrombozyten auf Kollagen nach Cyclophilin A bzw. Cyclophilin B Stimulation involviert	66
4.2	Auswirkung von Cyclophilin A auf murine Kardiomyozyten.....	69
4.2.1	Cyclophilin A inhibiert die Schlagfrequenz von murinen Kardiomyozyten.....	69
4.2.2	Cyclophilin A induziert eine vermehrte Aktivität der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2).....	70
4.3	Intravitalmikroskopische Untersuchungen am Modell der Ischämie- und Reperfusion des Dünndarms.....	73
4.3.1	Vergleich von unstimulierten Thrombozyten mit ADP- bzw. Cyclophilin A- stimulierten Thrombozyten in den Venolen des Dünndarmes.....	73
5	Diskussion.....	77
5.1	Diskussion der angewandten Verfahren.....	77
5.1.1	Die Flusskammer als <i>in vitro</i> Modell.....	77
5.1.2	Diskussion der Tierversuche.....	77
5.1.2.1	Die Maus als Tiermodell.....	77
5.1.2.2	Charakterisierung der Zell-Endothel Interaktion mittels Intravitalmikroskopie.....	78
5.1.2.3	Durchführung der Intravitalmikroskopie mit Thrombozyten.....	79
5.1.2.4	Schwierigkeiten bei der Durchführung der Intravitalmikroskopie.....	80
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	81
5.2.1	Cyclophilin A stimuliert Thrombozyten über die Bindung an <i>Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer</i> (EMMPRIN / CD147)	84

5.2.2	Der Rezeptor Glykoprotein VI auf Thrombozyten ist für die CyPA-induzierte Adhäsion an Kollagen verantwortlich.....	86
5.2.3	Cyclophilin A bewirkt eine verminderte Schlagfrequenz und induziert die gesteigerte Aktivität von Matrixmetalloproteinase-2 bei murinen Kardiomyozyten.....	87
5.2.4	Die Rolle von Cyclophilin A auf Thrombozyten ist noch noch nicht vollständig geklärt.....	88
5.3	Schlussfolgerung.....	90
6	Zusammenfassung.....	92
7	Summary.....	94
8	Literaturverzeichnis.....	96
9	Tabellenverzeichnis.....	114
10	Abbildungsverzeichnis.....	115
11	Abkürzungsverzeichnis.....	118
12	Danksagung.....	122

1 Einleitung

Koronare Herzerkrankungen stellen die häufigste Todesursache für die Bevölkerungen in Europa, USA und weiten Teilen Asiens dar (Ross 1999b). Dabei wird angenommen, dass pathophysiologisch die Atherosklerose der koronaren Herzerkrankung zugrunde liegt, die für ca. 50 % der Todesfälle in den Industrienationen verantwortlich gemacht wird (Lusis 2000). Eine schwerwiegende Komplikation ist dabei v.a. der akute Myokardinfarkt, welcher weltweit zur Todesursache Nummer eins gehört (Murray und Lopez 1997, Lloyd-Jones et al. 2009).

Auch in Deutschland stehen laut statistischem Bundesamt Herz-Kreislaufkrankungen als Todesursache an erster Stelle. Im Jahr 2008 starben 148 452 Männer und 208 277 Frauen an einer Erkrankung des Herz-Kreislaufapparates. Dies entsprach 42 % aller Todesfälle. Dabei waren 91 % der Personen älter als 65 Jahre. Atherosklerose gehört zu den zwanzig häufigsten Erkrankungen in Deutschland. Insgesamt wurden 2008 166 232 Patienten aufgrund von Atherosklerose vollstationär behandelt. Im Falle des Myokardinfarktes waren es 210 705 Patienten. Allein am akuten Myokardinfarkt verstarben 2008 insgesamt 56 775 Personen, das entsprach 6,7 % aller Todesfälle und stellt nach der chronisch ischämischen Herzkrankheit die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar (Bundesamt 2008).

Nach der MONICA-Studie liegt die Inzidenz einen Herzinfarkt zu erleiden bei Männern bei 330/100 000 und bei Frauen bei 120/100 000 (Tolonen, Dobson und Kulathinal 2005).

Nach der Framingham Heart Studie liegt das Lebenszeitrisiko für eine koronare Herzkrankheit (KHK) bei Männern im Alter von 40 Jahren bei 48,6 %, bei Frauen bei 31,7 %. Selbst im Alter von 70 Jahren beträgt das Lebenszeitrisiko für eine KHK bei Männern noch 34,9 % und für Frauen 24,2 % (Lloyd-Jones et al. 1999).

Die Krankenhauskosten, die durch Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems entstehen belaufen sich auf 35,2 Millionen Euro pro Jahr und stellen somit den höchsten Kostenanteil dar. Dies entspricht einem Kostenanteil von 430 Euro pro Bundesbürger pro Jahr (Bundesamt 2006).

Diese Zahlen belegen eindeutig, welchen Stellenwert koronare Herzerkrankungen einnehmen. Dabei treten immer wieder neue Pathomechanismen in den Vordergrund, mit deren Hilfe neue Therapieansätze ermöglicht werden.

In den letzten Jahren zeigte sich, dass das Glykoprotein *Extracellular Matrixmetalloproteinase Inducer* (EMMPRIN / CD147) und sein Ligand Cyclophilin A (CyPA) an einer Vielzahl von inflammatorischen Krankheitsprozessen beteiligt sind. Auch im Falle der Atherosklerose und des Myokardinfarkts spielen diese beiden Moleküle eine herausragende Rolle. Dabei sind viele Pathomechanismen noch nicht vollständig geklärt,

Einleitung

insbesondere in welcher Art und Weise sie auf die unterschiedlichsten Zellen, die an der Atherogenese beteiligt sind, einwirken.

2 Schrifttum

2.1 Atherosklerose: Entstehung und Folgen

2.1.1 Pathogenese von Atherosklerose

Unter Atherosklerose versteht man einen chronisch fortschreitenden entzündlichen Prozess der großen Arterien (Ross 1999a, Lusis 2000). Laut WHO (*world health organisation*) Definition ist die Atherosklerose eine variable Kombination von Intimaveränderungen der Arterien, bestehend aus einer herdförmigen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia.

Als Grundvoraussetzung liegt bei der Pathogenese eine endotheliale Dysfunktion vor, welche zu einer gesteigerten Permeabilität führt (Ross 1995). Diese endotheliale Dysfunktion entsteht aufgrund einer Vielzahl von Risikofaktoren. Hierzu gehören u.a. Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus oder auch Nikotinkonsum (Gimbrone, Nagel und Topper 1997, Cai und Harrison 2000, Corti und Fuster 2003).

Dabei spielt v.a. das *Low-Density-Lipoprotein* (LDL) eine übergeordnete Rolle. Durch die veränderten Permeabilitätsverhältnisse häuft sich LDL, gebunden an Proteoglykanen in der Gefäßintima an.

ApolipoproteinB-100 (ApoB) Partikel, ein Bestandteil von LDL bindet v.a. an negative geladenen Glykosaminoglykane (GAG) (Skalen et al. 2002). Diese Bindung ermöglicht oxidative und hydrolytische Modifikationen von LDL (Camejo et al. 1998).

Durch die inflammatorische Aktivierung der Endothelzellen kommt es zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen wie *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) (Cybulsky und Gimbrone 1991, Li et al. 1993, Frenette und Wagner 1996), *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) (Poston et al. 1992, Davies et al. 1993), sowie E- und P-Selektin (Dong et al. 1998). Dadurch können vermehrt Monozyten und T-Zellen am Endothel adhären und mittels Diapedese in die Intima einwandern (Gimbrone 1995, Glass und Witztum 2001, Libby 2006). Eine übergeordnete Rolle spielt dabei das *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1), das für das Migrieren der Monozyten in die Intima verantwortlich gemacht wird (Libby 2006). MCP-1 wird durch aktiviertes Endothel freigesetzt (Rollins et al. 1990). In der Intima angekommen differenzieren die Monozyten mit Hilfe von *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) zu Makrophagen (Smith et al. 1995, Qiao et al. 1997). Durch sogenannte *Scavenger* Rezeptoren wird das oxidierte und chemisch veränderte LDL aufgenommen und Cholesterolester reichern sich im Zytoplasma an. Dies führt zur Umwandlung von Makrophagen zu Schaumzellen (Libby 2006) (*Abbildung 1*). Diese

so entstandenen *fatty streaks* sind meist asymptomatisch. Sie werden auch schon bei Kindern und Jugendlichen gefunden (Hansson 2005).

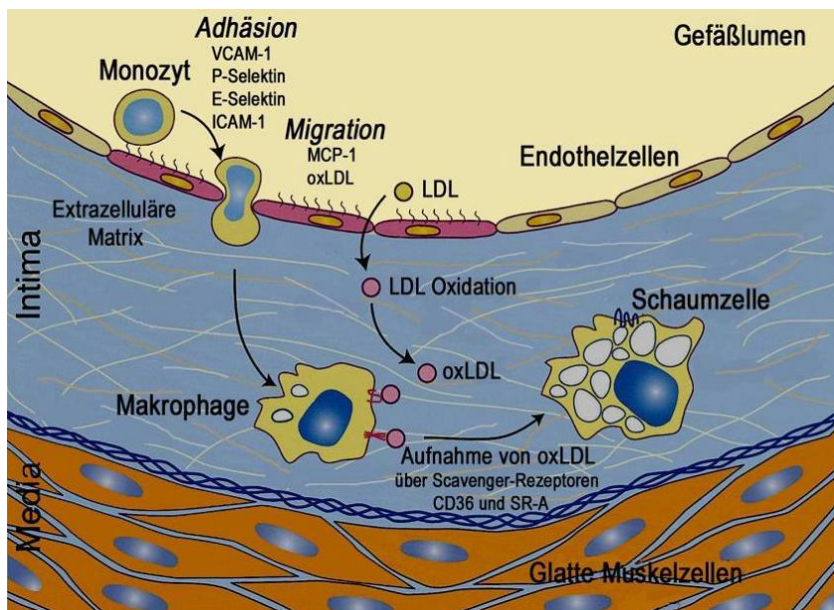


Abbildung 1: Initiierung der atherosklerotischen Läsionsbildung (modifiziert nach Glass und Witztum 2001)

Migration eines Monozyten in den subendothelialen Raum. Aufnahme von oxLDL über Scavenger Rezeptoren und Differenzierung zur Schaumzelle.

Der weitere Verlauf der Atherogenese ist durch eine Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen gekennzeichnet und wird als *fibrofatty lesion* bezeichnet (Ross 1995). Glatte Muskelzellen kommen physiologisch nur in der Media vor. Bei der Atherosklerose migrieren diese in die Intima und proliferieren (*Abbildung 2*). Sie sind auch verantwortlich für die Bildung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie Kollagen, elastischen Fasern und Glykosaminoglykanen (Ross und Glomset 1973).

Durch die Anreicherung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix kommt es zur Bildung einer fibrösen Schutzkappe. Diese Schutzkappe besteht u.a. aus Makrophagen und T-Zellen. Je mehr Zellen diese Kappe enthält und je dicker diese Kappe ist, umso stabiler ist sie (Ross 1995).

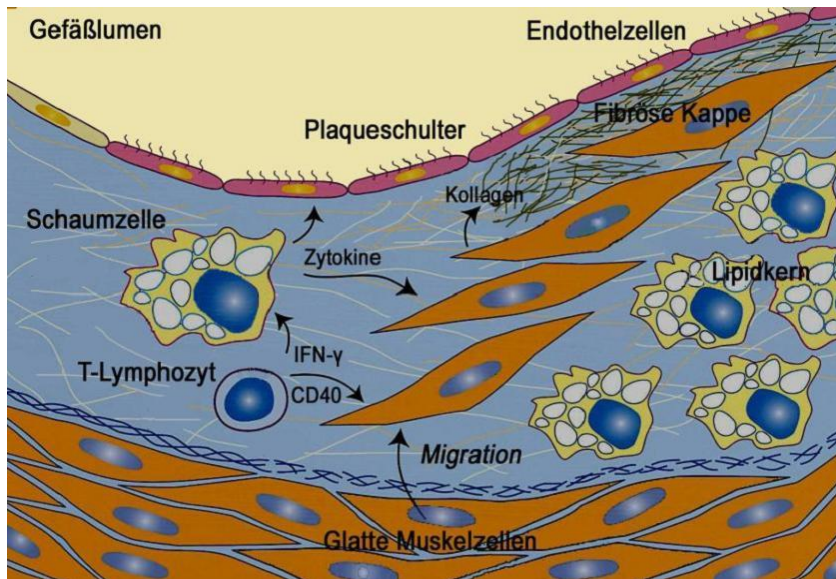


Abbildung 2: Progression der atherosklerotischen Läsion (modifiziert nach Glass und Witztum 2001)

Glatten Muskelzellen migrieren, proliferieren und sezernieren extrazelluläre Matrixproteine, die die fibröse Kappe formen.

Der nekrotische Kern beinhaltet u.a. Zelltrümmer von untergegangenen Schaumzellen (Ball et al. 1995, Bjorkerud und Bjorkerud 1996), sowie extrazellulären Lipiden (Lusis 2000) und diversen prothrombotisch wirkenden Faktoren wie z. B. der von Makrophagen produzierte sogenannte *tissue factor* (Badimon et al. 1999).

Die meisten atherosklerotischen Plaques bleiben lange Zeit asymptomatisch. Zum klinischen Erscheinungsbild kommt es durch verschiedene Pathomechanismen wie in *Abbildung 3* schematisch dargestellt.

Bei einem Viertel der Patienten kommt es zu einer oberflächlichen Plaqueeosion, die mit einer Abschilferung von Endothelzellen einhergeht. Sie führt in der Regel zu einer Koronarthrombose. Dabei werden subendotheliales Kollagen und der von-Willebrandt-Faktor (vWF) freigelegt und es kommt zu Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten (Libby 2002).

Einen weiteren Pathomechanismus stellt die Ruptur kleiner Mikrogefäße dar, die in die atherosklerotischen Plaques einsprossen. Es entstehen Hämorrhagien, die zur Thrombusbildung führen, was eine Möglichkeit der Plaqueprogression darstellt (De Boer et al. 1999, Libby 2002).

Bei zwei Dritteln der Patienten jedoch kommt es zur sogenannten Plaqueruptur (Davies 1996). Sie stellt die häufigste Ursache eines Myokardinfarktes dar (Falk, Shah und Fuster 1995).

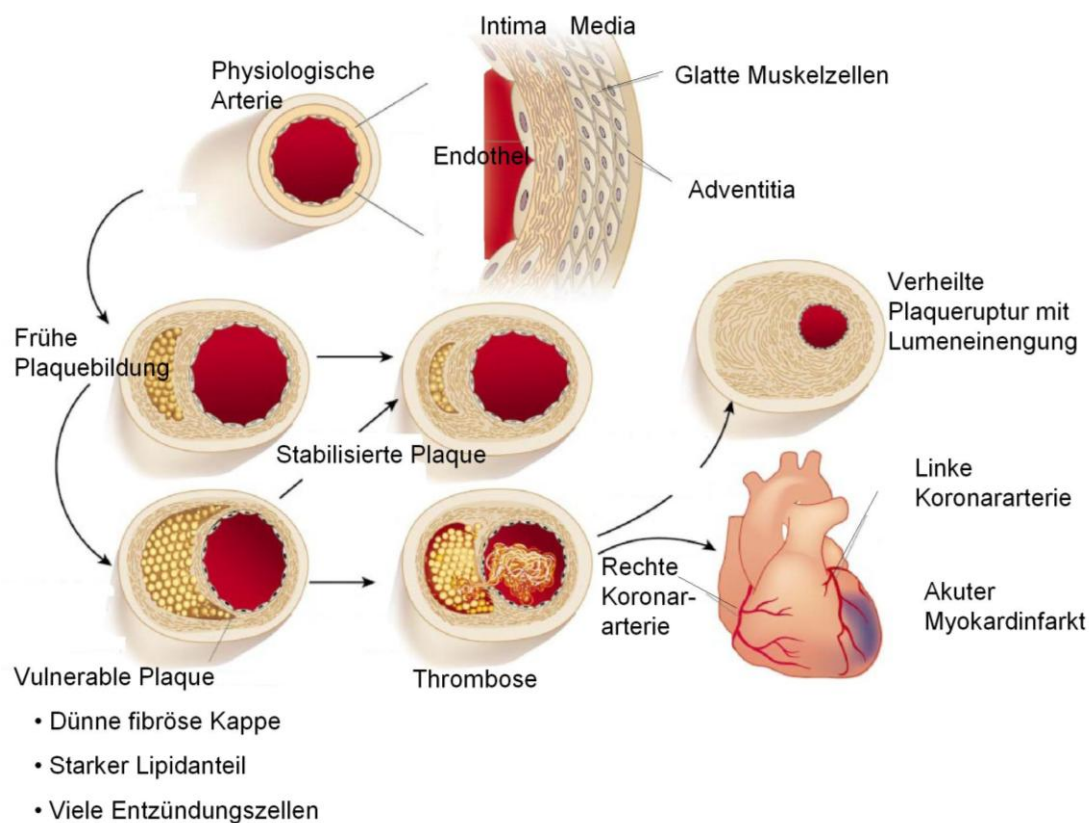


Abbildung 3: Verlaufsformen von Atherosklerose (modifiziert nach Libby 2002)

Wie vulnerabel die fibröse Kappe ist, hängt von deren Zusammensetzung ab. Eine Ausdünnung der Kappe (Falk 1992), ein hoher Lipidanteil (Felton et al. 1997), eine hohe Anzahl an inflammatorisch aktiven Makrophagen (Lendon et al. 1991) und T-Lymphozyten (Lusis 2000) begünstigen die Ruptur.

Im Falle des Myokardinfarktes ist die Prädilektionsstelle für die Ruptur die sogenannte Schulterregion, an der die Plaque mit der Gefäßwand verbunden ist (Loree et al. 1992). Hier reißen fast 60 % aller Plaques auf (Cheng et al. 1993).

Verminderte Kollagensynthese und Abbau der extrazellulären Matrix tragen zu einer Ausdünnung der Kappe bei (Lendon et al. 1991, Loree et al. 1992).

Eine verminderte Kollagensynthese entsteht aufgrund einer Hemmung der glatten Muskelzellen. Diese werden durch Interferon- γ (IFN- γ), das durch T-Lymphozyten sezerniert wird, gehemmt. Das von den T-Lymphozyten produzierte CD40L stimuliert im Gegenzug mononukleäre Phagozyten, die Metalloproteinasen wie Matrixmetalloproteinasen (MMP) -1, MMP-8 und MMP-13 produzieren, welche dafür sorgen dass intakte Kollagenfibrillen aufgespalten werden. Der weitere Abbau geschieht dann mit Hilfe von MMP-9, einer sogenannten Gelatinase (Libby 2008) (Abbildung 4).

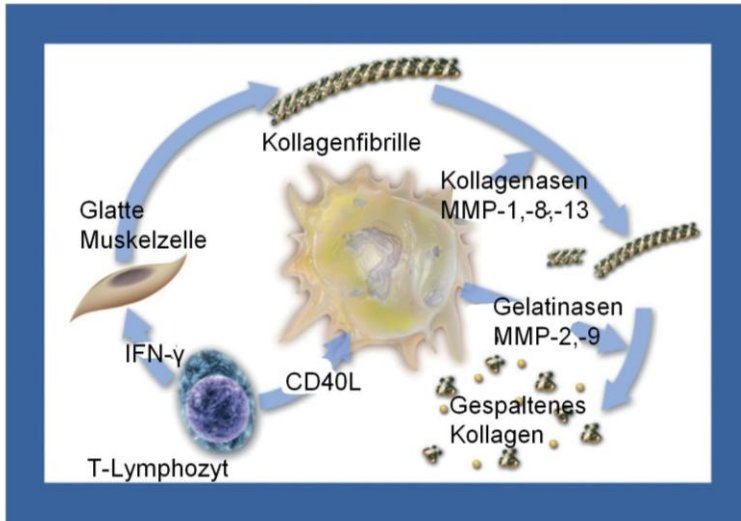


Abbildung 4: Verminderung der Kollagensynthese und Abbau von Kollagen (modifiziert nach Libby 2009)

Verminderung der Kollagensynthese führt zu einer Ausdünnung der atherosklerotischen Kappe und so zu einer Erleichterung der Ruptur atherosklerotischer Plaques.

T-Lymphozyten setzen proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ und CD40L frei, was zu einer verminderten Kollagensynthese der glatten Muskelzellen führt.

CD40L stimuliert mononukleäre Phagozyten zur Produktion von Kollagenasen wie MMP-1, MMP-8 und MMP-13, die das Kollagen aufspalten. Gelatinasen wie MMP-2 und -9 sorgen für den weiteren Abbau von Kollagen.

Rupturiert die Plaque, kommt Blut in Kontakt mit dem lipidreichen Kern. Dabei adhären Thrombozyten an den vWF über Glykoprotein Ib/IX/V (GPIb/IX/V) (Ruggeri 2002) und an Kollagen über Glykoprotein VI (GPVI) (Nieswandt et al. 2001, Massberg et al. 2003, Nieswandt und Watson 2003). Die Gerinnungskaskade wird initiiert und die Folge ist die Bildung eines Thrombus, was ggf. ein Gefäßverschluss zur Folge hat (*Abbildung 5*).

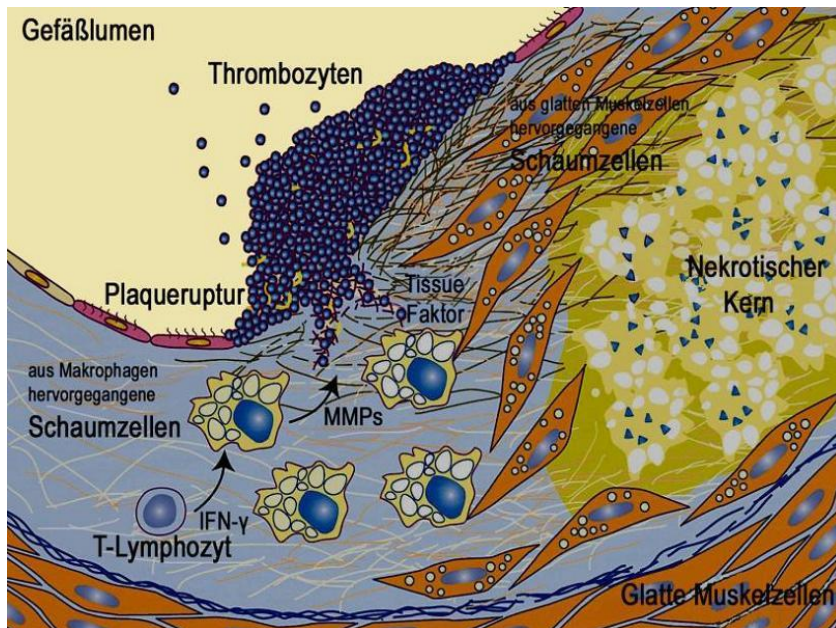


Abbildung 5: Ruptur der Gefäßwand-Plaques (modifiziert nach Glass und Witztum 2001)

Der nekrotische Kern wird durch nekrotische Schaumzellen gebildet. Es kommt zur Schwächung der fibrösen Kappe durch MMPs. Plaqueruptur führt zum Kontakt mit Blut und einer Thrombusbildung.

2.1.2 Komplikation Myokardinfarkt

Die Ruptur einer Plaques kann zu einem akuten Myokardinfarkt führen (Virmani et al. 2000). Dabei hängt die Ruptur nicht unbedingt von der Größe der Plaques ab, sondern vielmehr von der Zusammensetzung. Je mehr Makrophagen und extrazelluläre Lipide eine Plaques enthält, desto höher ist ihre Vulnerabilität (Falk 1992). Die Freisetzung diverser lytischer Enzyme durch Makrophagen bewirkt eine Schwächung der fibrösen Kappe und begünstigt so eine Ruptur der Plaques (Welgus et al. 1990).

Beim Vorliegen einer Myokardnekrose mit einhergehender Myokardischämie, die zu klinischen Symptomatik führt, spricht man von einem Myokardinfarkt (Thygesen et al. 2007). Auch beim Myokardinfarkt findet eine Hochregulation von EMMPRIN / CD147 und *membrane-type MMP* (MT1-MMP) an Monozyten statt (Schmidt et al. 2006). Während der mit der Ischämie einhergehenden Hypoxie wird CyPA von Kardiomyozyten freigesetzt, um sie vor Apoptose zu schützen (Seko et al. 2004).

2.1.3. Atherosklerose und Myokardinfarkt beim Tier

Bei Tieren spielt Atherosklerose eine untergeordnete Rolle. Dafür verantwortlich sind u. U. die kurzen Lebenszeiten, wie es beim Nutztier der Fall ist. Bei herbivoren Tieren spielen Lipideinlagerungen und atheromatöse Arterienwandnekrosen keine Rolle.

Bei Hunden und Katzen im hohen Alter findet man eine Intimasklerose, die jedoch keinen erheblichen Krankheitswert besitzt. Allenfalls beim Vorliegen einer Hypertonie beim Hund kommt es zur Atherosklerose mit Symptomen (Dahme und Weiss 1988).

Pathologische Untersuchungen ergaben bei lediglich 21 von 12384 Hunden die Diagnose Atherosklerose. Dabei lagen ein Myokardinfarkt und eine Fibrosierung des Myokards vor. Histologisch wurde in den Gefäßwänden Schaumzellen, Detritus, mineralisiertes Material und degenerierte Muskelzellen gefunden (Liu et al. 1986).

Bei Hunden mit Hypothyreose konnten schwere Fälle von Atherosklerose festgestellt werden (Suter 2006).

Atherosklerotische Veränderungen spielen hingegen beim Schwein und bei den Vögeln, v.a. bei den Psittaciden, eine Rolle. Beim Schwein sind atherosklerotische Veränderungen schon im Alter von zehn Jahren nachweisbar. Bei Psittaciden kann Atherosklerose durchaus zum Tode führen (Dahme und Weiss 1988).

Ebenso wie Atherosklerose spielt der Myokardinfarkt beim Tier eine untergeordnete Rolle. Zum Myokardinfarkt kommt es allenfalls aufgrund von Embolien und hypertoniebedingter Atherosklerose (Kitt 1982).

2.1.4 Die Rolle des Thrombozyten in der Pathogenese der Atherosklerose

2.1.4.1 Morphologie

Blutplättchen entwickeln sich aus Megakaryozyten im Knochenmark. Ihre physiologische Zellzahl beträgt beim Mensch zwischen 150 000 – 300 000 / μ l Blut. Sie besitzen keinen Zellkern und ihre durchschnittliche Lebensdauer beträgt sieben Tage. Sie werden im retikuloendothelialen System der Leber und der Milz abgebaut.

Blutplättchen können in zwei Formen vorliegen (*Abbildung 6*):

- a. in der inaktiven diskoiden Form,
- b. in der aktiven Form.

Durch Substanzen wie Adenosindiphosphat (ADP), Thrombin und Bestandteile der extrazellulären Matrix wie z.B. Kollagen werden Thrombozyten aktiviert. Es kommt zur

Abrundung der Thrombozyten und zur Ausbildung von Pseudopodien (Echinospherozyten) (Morgenstern 1995, Gawaz 2001).

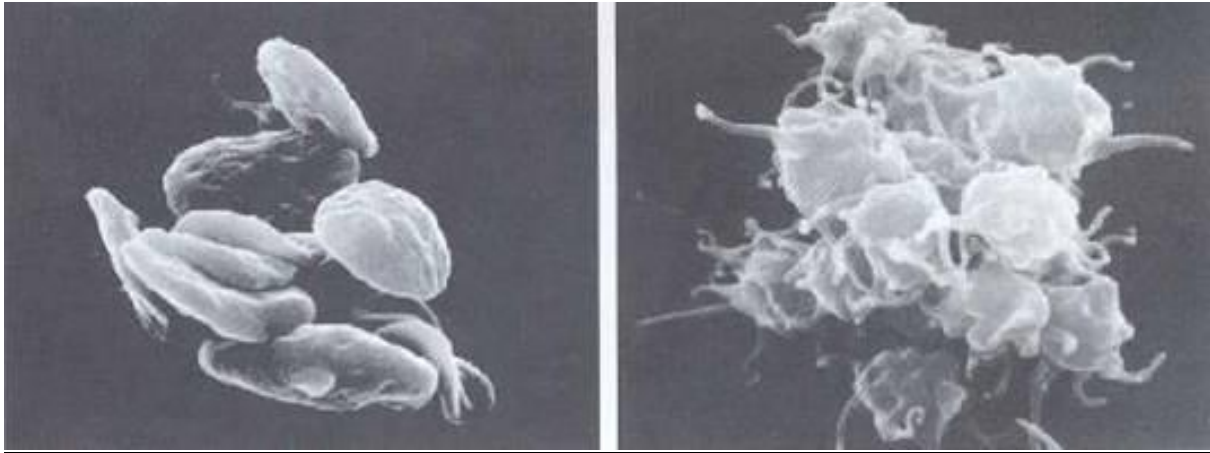


Abbildung 6: Ruhende (diskoide Form) (links) und aktivierte (rechts) Thrombozyten (Echinospherozyten) (Gawaz 2001)

Anhand der Struktur lassen sich vier Bereiche unterteilen:

- periphere Zone,
- strukturelle Zone,
- Zone der Organellen,
- Membransystem.

Die periphere Zone besteht aus der Plasmamembran. An ihrer extrazellulären Seite befinden sich zahlreiche Glykoproteine, Proteine und Mucopolysaccharide (Glykokalix). Die Glykokalix stellt mit ihren Rezeptoren eine Verbindung zu anderen Zellen wie Leukozyten her und ermöglicht eine Interaktion mit Kollagen und vWF (Morgenstern 1995, Gawaz 2001).

Die strukturelle Zone setzt sich aus dem Zellplasma und dem Zytoskelett zusammen. Dabei weist das Zellplasma eine feingranuläre Struktur auf. Am Rand verläuft ein spiralförmiger aufgerollter Mikrotubulus, der u.a. mit Aktinfilamenten die Form des Diskozyten aufrechterhält (Morgenstern 1995).

Die Zone der Organellen befindet sich im Zytoplasma. Sie besteht aus Glykogenspeichern, Speichergranula und Mitochondrien. Eine besondere Bedeutung kommt dabei den Speichergranula zu.

Thrombozyten enthalten drei unterschiedliche Granula:

- a. dichte Granula,
- b. α - Granula,
- c. Lysosomen.

Der Volumenanteil der dichten Granula wird auf 0,3-1,2 % geschätzt (Morgenstern 1995). Im Vergleich zu den anderen Granula zeichnen sie sich durch einen elektronendichteren Inhalt aus. Ihr Inhalt besteht aus einer Vielzahl an Adenin- (ATP, ADP) und Guaninnukleotiden (GTP, GDP), sowie aus zweiwertigen Kationen, Serotonin und Histamin (Gawaz 2004).

Die α -Granula machen einen Anteil von bis zu 15 % am Thrombozytenvolumen aus (Morgenstern 1995). Sie liegen meist zentral, zeigen eine dichte Matrix und ihre Plasmamembran kann glatt sein oder Ausstülpungen aufweisen.

Aufgrund ihrer zahlreichen Proteine, die freigesetzt werden können, stellen sie ein typisches sekretorisches Vesikel dar, das Proteine zur Zelloberfläche transportiert. Dort werden diese Proteine entweder freigesetzt oder in die Membran eingebaut. Zu den freigesetzten Proteinen zählen zahlreiche Wachstumsfaktoren, Chemokine, Adhäsionsmoleküle, pro- und antikoagulatorische Faktoren (Gawaz 2004, Pötzsch und Madlener 2010).

Die Lysosomen enthalten Enzyme wie Proteasen und Glykohydrolasen (Gawaz 2004).

Eine Übersicht über die Granula, sowie deren Inhaltsstoffe geben *Tabelle 1* und *Tabelle 2*.

Schrifttum

Tabelle 1: Übersicht über Speichergranula mit Inhaltsstoffen (Gawaz 2004)

Speichergranula	Dichte Granula	α -Granula	Lysosomen
Inhaltsstoffe	<ul style="list-style-type: none"> • Adeninnukleotide: ATP, ADP • Guaninnukleotide: GTP, GDP • Histamin • Serotonin (5-HT) 	<p><i>platelet factor-4</i> (PF-4)</p> <p><i>platelet derived growth factor</i> (PDGF)</p> <p><i>transforming growth factor</i> (TGF)</p> <p><i>endothelial cell growth factor</i> (ECGF)</p> <p><i>epidermal growth factor</i> (EGF)</p> <p><i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF)</p> <p><i>insulin-like growth factor-1</i> (IGF-I)</p> <p><i>basic fibroblast growth factor</i> (BFGF)</p>	<p>Proteasen</p> <p>Glykohydrolasen</p>

Schrifttum

Tabelle 2: Aufstellung über die jeweiligen Speichergranula mit ihren Inhaltsstoffen (modifiziert nach Pötzsch und Madlener 2010)

Dichte Granula

Nukleotide	ADP, ATP, GDP, GTP α
Transmitter	Serotonin, Histamin
Kationen	Ca ²⁺ , Mg ²⁺

α -Granula

Adhäsionsmoleküle	Fibrinogen, vWF, Thrombospondin-1, Fibronectin, Vitronectin
Prokoagulatorische Faktoren	Gerinnungsfaktor V, VII, XI, XIII, MMPs
Antikoagulatorische Faktoren	Plasminogen, Plasminogenaktivatorinhibitor, <i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i> , Protein C, Antiplasmin, α 2-Makroglobulin, α 2-Anti-Trypsin, Proteasenexin-2, MMPs
Chemokine, Entzündungsmediatoren	Plättchenfaktor 4, β -Thromboglobulin, MIP-1 α , , Interleukin-1 β , plättchenaktivierender Faktor, RANTES, <i>stromal derived factor-1alpha</i> (SDF-1 α), Komplementfaktoren
Wachstumsfaktoren	TGF- β , EGF, VEGF, PDGF
Antimikrobielle Peptide, Immunmodulatoren	<i>Platelet basic protein</i> , Thrombocidin, Fibrinopeptid A und B, Thymosin- β -4, β -Lysin, Immunglobulin A,G,M, Komplementfaktoren
Sonstige Proteine	Proteine Albumin, histidinreiches Protein, Prionprotein, Amyloid- β -Peptid
Membranproteine	P-Selektin (CD62P), α IIb β 3-Integrin, α V β 3-Integrin, CD36, CD9

Lysosomen

Proteasen	Kathepsin D und E, Elastase, Kollagenase, Carboxypeptidasen, Heparinase
-----------	---

Die letzte Einheit stellt das Membransystem dar, das aus dem offenen kanalikulären System und dem dichten tubulären System besteht. Dabei besteht das tubuläre System aus sich verzweigenden Kanälen, die bis an die Plasmamembran reichen. Das System stellt einen Hauptspeicherort für freie Kalziumionen dar und ist v.a. bei der Formveränderung von ruhenden Thrombozyten zum aktivierten beteiligt (Morgenstern 1995, Gawaz 2001).

2.1.4.2 Thrombozyten-Endothel Interaktionen

Thrombozyten interagieren gewöhnlich nicht mit einem intakten Endothel (May, Seizer und Gawaz 2008). Erst wenn es zu einer Aktivierung des Endothels kommt (Gawaz et al. 1997, Bombeli, Schwartz und Harlan 1998), oder wenn Teile der extrazellulären Matrix, v.a. Kollagen und der vWF, mit dem Blutstrom in Kontakt kommen, werden Thrombozyten aktiviert.

Dabei kommt es zu einem durch Selektine vermittelten *Rolling*. In Abhängigkeit vom jeweiligen inflammatorischen Stimulus wird P-Selektin (CD62P) aus den Weibel-Palade-Körperchen freigesetzt (Frenette et al. 1995, Frenette et al. 1998). Inflammatorisches Endothel exprimiert vermehrt E-Selektin, welches zu einem losen Kontakt zwischen Thrombozyten und Endothel führt (Frenette et al. 1998). Es kommt zu einer herabgesetzten Fließgeschwindigkeit der Thrombozyten und zu einer weiteren Aktivierung. Über Integrine binden die Thrombozyten an das Endothel v.a. β_3 -Integrine ($\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_v\beta_3$) und vermitteln eine feste Thrombozytenadhäsion (Gawaz et al. 1997, Bombeli et al. 1998). Einen Rezeptor für P-Selektin stellt dabei GPIIb/IX/V-Rezeptor (vWF-Rezeptor-Komplex) dar (Romo et al. 1999).

Die Thrombozyten-Endothel Interaktionen sind in *Abbildung 7* schematisch dargestellt.

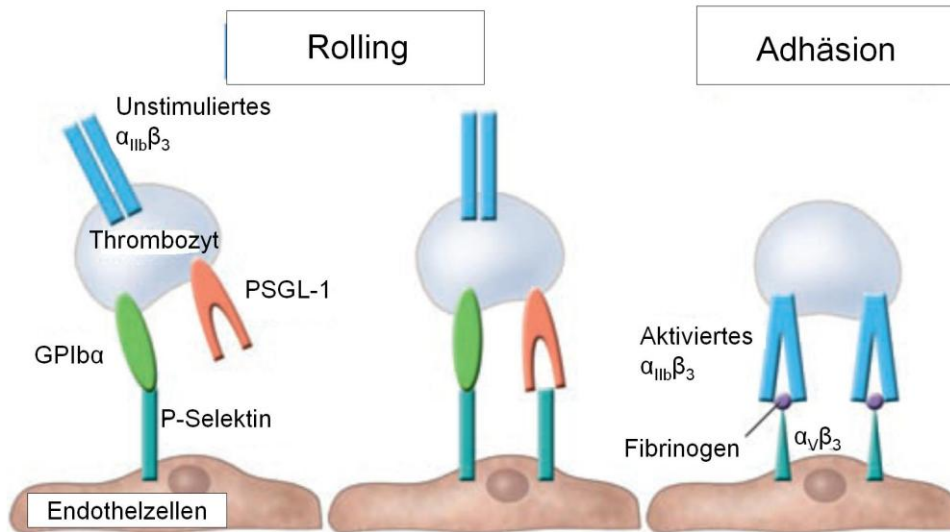


Abbildung 7: Thrombozyten-Endothel Interaktion (modifiziert nach Gawaz, Langer und May 2005)

Aktiviertes Endothel exprimiert P-Selektin. Dabei interagieren die Oberflächenrezeptoren GPIIb α und PSGL-1 mit endothelialen P-Selektin und es kommt zum *Rolling*. Adhäsion wird über β_3 Integrine vermittelt.

Adhärente Thrombozyten verbinden sich dann über Fibrinogenbrücken.

Durch das Binden der Thrombozyten ans Endothel wird das Endothel weiter aktiviert und exprimiert vermehrt Oberflächenmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin und P-Selektin. Chemokine wie MCP-1 und Interleukin (IL)-8 werden freigesetzt und treiben das Entzündungsgeschehen voran (Gawaz, Langer und May 2005).

2.1.4.3 Die Rolle der Thrombozyten in der Atherosklerose

In der Pathogenese der Atherosklerose spielen Thrombozyten v.a. eine Rolle als Entzündungszellen, die das Geschehen vorantreiben.

Thrombozyten können zum Einen mit einer Vielzahl von anderen Zellen interagieren, zum Anderen sind sie in der Lage eine Vielzahl von Stoffen aus ihren Granula freizusetzen, wie z.B. Adhäsionsproteine (Fibrinogen, Fibronectin, vWF), Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- β), Chemokine (RANTES, PF-4, SDF-1) und gerinnungsfördernde Stoffe (Faktor V, XI, Plasminogen) (Weber 2005).

Eine besondere Rolle spielt v.a. die Interaktion von Thrombozyten mit Monozyten. Thrombozyten bilden mit Monozyten Koaggregate, wobei sowohl die Thrombozyten, als auch die Monozyten mit dem Endothel in Kontakt treten können.

Sobald die Thrombozyten am Endothel adhärirt sind, locken sie Monozyten an und sorgen dafür, dass diese am Endothel haften bleiben (May et al. 2008).

Kommt es zur Plaqueruptur oder -erosion werden Teile der extrazellulären Matrix freigelegt, v.a. Kollagen. Die Aktivierung der Thrombozyten führt über GPVI zu einer Bindung an Kollagen. Es entsteht ein Thrombus, der zu einer Einengung des Gefäßlumens bis hin zum Verschluss des Gefäßes führen kann mit einhergehender Ischämie des betroffenen Organs. Je nach Lokalisation des Thrombus kommt es zum Myokardinfarkt oder Schlaganfall (Nieswandt und Watson 2003).

2.2 Der *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer* (EMMPRIN / CD147)

EMMPRIN, auch als Basigin (Miyachi et al. 1990), Neurothelin (Schlosshauer, Bauch and Frank 1995) oder CD147 (Koch et al. 1999) bezeichnet, wurde erstmals 1982 entdeckt (Biswas 1982). Zunächst wurde das Protein auf der Oberfläche von Tumorzellen identifiziert, was zu dem Namen *tumor cell-derived collagenase stimulatory factor* (TCSF) führte (Biswas 1984). Erst nach seiner vollständigen Identifizierung wurde das Protein in EMMPRIN (*Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer*) umbenannt (Biswas et al. 1995).

CD147 (EMMPRIN) stellt ein Zelloberflächenprotein dar, welches zur Familie der Immunglobuline gehört (Sun und Hemler 2001).

Es besitzt ein Gewicht von ca. 58 Kilodalton (kDa) und besteht aus zwei extrazellulären, einer transmembranen und einer zyttoplasmatischen Domäne (Biswas et al. 1995).

Es spielt bei einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Geschehen eine Rolle. So ist es an der physiologischen Entwicklung des Nervensystems, als auch an Lernprozessen und dem Gedächtnis beteiligt (Naruhashi et al. 1997, Muramatsu und Miyachi 2003). Bei der fetalen Entwicklung, der Spermatogenese (Igakura et al. 1998), der Entwicklung der Retina (Muramatsu und Miyachi 2003) und bei der Entwicklung der T-Zellen im Thymus (Renno et al. 2002) spielt dieses Glykoprotein eine unerlässliche Rolle.

Wie der Name EMMPRIN schon andeutet, ist das Protein an der Aktivierung zahlreicher MMPs beteiligt. V.a. die Stimulierung und Aktivierung von MT-MMP1 und -2, sowie von MMP-1, -2, -3 und -9 stehen maßgeblich im Vordergrund (Yan, Zucker und Toole 2005).

Über die Aktivierung der MMPs und der Initiierung von Wachstumsfaktoren wie z.B. der VEGF (Tang et al. 2005), spielt EMMPRIN eine große Rolle bei der Tumor Metastasierung (Sun und Hemler 2001, Nabeshima et al. 2004).

Die MMP Aktivierung korreliert dabei mit dem Grad der Glykosylierung von CD147 (EMMPRIN). Im deglykosyliertem Zustand kommt es zu keiner Aktivierung der MMPs, stattdessen wird natürlich glykosyliertes CD147 (EMMPRIN) in seiner Wirkung sogar antagonisiert (Sun und Hemler 2001).

CD147 (EMMPRIN) kann mit einer Vielzahl von Proteinen Verbindungen eingehen. So können über hydrophobe Wechselwirkungen am N-terminalen Ende mit anderen CD147 (EMMPRIN) Molekülen sogenannte Oligomere gebildet werden (Yoshida et al. 2000). Dabei kann CD147 (EMMPRIN) sowohl als Ligand, als auch als Rezeptor dienen (Sun und Hemler 2001). Über dieselbe Domäne sind auch Interaktionen mit den Integrinen $\alpha_3\beta_1$ und $\alpha_6\beta_1$ möglich (Berditchevski et al. 1997).

Über die zweite extrazelluläre Domäne interagiert CD147 (EMMPRIN) mit Caveolin-1. Dabei bindet Caveolin-1 bereits schon im Golgi-Apparat an das wenig glykosylierte CD147 (EMMPRIN) um so eine Selbstaggregation von CD147 (EMMPRIN) und eine MMP Aktivierung zu verhindern (Tang, Chang und Hemler 2004). Folglich stellt die Bindung an Caveolin-1 einen Regulationsmechanismus dar, der das Zusammenlagern von CD147 (EMMPRIN) verhindert (Tang und Hemler 2004). Der zytoplasmatische Anteil spielt für die Chaperone Funktion von Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1) eine große Rolle.

Die Struktur von CD147 (EMMPRIN) ist in *Abbildung 8* dargestellt.

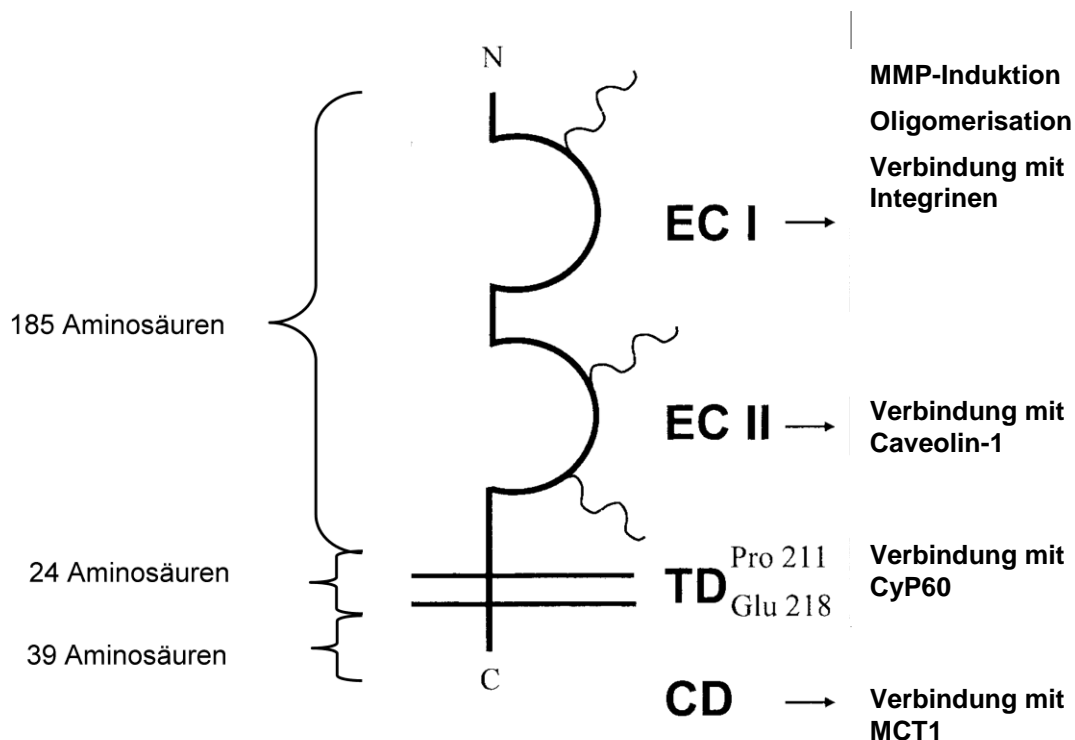


Abbildung 8: Struktur von CD147 (EMMPRIN) (modifiziert nach Nabeshima et al. 2006)
 EC I, EC II – erste und zweite extrazelluläre Immunglobulin (Ig) Domäne; TD – transmembranäre Domäne; CD – zytoplasmatische Domäne

Bei verschiedenen Krankheitsbildern wie Morbus Alzheimer (Zhou et al. 2005), rheumatoider Arthritis (Konttinen et al. 2000, Tomita et al. 2002), neoplastischem Geschehen wie Plattenepithelkarzinomen, Pankreas-, Nieren-, Leber und Brustadenokarzinomen (Riethdorf et al. 2006), Myokardinfarkt (Schmidt et al. 2006), Herzinsuffizienz (Li, McTiernan und Feldman 2000, Spinale et al. 2000) und Atherosklerose (Liang, Major und Bocan 2002) scheint CD147 (EMMPRIN) maßgeblich beteiligt zu sein.

In makrophagenreichen Plaques wird CD147 (EMMPRIN) vermehrt exprimiert. Dabei unterstützt CD147 (EMMPRIN) über die MMP-Freisetzung in Monozyten und glatten Muskelzellen die Zellmigration dieser Zellen und ist maßgeblich mit Hilfe von *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) an der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen im subendothelialen Raum beteiligt (Major et al. 2002). Unter oxidativem Stress und den dadurch veränderten Lipoproteinen (oxLDL) wird CD147 (EMMPRIN) vermehrt exprimiert und führt zu einer gesteigerten Aktivierung von MMP-1 und -2 in koronaren glatten Muskelzellen (Haug et al. 2004).

Während der Entstehung von Schaumzellen kommt es zu einer Hochregulierung von CD147 (EMMPRIN). Dies führt zu einer Freisetzung von M-CSF sowie einer Aktivierung von MMP-9 und MT1-MMP, was eine Progression der Atherosklerose unterstützt (Seizer et al. 2009b). Über zelluläre Interaktionen stimuliert CD147 (EMMPRIN) MMP-9 und -2 in glatten Muskelzellen (Schmidt et al. 2006).

Bei Stimulation von Thrombozyten mit verschiedenen Agenden wie ADP, Thrombin und Kollagen wurde eine gesteigerte CD147 (EMMPRIN) Expression auf der Zelloberfläche festgestellt. Dabei wird der Großteil von CD147 (EMMPRIN) aus dem offenen kanalikulären System bereitgestellt, ein kleiner Teil stammt aus den α -Granula. Bei Stimulierung der Thrombozyten wird nicht nur dieses vermehrt an der Oberfläche exprimiert, CD147 (EMMPRIN) selbst dient als stimulierendes Agens und führt zu einer vermehrten Expression von P-Selektin und CD40L. Werden Thrombozyten mit Monozyten zusammen inkubiert führt dies über die Aktivierung von CD147 (EMMPRIN) zu einer MMP-9 Freisetzung durch Monozyten (Schmidt et al. 2008).

Auch ist CD147 (EMMPRIN) in der Lage die Sekretion zahlreicher Zytokine wie IL-6, Tumornekrose-Faktor α (TNF α) oder IL-10 zu induzieren (Schmidt et al. 2008). CD147 (EMMPRIN) bewirkt durch Bindung an CD147 (EMMPRIN) selbst, eine Stimulation von Thrombozyten. Durch Bindung von CD147 (EMMPRIN) an GPVI auf Thrombozyten ruft es ein Rollen der Plättchen hervor (Seizer et al. 2009a).

CD147 (EMMPRIN) spielt im Falle des Myokardinfarktes eine bedeutende Rolle. Über CD147 (EMMPRIN) kommt es zur MMP-vermittelten Plaqueruptur, dies konnte durch eine Aufregulierung von CD147 (EMMPRIN) bei gleichzeitiger Erhöhung der MT1-MMP auf Monozyten gezeigt werden. Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt konnte außerdem eine

erhöhte MMP-9 Aktivität im Plasma festgestellt werden, was sich nach erfolgreicher Therapie wieder normalisierte (Schmidt et al. 2006).

2.3 Cyclophilin A

Cyclophilin A (CyPA) wurde erstmals 1984 aus bovinen Thymozyten isoliert. Es gehört zu der Gruppe der Immunophiline (Fischer, Bang und Mech 1984, Handschumacher et al. 1984). Das Protein gilt als einer der potentesten Liganden für das immunsuppressiv wirkende Cyclosporin (Liu et al. 1991, Fruman, Burakoff und Bierer 1994, Colgan et al. 2005). Zunächst wurde vermutet, dass es sich um ein intrazellulär vorkommendes Protein handelt. Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, dass CyPA auch von Zellen sezerniert werden kann und aus nekrotischen und absterbenden Zellen freigesetzt wird (Sherry et al. 1992, Xu et al. 1992, Jin et al. 2000).

Eine der wichtigsten Funktionen von CyPA im menschlichen Organismus stellt die Aufgabe als Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase (PPIase) dar (Fischer et al. 1989). CyPA besitzt einen konservierten Kern, der von divergierenden N und C Ausläufern flankiert wird. Diese Ausläufer dienen zur Signalgebung und als Membranfixierung (Stamnes, Rutherford und Zuker 1992).

CyPA wird aufgrund seiner Masse mit 17,7 kDa ($\pm 0,5$ kDa) als CyP-18 bezeichnet. Der isoelektrische Punkt variiert je nach Spezies. Bei Säugern liegt er im basischen Bereich, bei Prokaryoten im Sauren (Galat 1993).

Bemerkenswert ist dabei die Konservierung von bestimmten Aminosäuremotiven. Das humane CyPA hat einen ungewöhnlich hohen Gehalt von Phenylalanin (6-8%) (Galat 1993). Immunfluoreszenzische Untersuchungen zeigten, dass CyPA v.a. im Zytoplasma diverser eukaryotischer Zellen vorkommt, die teilweise mit zytoplasmatischen Vesikeln und dem Golgi Apparat assoziiert sind (McDonald et al. 1992). Hingegen konnte kein CyPA im Nukleus nachgewiesen werden (Azhderian et al. 1993).

2.3.1 Cyclophilin A: Eine Peptidyl-Prolyl-cis / trans-Isomerase (PPIase)

Wie in *Abbildung 9* dargestellt, können Peptide in zwei Isoformen vorliegen. PPIasen sind Enzyme, die die Konversion der cis- und trans-Isomere von Prolinbrücken in Peptiden katalysieren. Dabei wird der niedrigere Energiestatus trans bevorzugt, bei dem sich die Seitenketten 180° gegenüber liegen. Viele Proteine, die Prolin enthalten, liegen in cis-Form vor. Die Seitenketten sind dabei benachbart. Spontane Isomerisation von Peptidyl-Prolyl Brücken benötigt freie Energie und ist ein langsamer Prozess (Gothel und Marahiel 1999).

Allen PPlasen gemeinsam ist, dass sie das immunsupprimierende Mittel Cyclosporin A binden können, wobei CyPA selektiv Cyclosporin A bindet (Galat 1993).

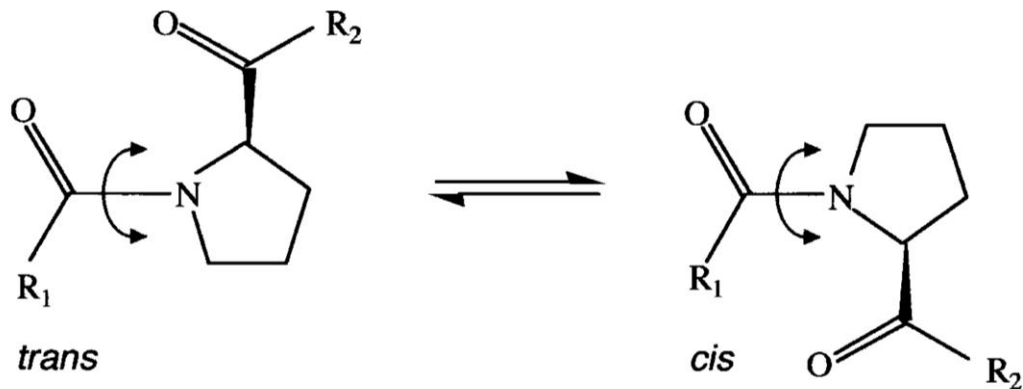


Abbildung 9: Die Peptidyl-Prolyl-cis / trans-Isomerase: Umwandlung von cis zu trans Peptidyl-Prolyl Brücken (Galat 1993)

2.3.2 Verteilung von Cyclophilin A im Gewebe

Gewebekonzentrationen von humanen CyPA reichen von 1-2 µg/mg Totalprotein in allen Organen. Mittels Immunhistochemie wurde CyPA v.a. in den meisten parenchymalen Geweben gefunden.

Im proximalen Tubulusepithel der Niere, im respiratorischen und gastrointestinalen Epithel wird vermehrt CyPA gefunden.

Ebenso wird im Gehirn eine leicht erhöhte Konzentration von CyPA gefunden. V.a. im Bereich des Kortex und des Zerebellums zeigt sich eine Anfärbung der Glia und Purkinje Zellen, wohingegen die weiße Substanz so gut wie keine Anfärbung zeigt.

Im Blut beträgt die Konzentration 3-9 µg/ml. Der größte Teil von CyPA ist mit dem zellulären Kompartiment wie Erythrozyten und Leukozyten verknüpft. Nur ein geringer Teil wird im Plasma festgestellt (Ryffel et al. 1991).

2.3.3 Struktur von Cyclophilin A

Wie in *Abbildung 10* dargestellt besteht humanes CyPA aus achtsträngigen antiparallelen β-Faltblättern, die sich zu einem Zylinder formieren. Zwei α-Helices befinden sich jeweils am unteren und oberen Ende des Zylinders. Im Inneren befindet sich der hydrophobe Kern, der v.a. durch aromatische Aminosäuren gebildet wird. Die Bindungstasche für Cyclosporin wird

von vier β -Strängen ($\beta 3$ - $\beta 6$) und einer Schleife zwischen Lysin 118 und Histidin 126 gebildet (Ke et al. 1991, Kallen et al. 2005).

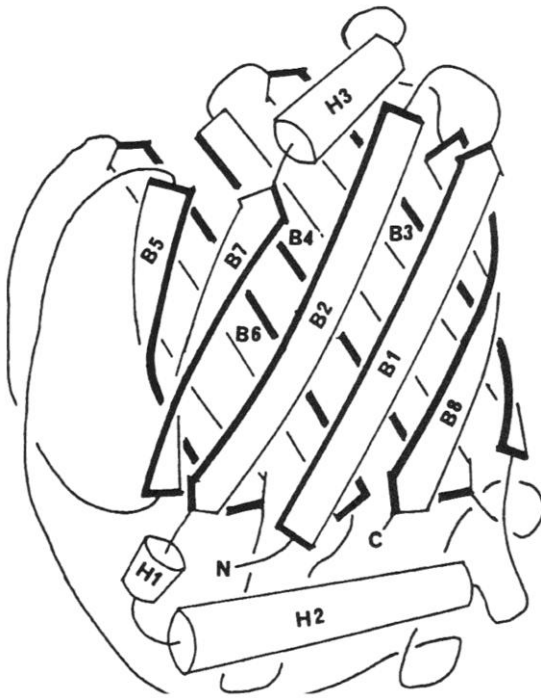


Abbildung 10: Aufbau von Cyclophilin A (Ke et al. 1991)

B1-B8 = β -Faltblattstrukturen

H1-H3 = α -Helices

2.3.4 Extrazelluläres Cyclophilin A als Entzündungsmediator

CyPA spielt bei vielen Krankheitsgeschehen eine übergeordnete Rolle. Erhöhte Cyclophilin A Spiegel werden bei inflammatorischen Erkrankungen wie schwerer Sepsis (Tegeder et al. 1997), Schädigung der glatten Gefäßmuskulatur (Jin et al. 2004) und rheumatoider Arthritis (Billich et al. 1997) gefunden. Auch bei der Entstehung von Neoplasien scheint CyPA maßgeblich beteiligt zu sein, wobei CyPA v.a. bei Kolonadenokarzinomen, Lymphomen (Koletsy, Harding und Handschumacher 1986) und Adenokarzinomen des Pankreas (Li et al. 2006) erhöht ist. Für zahlreiche Viren stellt CyPA eine zentrale Schlüsselfigur dar. Bei *human immunodeficiency virus* (HIV)-1 Infektionen ist CyPA für die Replikation des Virus (Braaten, Franke und Luban 1996) und die Translokation vom Zytoplasma in den Nukleus (Zander et al. 2003) unerlässlich. Für das Hepatitis C Virus ist CyPA unabdingbar für die Replikation (Chatterji et al. 2009).

CyPA wirkt auf Monozyten (Payeli et al. 2008), neutrophile und eosinophile Granulozyten (Xu et al. 1992), sowie auf T-Lymphozyten (Allain et al. 2002) chemotaktisch. Stimulierte

Makrophagen, Monozyten (Sherry et al. 1992), Endothelzellen (Kim et al. 2004), glatte Gefäßmuskelzellen (Suzuki et al. 2006) und Thrombozyten (Coppinger et al. 2004) sind in der Lage CyPA freizusetzen und das Entzündungsgeschehen voranzutreiben. Als Stimulanzen dienen dabei das von gramnegativen Bakterien stammende Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil (Sherry et al. 1992), sowie oxidativer Stress (Jin et al. 2000). Die Bindung von CyPB führt bei Thrombozyten über einen Kalziuminflux zu einer vermehrten Adhäsion an Kollagen (Allain et al. 1999).

Lösliches CyPA hat in Bezug auf Endothelzellen einen zweiseitigen Effekt. Zum einen bewirkt es eine gesteigerte Proliferation und Migration von Endothelzellen, zum anderen wirkt es in höheren Konzentration zytotoxisch (Kim et al. 2004).

Es bewirkt eine gesteigerte Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle wie E-Selektin und VCAM-1. Dabei wirkt es wie ein proinflammatorisches Zytokin, indem es den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert und als Folge dessen E-Selektin und VCAM-1 vermehrt exprimiert wird (Jin et al. 2004).

In Monozyten bewirkt CyPA eine Freisetzung von IL-6, was der PPIase Aktivität von CyPA zugerechnet wird (Payeli et al. 2008). Darüber hinaus wirkt CyPA proinflammatorisch indem es in Monozyten und Makrophagen über NF- κ B TNF- α , IL-8 und MCP-1 induziert, sowie die Aktivität von MMP-9 stimuliert (Kim et al. 2005).

Während der Atherogenese wird CyPA freigesetzt. CyPA wird in atherosklerotischen Plaques in glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und extrazellulär nahe der Lamina elastica nachgewiesen (Jin et al. 2004, Sherry et al. 1992). CyPA wird auch als sogenannter *secreted oxidative stress-induced factor* (SOXF) bezeichnet, da es infolge von oxidativem Stress u.a. von glatten Gefäßmuskelzellen selbst ausgeschüttet wird (Suzuki et al. 2006) und die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen, sowie die Apoptose von Endothelzellen fördert (Jin et al. 2000, Jin et al. 2004).

2.3.5 Interaktion Cyclophilin A / CD147 (EMMPRIN)

CD147 (EMMPRIN) ist verantwortlich für die Cyclophilin-abhängige Chemotaxis und Adhäsion von Immunzellen. CD147 (EMMPRIN) ist dabei ein sogenannter signalgebender Rezeptor sowohl für CyPA, als auch für CyPB (Yurchenko et al. 2001). Die Hauptbindungsstelle für Cyclophilin stellen Heparansulfatproteoglykane (HSPGs) dar. Durch die Bindung von Cyclophilin an Heparane wird die Interaktion mit CD147 (EMMPRIN) erleichtert. CyPA bindet an die HSPGs, welches dann CD147 (EMMPRIN) präsentiert wird. Die Bindung von Cyclophilin hat nur eine niedrige Bindungsaffinität und ist nur vorübergehend (Yurchenko et al. 2002). Eine bedeutende Rolle für die signalgebende

Wirkung von CyPA stellt dabei Prolin 180 und Glycin 181 in der extrazellulären Domäne von CD147 (EMMPRIN) dar (Yurchenko et al. 2002).

Cyclophilin spielt nicht nur als Ligand eine Rolle, sondern ist auch am intrazellulären Transport von CD147 (EMMPRIN) mitbeteiligt (*Abbildung 11*). Hierbei wurde bisher CyP60 als weiteres Mitglied der Cyclophilin Familie identifiziert, welches sich im Lumen des Golgi-Apparates befindet. Es sorgt für den erfolgreichen Transport von CD147 (EMMPRIN) vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran (Pushkarsky et al. 2005).

Wird CyPA mit Hilfe von Cyclosporin gehemmt, ist die Expression von CD147 (EMMPRIN) an der Zelloberfläche deutlich minimiert (Yurchenko et al. 2005).

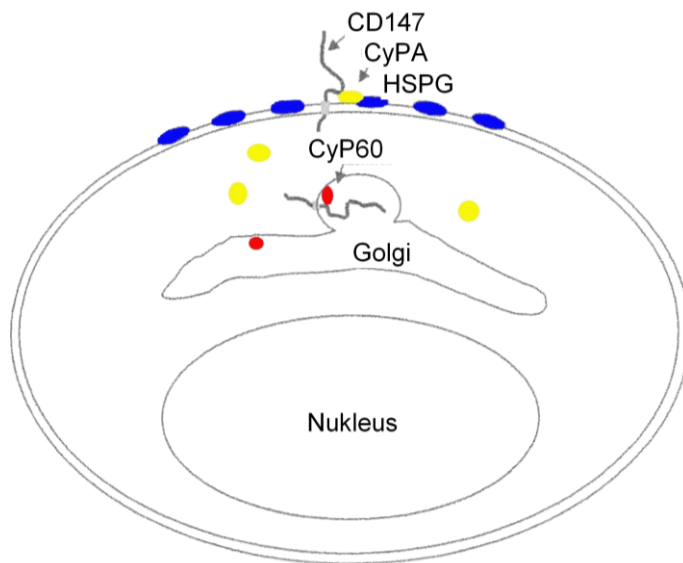


Abbildung 11: Wirkungsweise von CyP60: Intrazellulärer Transport von CD147 (EMMPRIN) (modifiziert nach Yurchenko, Constant und Bukrinsky 2006)

CD147 (EMMPRIN) wird über das Golgi System zur Zelloberfläche transportiert. Dabei interagiert CyP60 mit CD147 (EMMPRIN) im Lumen des Golgi Apparates. Es sorgt dafür, dass CD147 (EMMPRIN) zur Plasmamembran transportiert wird. Extrazelluläres CyPA hingegen bindet an Heparansulfatproteoglykane (HSPG).

2.3.6 Isoformen von Cyclophilin

Cyclophiline kommen in den verschiedensten Lebewesen vor. Es wurde bisher in Säugern, Insekten, Pilzen und Pflanzen gefunden, ihre Struktur ist beinahe identisch. Allen gemein ist die Funktion als PPIase.

Die Isoforme unterscheiden sich in ihrer Lokalisation und Bindungsaffinität zu Cyclosporin A (Fruman et al. 1994)

Im Menschen gibt es sieben Hauptcyclophiline - hCyPA (hCyp 18), hCyPB, hCypC, hCypD, hCypE, hCyp40 und hCypNK (Galat 1993). Drosophila besitzt mindestens neun Cyclophiline (Galat 1993), die Pflanze Arabidopsis thaliana mutmaßliche neunundzwanzig Cyclophiline (He, Li und Luan 2004).

Isoformen wie Cyclophilin B,C,D, und D (CyPB,C,D,S) wurden v.a. im Endoplasmatischem Retikulum (ER) oder in der Mitochondrienmatrix lokalisiert (Galat 1993).

CyPB ist ein 21 kDa Protein, das in Blut und Muttermilch in Konzentrationen bis zu 150 µg/ml nachgewiesen werden (Allain et al. 1995, Mariller et al. 1996). CyPB ist auch im Nukleus zu finden (Le Hir et al. 1995). Dort dient es v.a. zur Regulation der Transkription (Rycyzyn und Clevenger 2002). Auch bei neoplastischen Geschehen spielt CyPB eine Rolle. Bei Mammakarzinomen wurde z.B. eine vermehrte Expression von CyPB festgestellt. Man vermutet, dass CyPB über die Expression von Hormonrezeptoren und Genprodukten eine Zellproliferation und Migration bewirkt (Fang et al. 2009).

2.4 Glykoprotein VI (GPVI)

Im menschlichen Organismus gibt es bis zu 25 verschiedene Kollagenarten. Im Falle der Atherosklerose spielen dabei v.a. Kollagen I und Kollagen III, welche in lipidreichen atherosklerotischen Plaques gefunden wurde eine übergeordnete Rolle (Penz et al. 2005). Dabei kommt Kollagen Typ III v.a. im Kern (*Core*) der Plaque vor, Kollagen Typ I vermehrt in der Kappe (Schulz et al. 2008). Die Aktivierung von Thrombozyten durch Kollagen stimuliert die Thrombusbildung (Penz et al. 2005). Kollagen besteht aus einer Triple-Helix, die sich aus dem sich wiederholenden GXY Motiv zusammensetzt. G steht dabei für Glycin, X und Y sind dabei meistens Prolin und Hydroxyprolin. Diese sich wiederholenden Einheiten bilden dabei eine Einzelstrang linksdrehende Helix, die sich mit zwei anderen Ketten zu einer rechtsdrehenden Superhelix vereinigt (Nieswandt und Watson 2003).

Für die Bindung der Thrombozyten an Kollagen ist das Molekül GPVI verantwortlich.

GPVI ist ein 60-65 kDa schweres Molekül (Clemetson et al. 1982), das der Immunglobulin Superfamilie zugeordnet wird (Ezumi, Uchiyama und Takayama 2000).

2.4.1 Struktur von Glykoprotein VI

Wie in *Abbildung 12* dargestellt besteht GPVI aus zwei Immunglobulin-ähnlichen extrazellulären Domänen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, einer seronin- und threoninreichen Region, einer transmembranösen Region und einem zytoplasmatischen Schwanz. Über einen Arginin-Rest in der transmembranösen Region kann GPVI eine nicht-kovalente Bindung zu dem Fc-Rezeptor-γ (FcRγ) eingehen (Berlanga et al. 2002).

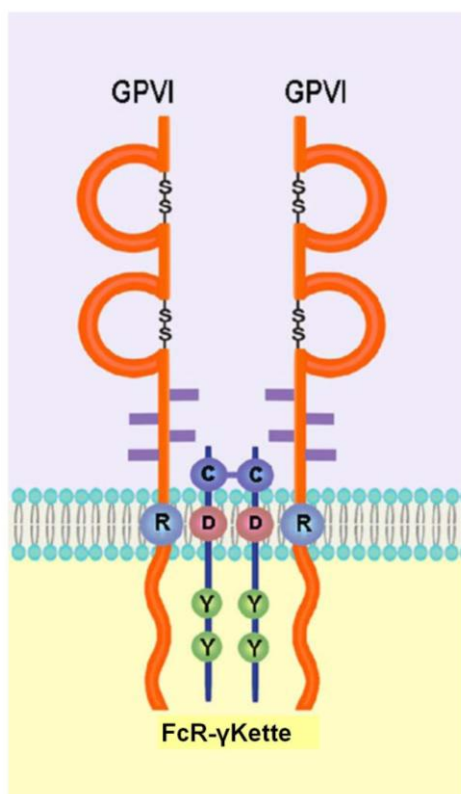


Abbildung 12: Struktur von Glykoprotein VI (modifiziert nach Moroi und Jung 2004)

2.4.2 Interaktion von Glykoprotein VI mit Kollagen

Hinweise, dass GPVI für die Bindung von Thrombozyten an Kollagen verantwortlich ist, gab es erstmals 1982. Mittels Gelelektrophorese konnte ein niedermolekulares Glykoprotein identifiziert werden, dass mit der Adhärenz von Thrombozyten in Verbindung stand (Clemetson et al. 1982). 1987 zeigten Sugiyama et al., dass ein 62 kDa schweres Protein für die Bindung von Thrombozyten an Kollagen verantwortlich ist. Bei einer Patientin mit *Idiopathic Thrombocytopenic Purpura* (ITP) konnten Autoantikörper gegen dieses Protein isoliert werden. Die Thrombozyten verhielten sich außer in ihrer Bindung zu Kollagen normal (Sugiyama et al. 1987). Moroi et al. identifizierten die Autoantikörper als Antikörper gegen GPVI. Damit stand für die Autoren fest, dass GPVI für die Bindung von Thrombozyten an Kollagen verantwortlich ist. Moroi et. al konnten 1989 GPVI als dieses niedermolekulare Glykoprotein identifizieren (Moroi et al. 1989).

Nur GPVI mit gebundenem Fc führt zu einer kollageninduzierten Thrombozytenaggregation. Dabei liegt GPVI-Fc als dimeres Molekül vor.

Die Bindung an Kollagen erfolgt über die Glycin-Prolin-Hydroxyprolin Wiederholungseinheiten von Kollagen.

2.4.3 Glykoprotein VI und Atherosklerose

Thrombozyten spielen in der Pathogenese der Atherosklerose eine wichtige Rolle. Thrombozyten adhären erst, wenn die Endothelzellschicht von Gefäßen verletzt sind, wie es auch bei der Atherosklerose der Fall ist. Hier kommt es zur Zerstörung von Endothelzellen, sodass die subendotheliale extrazelluläre Matrix, die u.a. aus Kollagen, Elastin, Glykoproteinen und Proteoglykanen besteht, freiliegt (Katsuda und Kaji 2003). Dadurch wird eine Stimulierung und Adhäsion von Thrombozyten ausgelöst (Varga-Szabo, Pleines und Nieswandt 2008).

Bei *in vivo* Versuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass durch Blockierung von GPVI mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers die Anbindung und Aggregation von Thrombozyten vermindert ist (Massberg et al. 2003). In weiteren Studien mit ApoE^{-/-} Mäusen, deren Carotiden mit Hilfe eines Drahtes verletzt werden, bindet GPVI-Fc vermehrt an diese Gefäßverletzungen (Schönberger et al. 2008).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Zielsetzung

An der Entstehung von Atherosklerose sind eine Vielzahl an Entzündungszellen beteiligt. Dabei sind die Interaktionen dieser Zellen mit der Gefäßwand von großer Bedeutung, da dadurch nicht nur weitere Zellen aktiviert werden können, sondern auch proteolytische Vorgänge in Gang gesetzt werden.

Thrombozyten spielen im Falle der Atherosklerose aus verschiedenen Gründen eine zentrale Rolle. Zum Einen kommt es zu einer Zunahme des *Thetering* und des *Rolling* und schließlich zur festen Adhäsion der Blutplättchen mit der Folge einer Thrombusbildung. Klinische Folgen der Thrombusbildung stellen die instabile Angina pectoris oder der Myokardinfarkt dar (Gawaz 2001). Beim Einreißen der fibrösen Kappe wird subendotheliales Kollagen freigelegt, sodass die Thrombozyten mit Kollagen in Kontakt kommen und über GPVI binden (Nieswandt und Watson 2003). Zum Anderen können sie mit einer Anzahl verschiedener Zellen in Kontakt treten. Dabei sind sie in der Lage mit Monozyten Koaggregate zu bilden, die sich dann an die Gefäßwand anlagern (May, Seizer und Gawaz 2008). Auch können sie über CD147 (EMMPRIN) Monozyten aktivieren, welche daraufhin proinflammatorische Zytokine abgeben (Schmidt et al. 2008). Dadurch können sie das Entzündungsgeschehen wesentlich vorantreiben und beeinflussen.

Da sowohl CD147 (EMMPRIN), als auch sein Ligand CyPA in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen wurde (Major et al. 2002, Coppinger et al. 2004), stellt sich hier unmittelbar die Frage, welche Auswirkungen CyPA auf die Interaktion von Thrombozyten mit der Gefäßwand hat. Dabei liegt die Vorstellung zugrunde, dass CyPA über CD147 (EMMPRIN) an Blutplättchen bindet und diese dadurch stimuliert werden, was sich in ihrem Verhalten gegenüber dem Endothel widerspiegelt. Über Aktivierung von MMPs kann es so zu einer Umgestaltung der atherosklerotischen Plaques kommen. Diese Thrombozyten-Endothel Interaktion wurde in der vorliegenden Arbeit zum Einen mit Hilfe der Flusskammer, bei der arterielle Flussbedingungen hergestellt wurden, zum Anderen mit Hilfe von *in vivo* Versuchen verdeutlicht.

Ein weiteres wichtiges Anliegen war, zu klären, welche Rolle CyPA in den pathophysiologischen Vorgängen nach Myokardinfarkt spielt. Beim Myokardinfarkt, einer der häufigsten Komplikationen der Atherosklerose, kommt es zur Ischämie des Gewebes. Das betroffene Areal wird nekrotisch. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass CyPA aus zugrunde gehenden Zellen freigesetzt wird (Galat 1993). Durch während einer Ischämie bestehenden Hypoxie kann CyPA ebenso freigesetzt werden, um Zellen vor Apoptose zu schützen (Seko et al. 2004). Ungeklärt hingegen ist jedoch, wie sich CyPA direkt auf Kardiomyozyten auswirkt. Hier galt es festzustellen, ob auch bei Kardiomyozyten der CD147

Eigene Untersuchungen

(EMMPRIN)-Rezeptor exprimiert wird und ob CyPA durch seine Bindung in der Lage ist, eine gesteigerte MMP-Aktivität herbeizuführen. Dabei wurde als Methodik zum Einen Immunfluoreszenz verwendet, zur Messung der MMP-Aktivität hingegen die Zymographie. Der direkte Einfluss von CyPA auf die Kardiomyozyten sollte in der Zellkultur mit Hilfe der Beeinflussbarkeit der Spontankontraktion dargestellt werden.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Material

3.2.1.1 Geräte

Brutschrank Sanyo MCO-18AIC	Sanyo Electric Biomedical Co. , Ltd, München
CCD-Kamera (<i>Charged Coupled Device</i> -Kamera, FK 6990-IQ-S)	Pieper GmbH, Schwerte
Falconständer	Brand, Wertheim
Fluoreszenzmikroskop Axiovert Vario	Carl Zeiss AG,Göttingen
Flusskammer	provitro GmbH, Berlin
Kaltlichtquelle	Carl Zeiss AG, Göttingen
Konfokales Lasermikroskop LSM 5 EXCITER	Carl Zeiss, Jena
Kühlschrank	Gram Commercial A/S, Vojens, Dänemark
Lichtmikroskop Axiovert 2000	Carl Zeiss AG,Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Perfusor® fm	Braun, Melsungen
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl a. R.
Pipette Eppendorf <i>research</i>	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Accu Jet Pro	Brand, Wertheim
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen
Stereomikroskop	Carl Zeiss AG,Göttingen
Sterilbank HERAsafe	Hereaus, Kendro Labatory Products GmbH, Hanau
Tischzentrifuge Megafuge 1.0R	Hereaus, Kendro Labatory Products GmbH, Hanau
Zellzählautomat KX-21N	Sysmex, Kobe, Japan

3.2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bepanthen® Augen-und Nasensalbe	Bayer, Leverkusen
Butterfly Multifly Set	Braun, Melsungen
<i>Cover slips</i> 25 mm (Deckgläser)	Häberle Labortechnik, Lonsee-Ettlenschieß
Dreiwegehahn discifix ®	Braun, Melsungen

Eigene Untersuchungen

Einmalspritze 20 ml	Braun, Melsungen
Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Filtereinheit 0,22 µm Millex GS	Millipore, Bedford, USA
Polythene Tubing, 0,28 mm ID, 0,61 mmOD (Vena Jugulariskatheter)	Portex, Hythe, UK
Prolene® Nahtmaterial, 7,0 metric	Ethicon, Norderstedt
Lab-tek™ Chamber Slide	Thermo Fisher Scientific (Nunc GmbH & Co.KG), Langenselbold
Mäusefutter	Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Membranadapter	Sarstedt, Nümbrecht
Perfusorspritzen 50 ml	Braun, Melsungen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Sechs-Loch Platte	Becton Dickinson, Heidelberg
Stangenpipetten	Corning Incorporated, NY., USA
Tissue Culture Dish (100 x 20 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Transferpipetten (3 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Weichholzgranulat (entstaubt)	ABEDD-LAB & VET Service GmbH, Wien, Österreich
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Corning Incorporated, NY., USA
Zellophane	Gibco invitrogen, Karlsruhe

3.2.1.3 Lösungen, Medien, Reagenzien

ADP 2,5 mg 1mM	ChronoLog, Havertown, USA
Albumin Fraktion V	AppliChem, Darmstadt
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, München
Bovines Holotransferrin	Sigma-Aldrich, München
Bovines Kollagen Typ I	Becton Dickinson, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R-250	Biorad, München
D (+)-Glukose, wasserfrei	Merck, Darmstadt
DCF (5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate)	Molecular Probes, USA
DMEM	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Draq5™	Biostatus, Leicestershire, UK
Eisessig	Merck, Darmstadt

Eigene Untersuchungen

Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Fetales Kälberserum (FCS)	StemCell Technologies, Vancouver, Kanada
4% Formaldehyd	Fischar, Saarbrücken
Gelatine (2% Solution Type B: from Bovine skin)	Sigma-Aldrich, München
Gel-Dry™ Drying solution	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, München
IMDM	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kochsalzlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
<i>Leukemia inhibitory factor</i>	Milipore, Bedford, USA
Medium 199	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Prolabo BDH, Beauvais, Frankreich
Monothioglycerol	Sigma-Aldrich, München
Natriumcitrat	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
NIM811	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
Novex® Zymogram Developing Buffer (10 x)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Novex® Zymogram Renaturing Buffer (10 x)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung, PBS)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
PenStrep (10 000 µg/ml Streptomycin 10 000 Units/ml Penicillin)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
<i>ProLong Gold antifade</i>	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Ringerlaktatlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg

Eigene Untersuchungen

Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
<i>Sodium dodecyl sulfat</i> (SDS), ultra pure	Roth, Karlsruhe
<i>SeeBlue</i> [®] Plus2 Pre-Stained Standard	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
TrisHCl pH 6,8	Sigma-Aldrich, München
Trypsin-Ethylendiamin-	
Tetraessigsäure (EDTA) (0,5%)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
<i>Vasculife</i> [®] Basal	Lifeline Cell Technology, St. Katharinen
<i>Vasculife</i> [®] VEGF LifeFactors	Lifeline Cell Technology, St. Katharinen
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, München

3.2.1.4 Puffer, Zellmedien

ACD-Puffer

(Acid-Citrate-Dextrose)

12, 5 g Na₃Citrat
6,82 g Zitronensäure
10 g Glucose
Aqua dest. ad 500 ml mit NaOH auf pH 4,6
einstellen

Coomassie Brilliant Blau

0,25 g Coomassie
45 ml Aqua dest.
45 ml Methanol
10 ml Eisessig

human umbilical

vein endothelial

cells (HUVEC) Zell Medium

495 ml *Vasculife*[®] Basal
Vasculife[®] VEGF LifeFactors
5 ml Penicillin Streptomycin (1%)

Kardiomyozyten Zellmedium

450 ml DMEM
50 ml fetales Kälberserum (10%)
leukemia inhibitory factor (1000 U/ml)
Penicillin Streptomycin (2mM)
Nicht-essentielle Aminosäuren (0,1mM)

Eigene Untersuchungen

	β -Mercaptoethanol (0,1mM)
<u>Kardiomyozyten Differenzierungsmedium</u>	425 ml IMDM 75 ml FCS (15%) Penicillin Streptomycin (2mM) Monothioglycerol (450 μ M) 100g bovines Holotransferrin (200 μ g/ml) 25 g Ascorbinsäure (50 μ g/ml)
<u>Ladepuffer 5 x (non reducing)</u>	6,5 ml 1M TrisHCl pH 6,8 2 ml 10 % SDS 1 ml Glycerol 1 Spatelspitze Bromphenolblau
<u>Laufpuffer 10 x</u>	30 g Tris (25mM) 144 g Glycin 10 g SDS (0,1 %) Aqua dest. ad 1000 ml Auf 65°C erhitzen
<u>Tyrodes- Puffer 10 x</u>	80 g Natriumchlorid 10,15 g Natriumhydrogencarbonat 1,95 g Kaliumchlorid Aqua dest. ad 1000 ml
<u>Tyrodes Gebrauchslösung</u>	20 ml Tyrodes Puffer (10x) 0,2 g BSA 0,2 g Glucose Aqua dest. ad 200 ml Mit HEPES auf pH 7,4 einstellen, 50 ml abnehmen, den Rest mit HCl auf pH 6,5 einstellen

3.1.2.5 Rekombinante Proteine

Cyclophilin A, human	R&D Systems, Wiesbaden
Fc	Eigenherstellung

Eigene Untersuchungen

GPVI-Fc	Eigenherstellung
IFN- γ , human	Peprotech, Rocky Hill, USA
TNF- α , human	Peprotech, Rocky Hill, USA

3.1.2.6 Antikörper

blockierende Antikörper

	<u>Klon</u>	
Anti-human CD147	UM-8D6	Ancell, Bayport, USA
IgG ₁ Isotypkontrolle	15H6	Biozol Diagnostica, Eching
Anti-human PSGL-1	3E2-25-5	Immunotech, Krefeld

Primärantikörper

	<u>Klon</u>	
Rat anti mouse CD147	OX114	AbD Serotec, Düsseldorf
Rat IgG ₁ Isotypkontrolle	RTK2071	Abcam, Cambridge, UK
Rabbit Immunglobulin Fraction, Isotypkontrolle	polyklonal	Dako, Glostrup, Dänemark
Troponin I	H-170	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Sekundärantikörper

Alexa Fluor® 488 donkey anti rat IgG	Gibco invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor® 555 goat anti rabbit IgG	Gibco invitrogen, Karlsruhe

3.1.2.7 Zellen und Zelllinien

humane Thrombozyten	gesunde humane Spender
HUVEC (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
murine Kardiomyozyten	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. C. Lengerke

Eigene Untersuchungen

3.1.2.8 Mäusestamm

Wildtypmaus (C57BL/ 6J)

Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld

3.2.1.9 Narkose

Isofluran (Isoba[®])

ESSEX Pharma GmbH, München

Medetomidin (Domitor[®])

Pfizer GmbH, Karlsruhe

Midazolam (Midazolam-ratiopharm
5mg / 1ml[®])

Ratiopharm GmbH, Ulm

Fentanyl (Fentanyl 0,5 mg curamed[®])

CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe

Sauerstoff

Linde AG, Pullach

3.3 Methoden

3.3.1 *In vitro* Versuch

Die Zellkulturen werden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre gehalten. Alle Lösungen und Medien werden durch einen Filter mit einer Porenweite von 0,2 µm steril filtriert. Alle Reagenzien, Medien und Proben werden je nach Anforderung bei 4°C, Minus 20°C und Minus 80°C gelagert und nach Gebrauch wieder eingefroren bzw. im Kühlschrank bei 2°C aufbewahrt.

3.3.1.1 Isolierung humaner Thrombozyten

Die Blutentnahme von humanen freiwilligen weiblichen Spendern erfolgt aus der Vena mediana cubitii mit Hilfe einer Butterfly-Kanüle in sterile 20 ml Spritzen mit Membranadapter, die zuvor mit 4 ml Acid-Citrate-Dextrose (ACD)-Puffer gefüllt wurden.

Es werden je 10 ml Blut in 15 ml Falcon-Röhrchen vorsichtig überführt und bei Raumtemperatur 20 Min. bei 210xg ohne Bremse zentrifugiert. Die Zentrifugation trennt die Blutbestandteile nach ihrer Größe. Es entstehen zwei Phasen. Im Überstand, der oberen Phase, reichert sich plättchenreiches Plasma an, das mit Hilfe einer Transferpipette vorsichtig abgenommen wird und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt wird. Dabei sollten maximal 10 ml des plättchenreiches Plasma pro 50 ml Röhrchen überführt werden. Es wird mit Tyrodes Puffer pH 6,5 auf 35 ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur 10 Min. bei 900xg mit Bremse zentrifugiert. Am Boden setzt sich das zellenreiche Pellet ab. Der Überstand wird mit Hilfe von Stangenpipetten vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wird in maximal 500 µl Tyrodes pH 6,5 aufgenommen und dieselbe Menge Tyrodes pH 7,4 zum Neutralisieren dazugegeben und vorsichtig resuspendiert.

Mit Hilfe eines Zellzahlgerätes wird die Thrombozytenkonzentration ermittelt. Dazu werden 180 µl Tyrodes pH 7,4 und 20 µl der Zellsuspension in ein Eppendorfröhrchen gegeben (Verdünnung 1:10).

Je nach ermittelter Konzentration wird die benötigte Menge für die gewünschte Konzentration von 5×10^7 Thrombozyten/ml berechnet.

3.3.1.2 Kultivierung von menschlichen Endothelzellen

Für die Versuchsansätze werden humane Endothelzellen (sog. HUVECs= *human umbilical vein endothelial cells*) verwendet, die aus der Nabelschnur isoliert werden.

Das Medium besteht aus zwei Komponenten. Zum einem dem *Vasculife*[®] Basal Medium, zum anderen aus dem *Vasculife*[®] VEGF LifeFactors Kit, welches Supplemente (Ascorbinsäure, Heparinsulfat, Hydrokortison Hemisuccinat, L-Glutamin, fetales Kälberserum) und Wachstumsfaktoren (rh VEGF, rh EGF, rh IGF-1) enthält. 1% iges Penicillin-Streptomycin (PSI) wird dem Medium hinzugesetzt. Sobald die Zellen konfluent sind werden sie getrennt und in neue Flaschen bzw. für den Flusskammerversuch in 6-Loch-Platten überführt. Dazu wird das in der Flasche enthaltene Medium mit Hilfe einer sterilen Stangenpipette entnommen und verworfen. Es wird mit 10 ml PBS gespült, welches anschließend ebenso verworfen wird. Anschließend erfolgt die Ablösung der Zellen mit Hilfe von 0,5% Trypsin-EDTA. Pro Flasche werden 3 ml Trypsin verwendet. Zur besseren Ablösung wird die Flasche für max. 3 Min. in den Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ verbracht. Da Trypsin zelltoxisch ist, darf die vorgegebene Zeit von 3 Min. nicht überschritten werden. Die Ablösung wird nach 3 Min. durch Zusatz von Medium abgestoppt. Die Gesamtmenge von 10 ml wird in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, 10 µl entnommen und für die Neubauer Zählkammer verwendet. Ein Quadrant der Neubauer Zählkammer wird ausgezählt und so die Zellzahl ermittelt. Währenddessen wird das 50 ml Falcon-Röhrchen bei Raumtemperatur 5 Min., bei 300xg mit Bremse zentrifugiert. Am Boden setzt sich ein zellreiches Pellet ab. Der Überstand wird vorsichtig mit Hilfe einer Stangenpipette abgenommen und das Pellet in 1 ml Medium gelöst. Je nach gewünschter Zellzahl wird die entsprechende Menge ins Medium pipettiert und die Zellen ausgesät. Dazu müssen die Flaschen bzw. die 6-Loch-Platten mit 0,2% Gelatine beschichtet werden. Hierzu werden 3 ml Gelatine (0,2% ig) für Flaschen bzw. 500 µl pro Well verwendet und für mindestens 15 Min. im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach dieser Zeit wird die verbliebene Gelatine abpipettiert und verworfen. Das Medium und die darin gelöste Zellzahl (10 ml pro Flasche bzw. 2 ml pro Well) wird in Flaschen bzw. in die Loch-Platten pipettiert und anschließend in den Brutschrank verbracht.

3.3.1.3 Flusskammerversuch

Mit Hilfe der Flusskammer lassen sich die im arteriellen Endgebiet auftretenden Scherkräfte *in vitro* simulieren, was Einblicke in die dort bestehenden zellulären Interaktionen ermöglicht. Das mit den konfluenten HUVECs oder Kollagen beschichtete *cover slip*, wird mit einem aufsteckbaren Federring an der Flusskammer fixiert.

Abbildung 13 zeigt den schematischen Aufbau der Flusskammer.

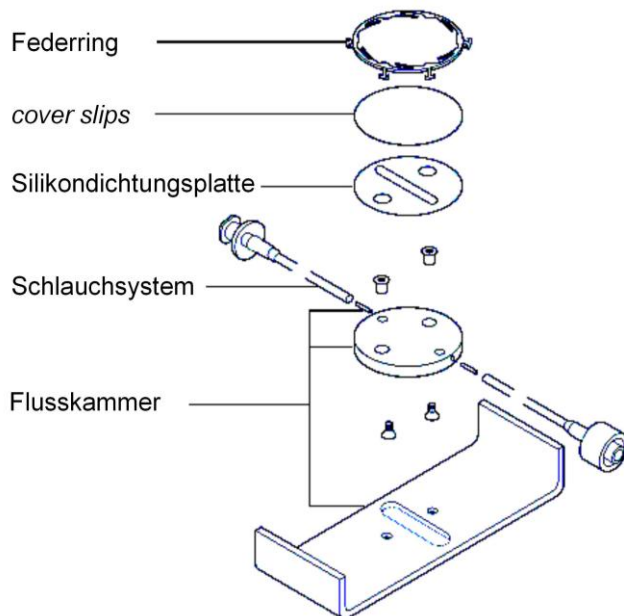


Abbildung 13: Schematischer Aufbau der Flusskammer

(modifiziert nach http://www.provitro.de/uploads/tx_templavoila/FCS_Schema_01.gif)

Flusskammerversuche dienen der Analyse von Adhäsionsvorgängen an einer stationären Phase. In dieser Studie werden Thrombozyten mittels einer Perfusionspumpe über eine Schicht konfluenter Endothelzellen perfundiert. Die Adhäsionsvorgänge werden über Durchlichtmikroskopie und Videoanalyse untersucht.

HUVECs werden in 6-Loch-Platten auf *cover slips* kultiviert, bis sie konfluent sind.

Am Tag des Versuches werden humane Thrombozyten isoliert und je nach Versuchsanordnung stimuliert. Für den Flusskammerversuch wird eine Konzentration von 5×10^7 Thrombozyten/ml benötigt. Dabei erfolgt stets eine Negativkontrolle mit unstimulierten Thrombozyten. Die Thrombozyten werden mit dem zugesetzten Reagenz 30-40 Min. inkubiert. Anschließend wird die Zellsuspension mit Tyrodes pH 7,4 verdünnt, sodass die gewünschte Konzentration von 5×10^7 Thrombozyten/ml erreicht wird, in eine Perfusionspritze gefüllt und mit einem 3-Wege-Hahn verschlossen. Die Perfusionspritze wird in den Perfusor eingelegt und an das Schlauchsystem der Flusskammer angeschlossen. Die Vorschubkraft beträgt 15 ml/h, dies entspricht einer arteriellen Scherrate (2000^{-5}). Die *cover slips* werden auf eine Silikon Dichtungsplatte gelegt und mit Hilfe eines Dichtungsringes umschlossen. Nach 10 minütiger Vorlaufzeit, werden pro *cover slip* vier Videosequenzen aufgenommen. Diese vier Videosequenzen dauern 30 Sekunden und

Eigene Untersuchungen

dienen der Auszählung. Pro Sequenz wird an vier unterschiedlichen Stellen ausgezählt. In *Abbildung 14* wird der Aufbau des Arbeitsplatzes fotografisch und schematisch gezeigt.

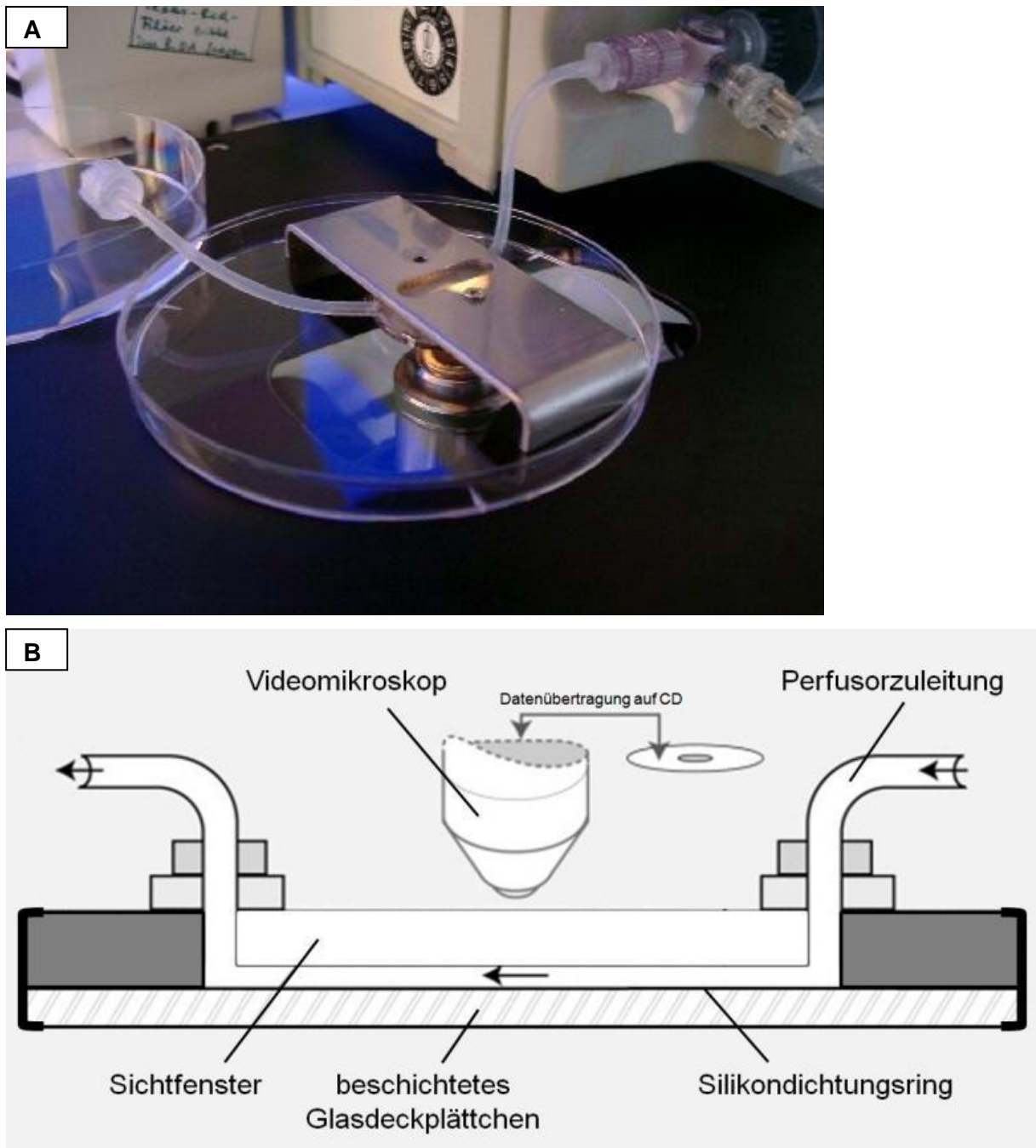


Abbildung 14: Versuchsaufbau einer dynamischen Flusskammeruntersuchung

Mittels Perforator werden die zu untersuchenden Zellen in der entsprechenden Konzentration mit einer Flussgeschwindigkeit entsprechend der arteriellen Abscherungsrate über beschichtete Glasdeckplättchen perfundiert. Das Verhalten von Zellen unter Fluss wird mit einem Videomikroskop aufgezeichnet.

A Fotografie (Stolla 2008) **B** Schema (Modifiziert nach Oligene, Berlin 2006)

3.3.1.4 Beschichtung der *cover slips*

Die *cover slips* werden entsprechend den Versuchansätzen mit HUVECs oder Kollagen beschichtet.

Bevor die Zellen aufgetrennt und ausgesät werden, werden die *cover slips* zur Desinfektion für eine Stunde in 70% igen Ethanol gelegt. Anschließend werden sie in der 6-Loch-Platte aufgestellt. Nach dem Trocknen werden sie mit 0,2% iger Gelatine beschichtet und für 15 Min. in den Brutschrank gestellt.

Die Zellen werden während dieser Zeit aufgetrennt und schließlich auf die *cover slips* gegeben.

Wird der Versuchsansatz mit aktivierten HUVECs durchgeführt, so werden die Endothelzellen sechs Stunden vor Versuchsbeginn mit IFN- γ in einer Konzentration von 50 ng/ml und TNF- α in einer Konzentration von 20 ng/ml aktiviert.

Wird kein Zellmonolayer benötigt, werden die *cover slips* mit Kollagen beschichtet. Dabei wird Kollagen in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ auf die *cover slips* aufgebracht. Das Kollagen kann bei 4°C über Nacht belassen oder für zwei Stunden in den Brutschrank verbracht werden.

Soll für den Versuch die Bindung der Thrombozyten an das Kollagen mittels GPVI-Fc blockiert werden, werden nach vorangegangener Beschichtung mit Kollagen die Plättchen mit PBS gewaschen und die unspezifischen Bindungen mit Hilfe von 2% igem bovinem Serumalbumin (BSA) blockiert. Dieses wird für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen.

Danach wird wieder mit PBS gewaschen und GPVI-Fc in einer Konzentration 20 $\mu\text{g/ml}$ über Nacht belassen. Am nächsten Tag wird erneut mit PBS gewaschen, bevor die Plättchen zum Versuch bereit sind.

3.3.1.5 Vorinkubation der Thrombozyten

Je nach Versuchsansatz werden die Thrombozyten in einer Konzentration von 5×10^7 /ml entsprechend inkubiert. Dabei werden die Thrombozyten 15 Min. vor Versuchsbeginn mit den jeweiligen blockierenden Antikörpern inkubiert. Es handelt sich dabei um folgende Antikörper: anti-CD147 und anti-P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (anti-PSGL-1) bzw. die entsprechende IgG-Isotypkontrolle.

Die Antikörper werden in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Anschließend wird für 30 Min. mit CyPA bzw. CyPB inkubiert. Für den Versuchsansatz mit NIM811, einem Cyclosporin Analogon, das CyPA inhibiert, werden NIM811 und CyPA bzw. CyPB zusammen für 15 Min. inkubiert, bevor sie zu den Thrombozyten hinzugegeben werden.

Eigene Untersuchungen

Dabei wird für CyPA bzw. CyPB eine Konzentration von 100 nM gewählt, für NIM811 eine Konzentration von 10 μ M.

NIM811 ist ein ein Cyclosporin-Derivat, das im Vergleich zu Cyclosporin eine höhere Affinität zu CyPA hat. NIM811 ist strukturell dem Cyclosporin sehr ähnlich (Waldmeier et al. 2002).

3.3.1.6 Auswertung

Es werden pro *cover slip* jeweils vier Videosequenzen à 30 Sekunden ausgezählt. Jede Videosequenz wird dabei an vier unterschiedlichen Stellen mit einer Fläche von 75 μ m x 50 μ m am Bildschirm ausgezählt. Aus der Summe der vier Werte wird der jeweilige Mittelwert ermittelt. Bei der Auswertung wird zwischen rollenden und adhärenen Thrombozyten unterschieden. Rollende Thrombozyten zeichnen sich durch einen losen Kontakt mit der Oberfläche aus, wobei sich die Fließgeschwindigkeit vermindert. Ein Thrombozyt gilt als adhärent, wenn er sich während des gesamten Beobachtungszeitraum von 30 Sekunden nicht bewegt.

3.3.1.7 Isolierung von Kardiomyozyten und Kultivierung

Embryonic stem cells (ESC) werden aus der inneren Zellmasse (ICM= *inner cell mass*) der Mausblastozyste gewonnen. Für die Entwicklung von Stammzellen zu Kardiomyozyten ist ein sogenannter *feederlayer* notwendig. Hier werden bestrahlte Mäusefibroblasten verwendet, mit denen die ESC kultiviert werden. Um die Undifferenziertheit der ESC zu erhalten werden sie mit *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) unter Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS), *leukemia inhibitory factor*, PSI, nicht-essentiellen Aminosäuren sowie β -Mercaptoethanol bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Medium wird jeden Tag erneuert. Um eine Trennung von den Fibroblasten zu erhalten wird das Zellgemisch jeden vierten oder fünften Tag mit 0,05% Trypsin behandelt und umgesetzt. Sobald die ESC konfluent gewachsen sind werden diese abgenommen. Um eine Differenzierung zu *embryonal bodies* (EB) zu erhalten werden die Zellen mit einem sogenannten Differenzierungsmedium versetzt. Dieses Medium besteht aus *Iscove's Modified Dulbecco's Media* (IMDM), FCS, PSI, Monothioglycerol, bovinem Holotransferrin und Ascorbinsäure. Jeweils 100 ESC werden in 15 μ l Medium auf die Deckel von einer mit PBS gefüllten Petrischale aufgebracht und so als hängende Tropfen für 48 Stunden kultiviert. In dieser Zeit aggregieren die Zellen und bilden komplexe Gebilde, die als *embryonal body* (EB) bezeichnet werden. Diese EB's werden durch Spülen mit Medium eingesammelt und in 6-Loch-Platten für vier Tage kultiviert. Um eine zu feste Anheftung der EB's zu verhindern werden sie bei 50 rpm gerüttelt.

Am sechsten Tag werden die EB's erneut abgenommen und für weitere drei Tage in einer mit 0,1% Gelatine beschichteten 96-Loch-Platte kultiviert.

Nachdem die Zellen Spontankontraktionen zeigen (Tag 9-21), werden zwei Versuchsgruppen gebildet. Bei Gruppe eins wird 200 nM CyPA hinzupipettiert, bei Gruppe zwei die entsprechende Menge PBS. Die Frequenz der Schläge wird jeweils vor Zugabe der Stoffe, als auch vier, 24, 36 und 48 Stunden nach CyPA-Zugabe gezählt und notiert. Nach Versuchsende werden die Überstände entnommen und für die Zymographie verwendet. Die Zellen werden für die Immunfluoreszenz weiter verwendet. *Abbildung 15* zeigt die einzelnen Schritte der Kultivierung.

Eigene Untersuchungen

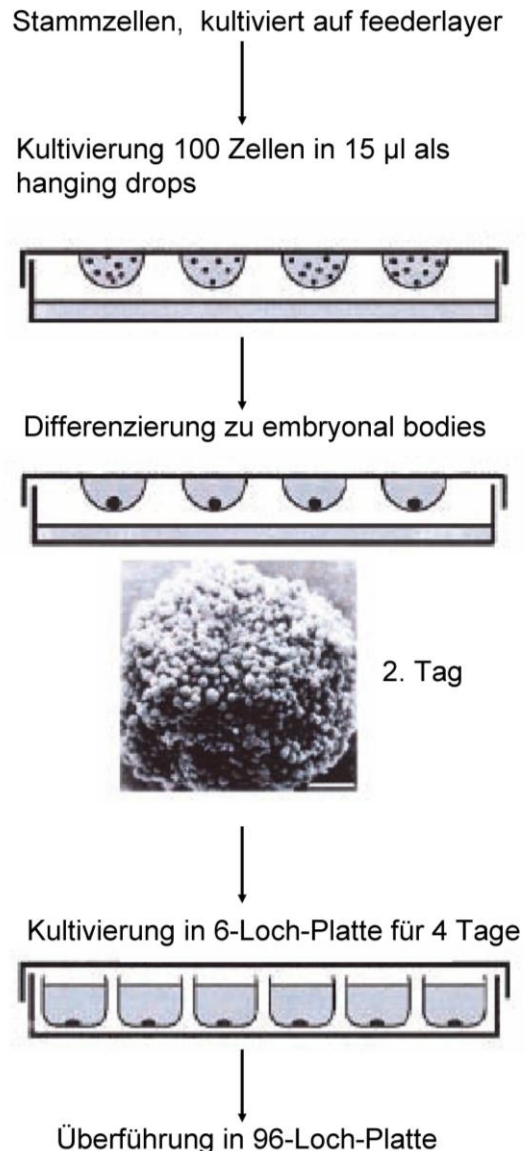


Abbildung 15: Entwicklung und Kultivierung von Kardiomyozyten (Boheler et al. 2002)

3.3.1.8 Zymographie

Die Zymographie beruht auf einer Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Sie dient zum Nachweis von MMP-2 und MMP-9. Dabei bewirkt *Sodium Dodecyl Sulfat* (SDS), dass Gelatine abbauende Enzyme (wie MMP-2 und MMP-9) zunächst denaturieren und inaktiviert werden. Sie wandern dann entlang eines angelegten elektrischen Gradienten entsprechend ihres Molekulargewichtes (MMP-2 72 kDa; MMP-9 92 kDa). Nach der Gelelektrophorese wird das SDS entfernt, was zu einer Renaturierung der MMP's führt. Während einer 12-stündigen Inkubation wird die dem Gel zugesetzte Gelatine von den MMP's abgebaut, was nach einer Anfärbung als helle Bande sichtbar gemacht wird.

Eigene Untersuchungen

Zunächst werden die von den Kardiomyozyten gewonnenen Überstände 1:20 verdünnt.

Dabei werden die mit CyPA bzw. PBS inkubierten Versuchsgruppen miteinander verglichen um den Einfluss von CyPA auf MMP-2 und MMP-9 sichtbar zu machen.

Von den verdünnten Proben werden jeweils 20 µl mit jeweils 5 µl Ladebuffer (5x) für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit werden die Novex-Mini-Zellkammern mit 10% igem Gelatینگelen bestückt und mit dem SDS-Laufpuffer aufgefüllt.

Der dafür vorgesehene Marker (*Seebblue*[®] Plus2 Prestained Standard) wird in die erste Tasche pipettiert. Von den Proben werden jeweils 20 µl in die folgenden Taschen pipettiert.

Zu Beginn der Elektrophorese wird eine Stromspannung von 60 Volt eingestellt, die auf 80 Volt erhöht wird, wenn die Proben eine Linie bilden. Sobald die Proben eine deutliche Auftrennung zeigen, können die Gele entnommen und mit Aqua dest. zweimal gewaschen werden. Nach einer 30 minütigen Inkubation mit dem 1:10 verdünnten Novex Zymogram *Renaturing* Buffer (10x) auf dem Schüttler werden die Gele mit dem ebenfalls 1:10 verdünnten Novex Zymogram *Developing* Buffer (10x) gewaschen. Anschließend werden die Gele für 30 Min. mit frischem Novex Zymogram *Developing* Buffer auf dem Schüttler inkubiert und nach nochmaligem Pufferwechsel dann über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am darauffolgenden Morgen werden die Gele zweimal mit Aqua dest. gewaschen und für 5 Min. mit Coomassie Blue gefärbt und anschließend erneut gewaschen bis die Banden gut sichtbar werden. Die Gele werden für 5 Min. in die *Gel-Dry*[™] *Drying solution* gelegt.

Während dieser Zeit wird die Zellophanfolie vorbereitet. Zellophan wird mit Hilfe von *Gel-Dry*[™] *Drying solution* zum Quellen gebracht, die Gele luftblasenfrei darauf gelegt und schließlich mit ebenfalls eingeweichter Zellophanfolie luftdicht verschlossen und mit einem Rahmen fixiert und für 36 Stunden getrocknet.

3.3.1.9 Immunfluoreszenzfärbung der Kardiomyozyten für die konfokale Mikroskopie

Das Ziel einer Immunfluoreszenzfärbung besteht darin, ein bestimmtes Antigen, hier CD147 (EMMPRIN) nachzuweisen.

Dazu bindet der Primärantikörper spezifisch an das Antigen und wird dann mit Hilfe eines mit Farbstoff konjugierten Sekundärantikörpers, der spezifisch gegen den Primärantikörper ist, sichtbar gemacht. Die hier verwendeten Sekundärantikörper werden dann nach Anregung mit Hilfe von UV-Licht der Wellenlänge 495 nm und 555 nm sichtbar.

Die EBs werden wie oben beschrieben in sogenannte *Chamber slides* ausgesät. Nach Absaugen von Medium und einmaligen Waschen mit PBS, wird der EB mit Hilfe von 4 % igem Paraformaldehyd fixiert und bei Raumtemperatur für 30 Min. belassen.

Eigene Untersuchungen

Danach wird zweimal mit 2% igem Glycin gewaschen, gefolgt von einer Waschung mit PBS. Um unspezifische Bindungen zu blockieren werden die Zellen mit 5% igem BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen.

Anschließend wird erneut mit PBS gewaschen. Die Primärantikörper *Rat anti mouse* CD147, Troponin I, sowie die Isotypkontrollen werden in mit Hilfe von PBS auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt und über Nacht bei 4°C belassen. Nachdem erneut gewaschen wurde werden die Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 *donkey anti rat* IgG, sowie Alexa Fluor® 555 *goat anti rabbit* IgG in derselben Konzentration für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Zellkernfärbung wird mit DRAQ-5 für 10 Min. inkubiert und anschließend mit 10% igem Igepal CA-630 gewaschen. Um ein besseres Bild zu erhalten werden die *Chamber slides* mit *ProLong Gold antifade reagent* eingedeckt.

Die Zellen sind nun für die konfokale Mikroskopie bereit.

3.3.1.10 Konfokale Mikroskopie

Mit Hilfe des konfokalen Mikroskopes besteht die Möglichkeit dreidimensionale Bilder zu erhalten, da es Einblicke in mehrere Ebenen ermöglicht. Mit Hilfe von Laserlicht werden Fluoreszenzfarbstoffe angeregt, die langwelliges Licht emittieren.

Das Prinzip besteht darin, dass nur jeweils ein Punkt beleuchtet wird und nicht das gesamte Präparat. Es wird sozusagen das Präparat Punkt für Punkt und Linie für Linie abgerastert. So wird aus unterschiedlichen abgerasterten Ebenen ein komplettes 3D-Bild konstruiert.

3.3.2 *In vivo* Versuche

3.3.2.1 Prinzip der Intravitalmikroskopie

Mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie können zuvor fluoreszenz-markierte Zellen *in vivo* untersucht werden. Dabei wird von den Fluorophoren kurzwelliges Anregungslicht absorbiert und als langwelliges Licht wieder emittiert. Zur Färbung wird hier *5(und-6)-Carboxyfluorescein diacetate* (DCF) verwendet, welches nach Anregung mit 495 nm bei 517 nm grünes Licht emittiert.

3.3.2.2 Aufbau des Arbeitsplatzes für die Intravitalmikroskopie

Der Arbeitsplatz lässt sich in mehrere Einheiten unterteilen. Die erste Einheit bildet das Versuchstier mit dem vorgelagerten Darmsegment und der Bühne. Die zweite Einheit wird von dem Fluoreszenzmikroskop Axiotech Vario, sowie einer *charges-coupled device* (CCD) Kamera gebildet. Die dritte und letzte Einheit bildet die Dokumentationseinheit, die aus Bildschirm und CD-Rekorder gebildet wird. In *Abbildung 16* ist der Aufbau des Arbeitsplatzes dargestellt.

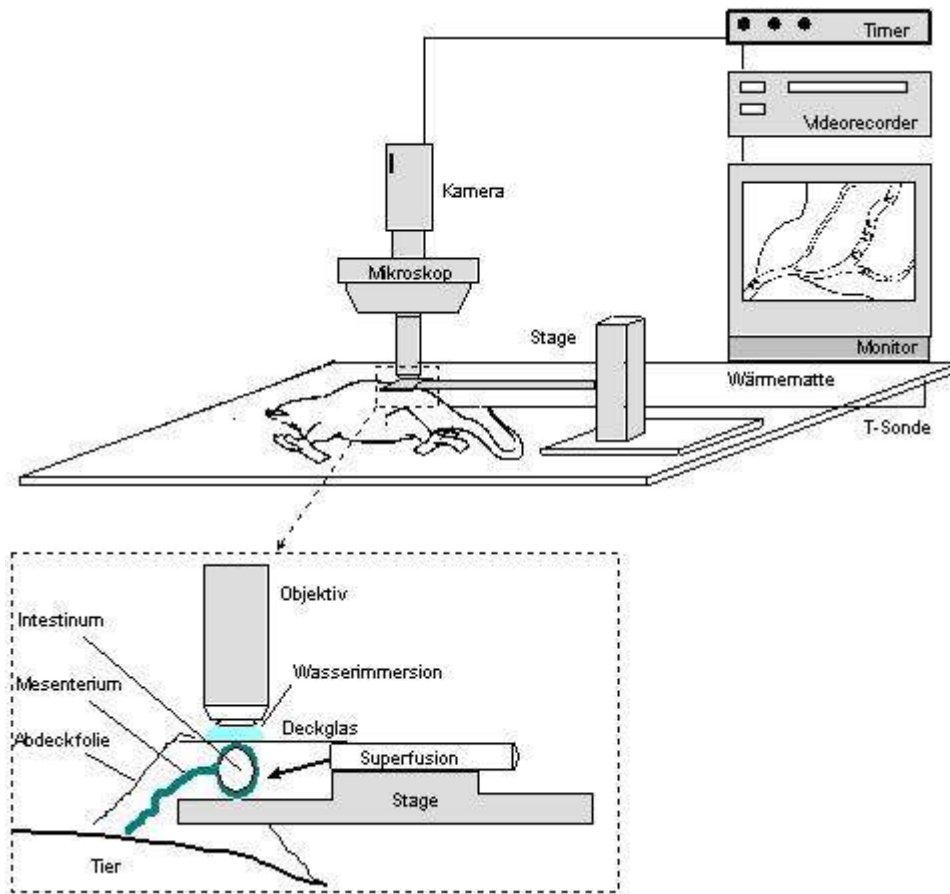


Abbildung 16: Schematischer Aufbau des Arbeitsplatzes für die intravitale Mikroskopie

(modifiziert nach http://edoc.huberlin.de/habilitationen/lehmann-christian-2001-07-17/HTML/lehmann_html_11290526.gif)

3.3.2.3 DCF-Färbung von Thrombozyten

Thrombozyten werden nach der gleichen Methodik wie für die Flusskammerversuche isoliert. Dabei werden pro Maus 7×10^6 Thrombozyten/250 μ l verwendet. Unstimulierte Thrombozyten dienen als Negativkontrolle, mit ADP stimulierte Thrombozyten als Positivkontrolle. Die Versuchsgruppe stellt die mit CyPA stimulierte Thrombozyten dar. Die Zellen werden nach ihrer Isolierung für je eine Stunde mit ADP (40 μ M) oder CyPA (200nM) stimuliert. Anschließend werden die vorinkubierten Thrombozyten mit 60 μ l DCF in einer Konzentration von 2,5 mg/ml für 3 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das Gemisch mit Tyrodes 6,5 auf 4 ml aufgefüllt und bei 425xg für 10 Min. mit Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgenommen. Das Pellet wird in jeweils 250 μ l Tyrodes pH 7,4 und 6,5 resuspendiert und die Thrombozyten können nun für den Versuch verwendet werden.

3.3.2.4 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere werden männliche Wildtypmäuse C57BL/6J herangezogen, die bei Lieferung von Charles River Laboratories fünf Wochen alt sind. Im Alter von sechs bis acht Wochen werden sie für den Versuch verwendet.

Die Tiere werden in Gruppen von bis zu fünf Tieren in Makrolonkäfigen Typ II long gehalten. Als Einstreu wird entkeimtes und entstaubtes Weichholzgranulat aus Espenholz verwendet, welches einmal pro Woche gewechselt wird. Außerdem erhalten die Tiere zur Beschäftigung und zum Nestbau ein Stück sterilisierter Zellstoff. Die Raumtemperatur in der Tierhaltung beträgt 20 bis 23°C bei konstanter Entlüftung, die Luftfeuchtigkeit liegt zwischen 50 und 60%. Wasser und Nahrung stehen stets zur freien Verfügung. Ein Hell-Dunkel Rhythmus wird mit Hilfe einer Beleuchtungsanlage erreicht, wobei bei Helligkeit eine Belichtungsstärke von 50 Lux erreicht wird.

Das vorliegende Versuchsvorhaben wurde vom Regierungspräsidium Tübingen laut Tierschutzgesetz §8 (Neufassung : 15.7.2009) unter der Versuchsnummer M2/09 genehmigt.

3.3.2.5 Durchführung und Aufrechterhaltung der Narkose

Die Tiere sind während des gesamten Eingriffes bis zu ihrer Tötung in Narkose. Um eine chirurgische Toleranz zu erreichen wird zuerst eine Injektionsnarkose bestehend aus 0,05 mg/kg KGW Fentanyl, 5,0 mg/kg KGW Midazolam und 0,5 mg/kg KGW Medetomidin intraperitoneal appliziert (Erhardt 2004).

Die Aufrechterhaltung der Narkose wird mit Hilfe einer Inhalationsnarkose mit 0,5-1,0% igem Isofluran in Sauerstoff über eine Nasenmaske aufrechterhalten. Die Tiefe der Narkose wird durch die Bestimmung der Atem- und Pulsfrequenz, des Atemtypus und des Fehlen des Flexorreflexes überprüft. Das Auskühlen des Tieres wird mit Hilfe einer Wärmematte verhindert.

3.3.2.6 Vorbereitung der Mäuse für die Intravitalmikroskopie

Die anästhesierten Tiere werden mit Hilfe von Klebestreifen in Rückenlage auf der Wärmematte fixiert. Eine Nackenstütze sorgt für eine gute Lagerung von Kopf und Hals. Das Austrocknen der Augen wird mit Hilfe einer Augensalbe verhindert (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe).

Die Präparation des Tieres erfolgt unter dem Stereomikroskop.

Eine Kaltlichtquelle sorgt für die optimale Ausleuchtung des Operationsfeldes.

Zunächst wird die ventrale Halsseite des Tieres mit Hilfe von Enthaarungscreme enthaart und anschließend desinfiziert.

Als erster Schritt erfolgt das Freipräparieren der Vena jugularis sinistra. Dazu wird ein ca. 1 cm langer Schnitt in der Medianen vom Unterkiefer bis auf Höhe des Brustbeines ausgeführt. Die Speicheldrüsen werden stumpf aus dem umliegenden Fettgewebe freipräpariert, anliegende kleine Gefäße werden kauterisiert, größere ligiert. Zum Legen des Jugulariskatheters, wird die Vena jugularis sinistra zunächst mit Hilfe einer Schlaufe fixiert. Es wird nun eine kleine Inzision vorgenommen und der Katheter in das Gefäß eingeführt. Durch anschließendes Festanziehen der Schlaufe wird der Katheter fixiert. Die korrekte Lage wird durch Spülung mit isotoner Kochsalzlösung überprüft und ist in *Abbildung 17* dargestellt.

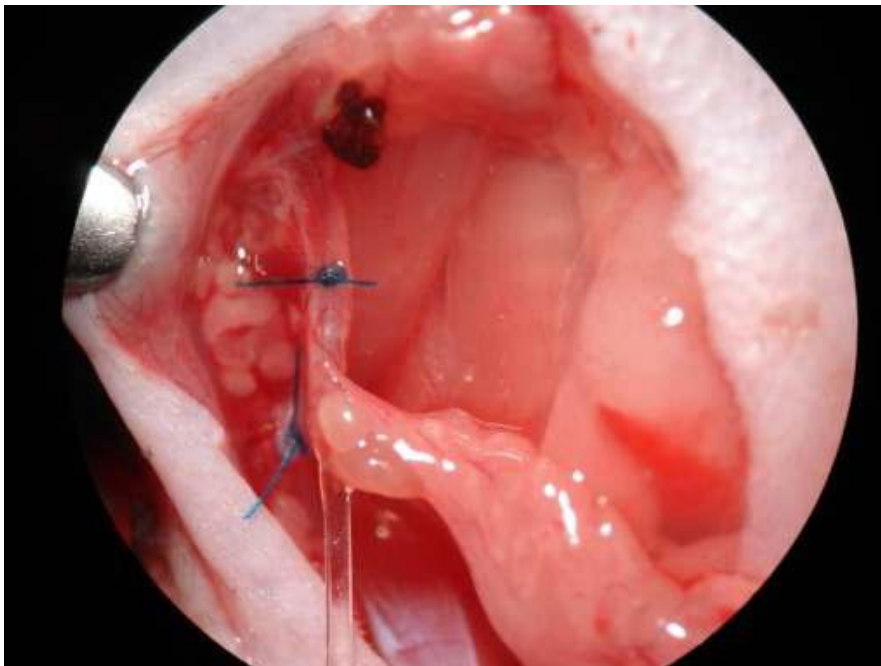


Abbildung 17: Korrekte Lage des Vena Jugularis-Katheters

3.3.2.7 Vorbereitung des Darmes für die Aufnahmen

Nachdem der Katheter in der Vena Jugularis korrekt liegt, erfolgt die Präparation des Darmes. Dazu wird in der Linea alba die Bauchhöhle eröffnet und der Dünndarm (Jejunum) aus der Bauchhöhle vorverlagert. Ein Darmsegment wird auf eine selbsthergestellte Styroporknetbühne gelegt und mit einem Objektträger abgedeckt. Während des gesamten Versuches wird der Darm mit Hilfe von warmer Ringerinjektionslösung befeuchtet um ein Austrocknen zu verhindern.

Die Maus wird nun unter das Mikroskop gelegt und die DCF gefärbten Zellen werden über den Katheter appliziert. *Abbildung 18* zeigt den ausgelagerten Dünndarm auf der Styroporknetbühne.

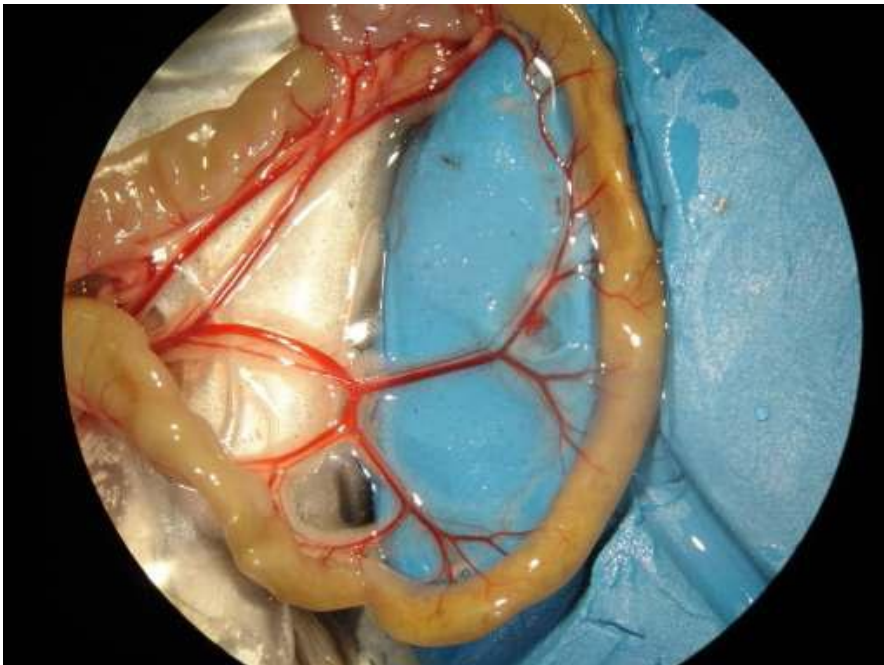


Abbildung 18: Mikroskopische Darstellung eines ausgelagerten Darmsegmentes einer Maus

3.3.2.8 Durchführung des Versuches

Die Aufnahmen erfolgen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes mit Wasserimmersion, um einen guten Gewebekontakt herzustellen. Es wird ein 20er Objektiv verwendet.

Es erfolgen vier Aufnahmen von jeweils 30 Sekunden von Arteriolen und Venolen vor Ischämie, sowie 5, 10, 30, 60 und 90 Min. nach Reperfusion. Die Ischämiedauer beträgt eine Stunde und wird durch Ligaturen der versorgenden Mesenterialgefäße, sowie durch Ligatur der beiden Ende des betroffenen Darmsegmentes erreicht (siehe *Abbildung 19*).

Nach einer Stunde werden die Ligaturen gelöst und die Reperfusion setzt ein. Um den Kreislauf des Tieres zu unterstützen wird das Tier mit einer Ringerlaktatlösung infundiert.

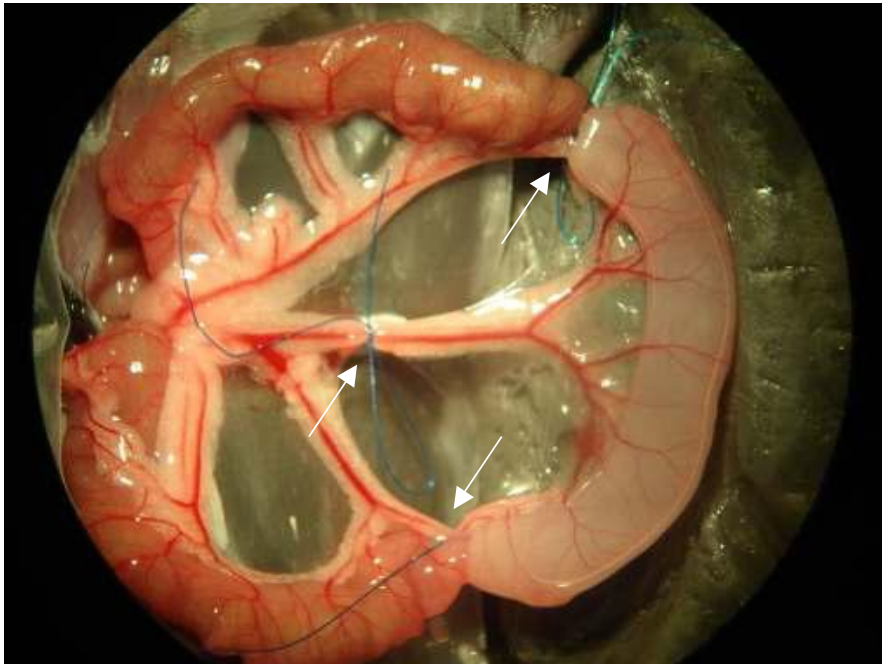


Abbildung 19: Mikroskopische Darstellung eines ausgelagerten Darmsegmentes einer Maus während der Ischämiephase mit Ligatur der Mesenterialgefäße und der betroffenen Darmsegmente

3.3.2.9 Auswertung

Für jedes Tier wird ein Datenblatt angelegt in dem Stamm, Geschlecht, Ohrmarkennummer, Geburtsdatum, Fütterung und Versuchsdatum eingetragen sind. Ebenso können hier der Verlauf des Versuches, sowie die einzelnen Sequenzen der Aufnahme eingetragen werden. Es erfolgt auch ein Vermerk ob Organe entnommen wurden.

Mit Hilfe des Datenblattes lassen sich die Videosequenzen den jeweiligen Tieren zuordnen. Die Auswertung erfolgt in einem dunklen Raum mit Hilfe von vorgefertigten Schablonen. Dabei wird der Durchschnitt der Gefäße bestimmt, die Auszählung der Zellen erfolgt mit Hilfe eines Auszählungsfensters, das einer Größe von 150 μm Länge und 100 μm Breite entspricht.

Es werden adhärente, transient-adhärente und rollende Thrombozyten gezählt. Dabei gelten solche Zellen als adhärent, die für mindestens 15 Sekunden am Endothel haften. Transient-adhärente Zellen sind diejenigen, die weniger als 15 Sekunden am Endothel haften und

rollende diejenigen, die die gesamte Strecke des Auswertungsfensters entlang rollen. Die Werte werden in die Tabellenvorlage im Datenblatt eingetragen.

3.3.2.10 Statistische Auswertung

Ein unverbundener Test dient zur statistischen Berechnung. Dabei werden in Grafiken die Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Mittelwerte werden mit dem unabhängigen t-Test verglichen und auf ihre Signifikanz hin überprüft. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wird als signifikant definiert und ist in den Schaubildern mit einem Stern (*) markiert. Die statistischen Berechnungen erfolgen mit dem Programm SPSS 15.1.1 (SPSS Inc, Chicago, USA) für Windows. Für die statistische Auswertung des *in vivo* Versuches wird das Programm Graph Pad Prism 4.03 für Windows verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Flusskammerexperimente

4.1.1 Cyclophilin A bzw. Cyclophilin B führt bei aktivierten humanen Endothelzellen (HUVEC) zu gesteigertem *Rolling* und zur Adhäsion von Thrombozyten

Humane Endothelzellen, die aus der Nabelschnurvene isoliert wurden (HUVEC), werden auf *cover slips* beschichtet, bis sie konfluent gewachsen sind. Sechs Stunden vor Versuchsbeginn werden sie mit TNF- α in einer Konzentration von 50 ng/ml und IFN- γ in einer Konzentration von 20 ng/ml aktiviert. Thrombozyten werden isoliert und mit Hilfe von CyPA oder CyPB in einer Konzentration von 100 nM für 30 Min. stimuliert. Mit Hilfe der Flusskammer werden die Blutplättchen in einer Konzentration von 5×10^7 /ml über die konfluenten, aktivierten HUVECs perfundiert.

Es zeigt sich, dass CyPA oder CyPB das *Rolling* und die Adhäsion von Thrombozyten signifikant steigert (*Abbildung 20*).

Ergebnisse

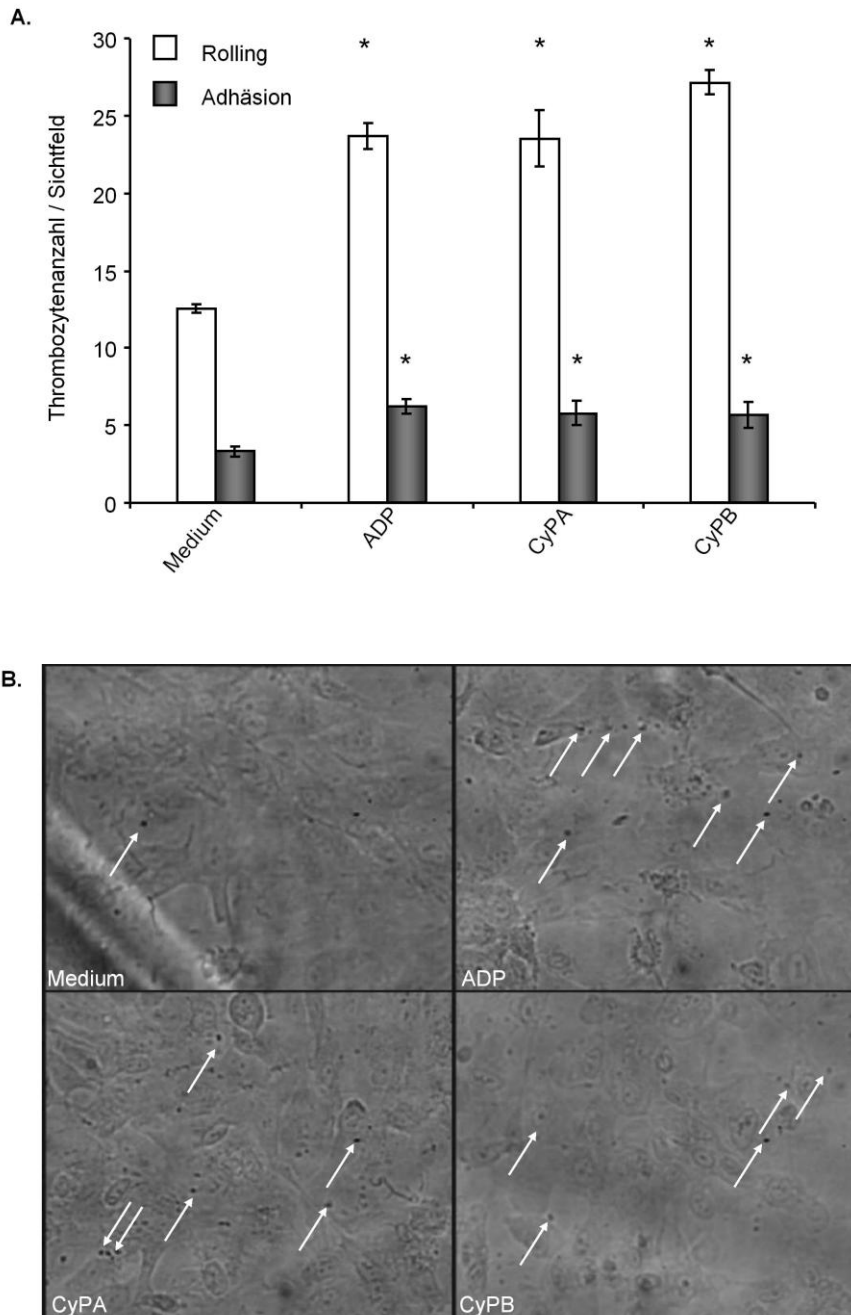


Abbildung 20: CyPA oder CyPB induziert bei aktivierten humanen Endothelzellen vermehrtes thrombozytäres **Rolling** und **Adhäsion**

Isolierte humane Thrombozyten werden mit Medium (Negativkontrolle), ADP (10 μ M, Positivkontrolle), sowie CyPA (100 nM) und CyPB (100 nM) für 30 Min. bei 37°C vorbehandelt, gewaschen und anschließend über mit TNF- α (50 ng/ml) und IFN- γ (20 ng/ml) für sechs Stunden vorstimulierte humane konfluente Endothelzellen (HUVEC) perfundiert und

- Rolling* sowie Adhäsion statistisch quantifiziert (Flusskammer n=5, *p<0,05 im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle).
- Sowie repräsentative Aufnahmen bei einer 40er Vergrößerung angefertigt. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Thrombozyten stellen dabei eine repräsentative Auswahl an adhärenenten Thrombozyten auf aktivierten HUVECs dar.

4.1.2 Inhibition des Cyclophilin A- und Cyclophilin B- vermittelten Adhäsionsprozesses

Konfluente HUVECs werden mit TNF- α und IFN- γ sechs Stunden vor Versuchsbeginn stimuliert. Frisch isolierte Thrombozyten werden mit Hilfe von anti-CD147 in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ für 15 Min. blockiert. Anschließend wird für 30 Min. mit CyPA oder CyPB in einer Konzentration von 100 nM inkubiert. NIM811 wird für 15 Min. mit CyPA oder CyPB und anschließend für 30 Min. mit den Thrombozyten inkubiert. Danach werden die Thrombozyten mit Hilfe der Flusskammer über die aktivierten Endothelzellen in bekannter Konzentration perfundiert.

Es zeigt sich, dass die Stimulation von CyPA (*Abbildung 21*) oder CyPB (*Abbildung 22*) mit Hilfe dieser Antikörper bzw. des Cyclosporin-Analogons, NIM811, signifikant blockiert wird.

Ergebnisse

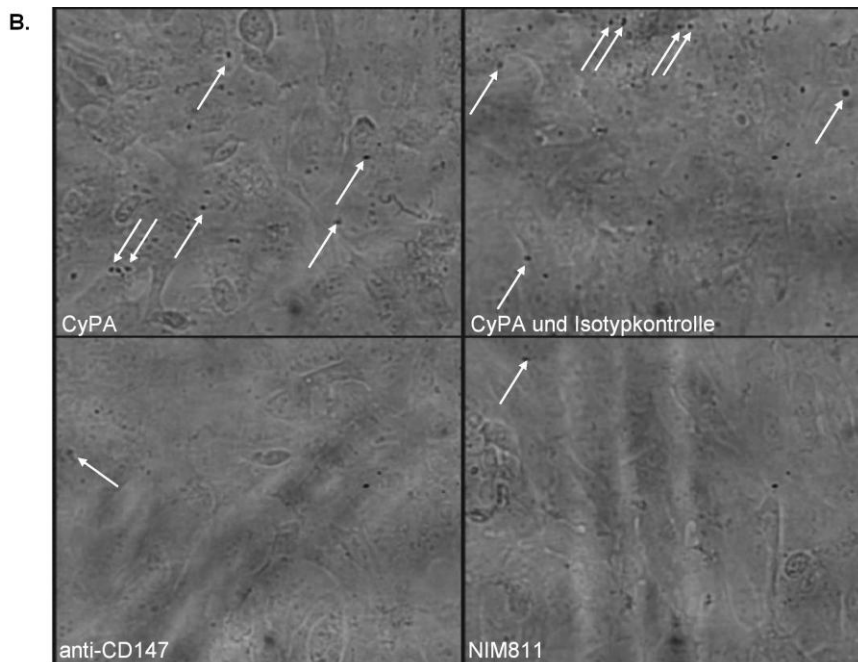
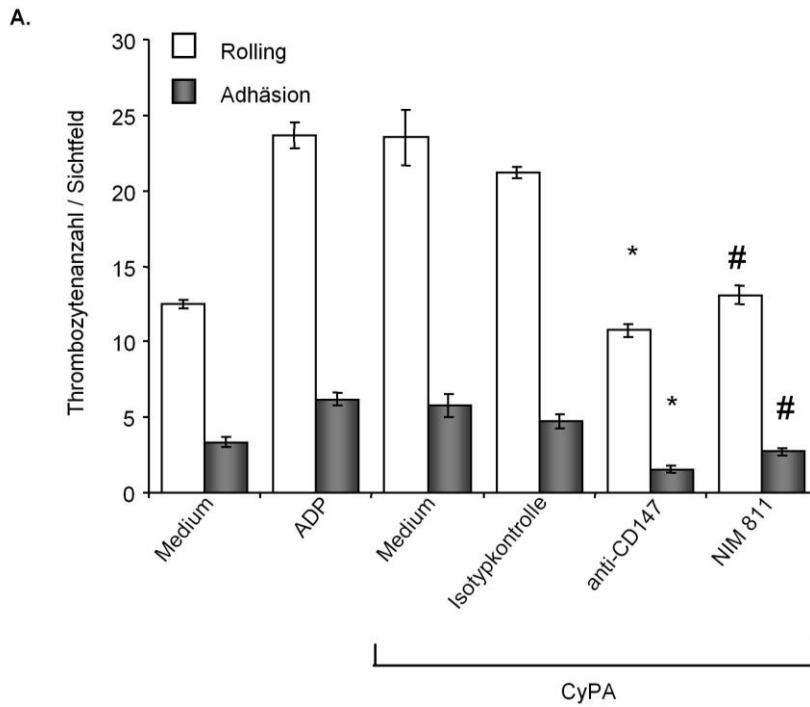


Abbildung 21: CyPA induziert thrombozytäres *Rolling* und Adhäsion an humane Endothelzellen (HUVEC) über CyPA-CD147 Interaktion

Isolierte humane Thrombozyten werden zunächst mit anti-CD147 (20 µg/ml) bzw. CyPA mit NIM811 (10 µM) für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend werden isolierte Thrombozyten mit Medium (Negativkontrolle), ADP (10 µM, Positivkontrolle), sowie CyPA (100 nM) für 30 Min. bei 37°C vorbehandelt, gewaschen und anschließend über mit TNF-α (50 ng/ml) und IFN-γ (20 ng/ml) für sechs Stunden vorstimulierte humane konfluente Endothelzellen (HUVEC) perfundiert und

- Rolling* sowie Adhäsion statistisch quantifiziert (Flusskammer n=5, *p<0,05 im Vergleich zur Isotypkontrolle, # im Vergleich zum stimulierten Medium).
- Sowie repräsentative Aufnahmen bei einer 40er Vergrößerung angefertigt. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Thrombozyten stellen dabei eine repräsentative Auswahl an adhärenenten Thrombozyten auf aktivierten HUVECs dar.

Ergebnisse

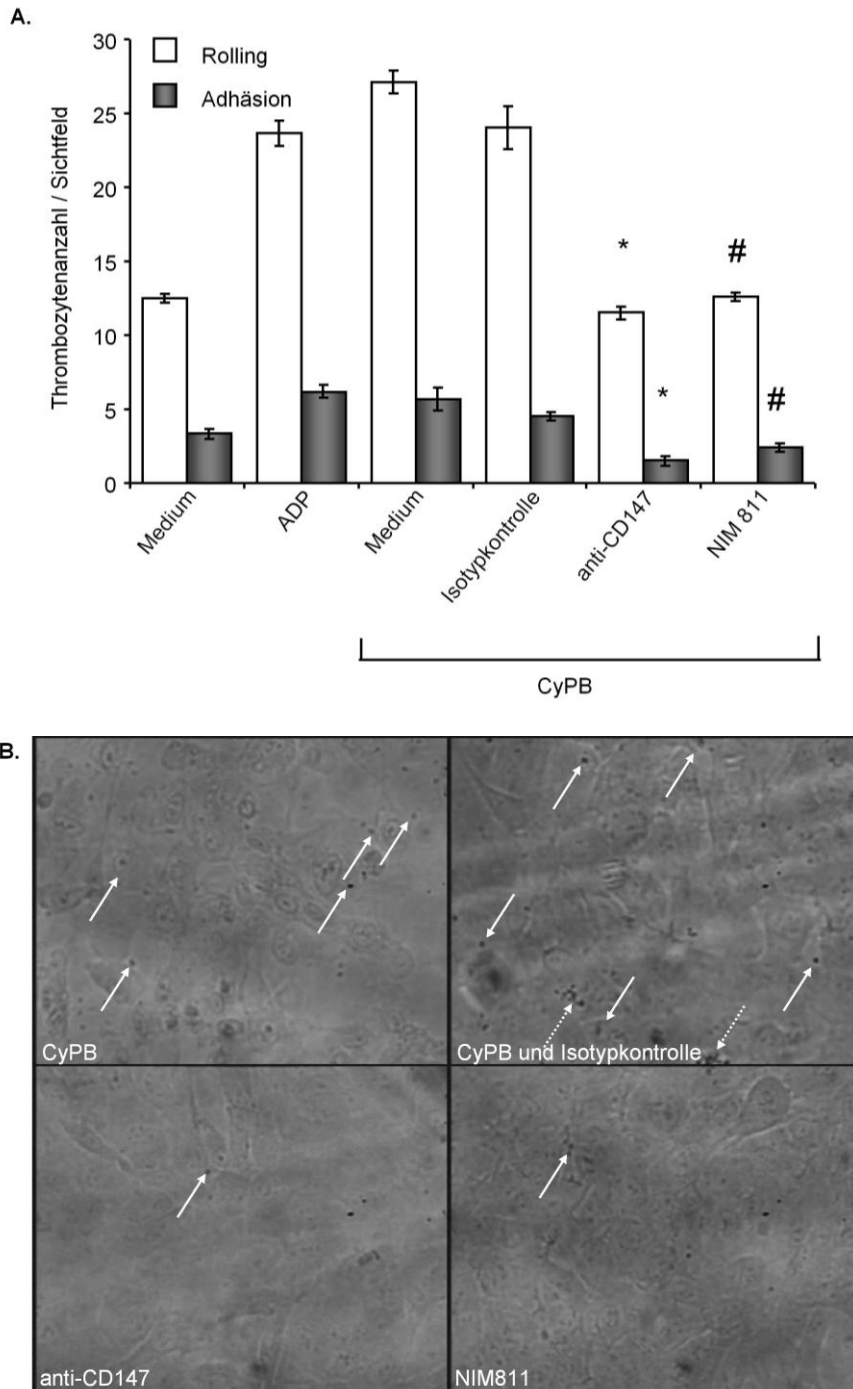


Abbildung 22: CyPB induziert thrombozytäres *Rolling* und Adhäsion an humane Endothelzellen (HUVEC) über CyPB-CD147 Interaktion

Isolierte humane Thrombozyten werden zunächst mit anti-CD147 (20 µg/ml) bzw. CyPB mit NIM811 (10 µM) für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend werden isolierte Thrombozyten mit Medium (Negativkontrolle), ADP (10 µM, Positivkontrolle), sowie CyPB (100 nM) für 30 Min. bei 37°C vorbehandelt, gewaschen und anschließend über mit TNF-α (50 ng/ml) und IFN-γ (20 ng/ml) für sechs Stunden vorstimulierte humane konfluente Endothelzellen (HUVEC) perfundiert und

- Rolling* sowie Adhäsion statistisch quantifiziert (Flusskammer n=5, *p<0,05 im Vergleich zur Isotypkontrolle, # im Vergleich zum stimulierten Medium).
- Sowie repräsentative Aufnahmen bei einer 40er Vergrößerung angefertigt. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Thrombozyten stellen dabei eine repräsentative Auswahl an adhärenenten Thrombozyten auf aktivierten HUVECs dar.

4.1.3 Inhibition des Cyclophilin A- und Cyclophilin B- vermittelten Adhäsionsprozesses mit Hilfe von anti-P-Selektin Glykoprotein Ligand 1

Frisch isolierte Thrombozyten werden mit anti-P-Selektin Glykoprotein Ligand 1 (PSGL-1) in einer Konzentration von 20 µg/ml für 15 Min. vorinkubiert und anschließend mit CyPA (*Abbildung 23*) oder CyPB (*Abbildung 24*) in einer Konzentration von 100 nM für 30 Min. inkubiert. Die behandelten Thrombozyten werden in einer Konzentration von 5×10^7 /ml eingestellt und über den aktivierten Endothelrasen mit Hilfe der Flusskammer perfundiert.

Es zeigt sich, dass bei Thrombozyten, die mit anti-PSGL-1 vorbehandelt wurden, das *Rolling* als auch die Adhäsion für Thrombozyten signifikant reduziert ist.

Ergebnisse

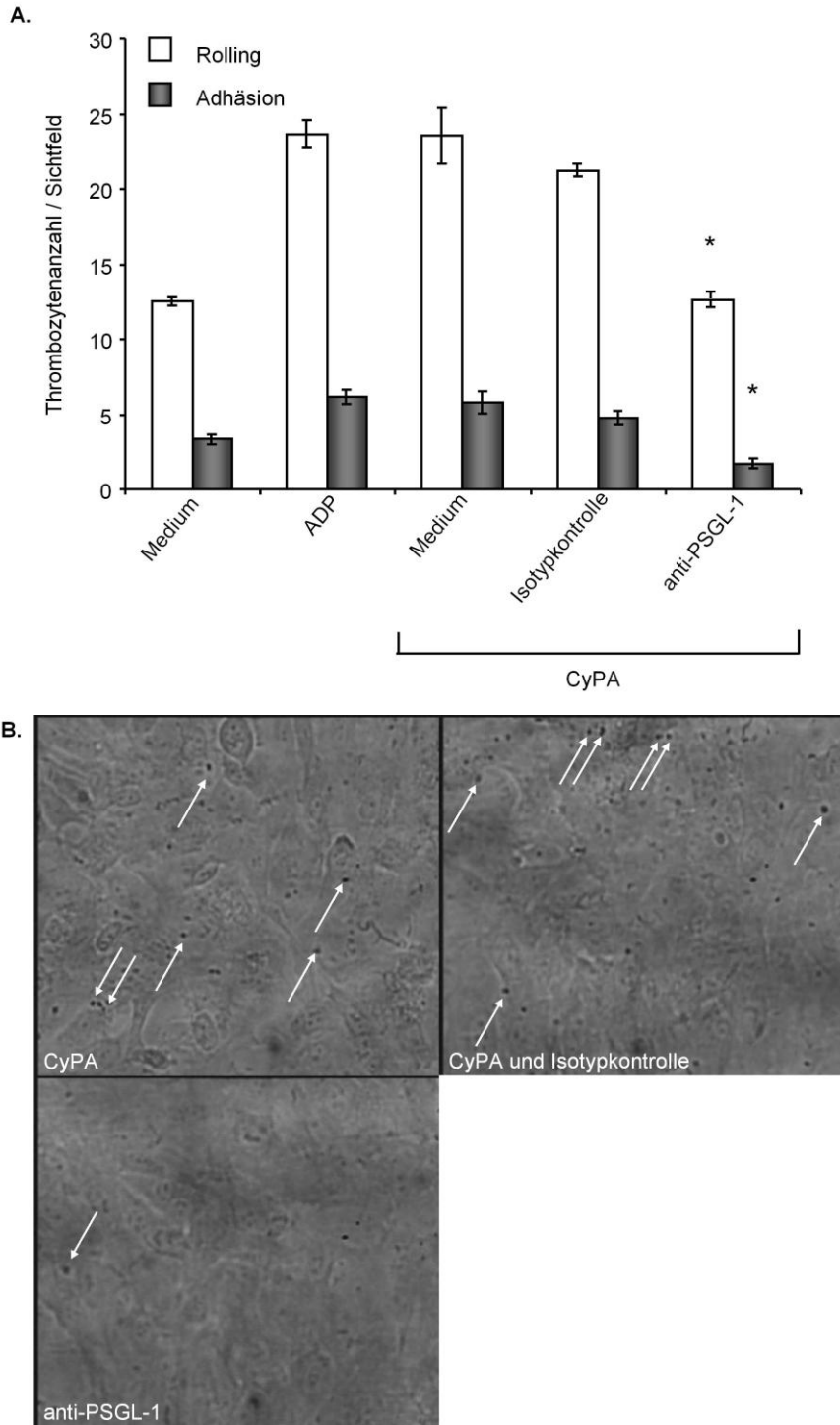


Abbildung 23: Thrombozytäres *Rolling*, welches durch CyPA-CD147 Interaktion induziert wird, wird über PSGL-1 vermittelt

Isolierte humane Thrombozyten werden zunächst mit anti-PSGL-1 (20 µg/ml) für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend werden isolierte Thrombozyten mit Medium (Negativkontrolle), ADP (10 µM, Positivkontrolle), sowie CyPA (100 nM) für 30 Min. bei 37°C vorbehandelt, gewaschen und anschließend über mit TNF-α (50 ng/ml) und IFN-γ (20 ng/ml) für sechs Stunden vorstimulierte humane konfluente Endothelzellen (HUVEC) perfundiert und

- Rolling* sowie Adhäsion statistisch quantifiziert (Flusskammer n=5, *p<0,05 im Vergleich zur Isotypkontrolle).
- Sowie repräsentative Aufnahmen bei einer 40er Vergrößerung angefertigt. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Thrombozyten stellen dabei eine repräsentative Auswahl an adhärenenten Thrombozyten auf aktivierten HUVECs dar.

Ergebnisse

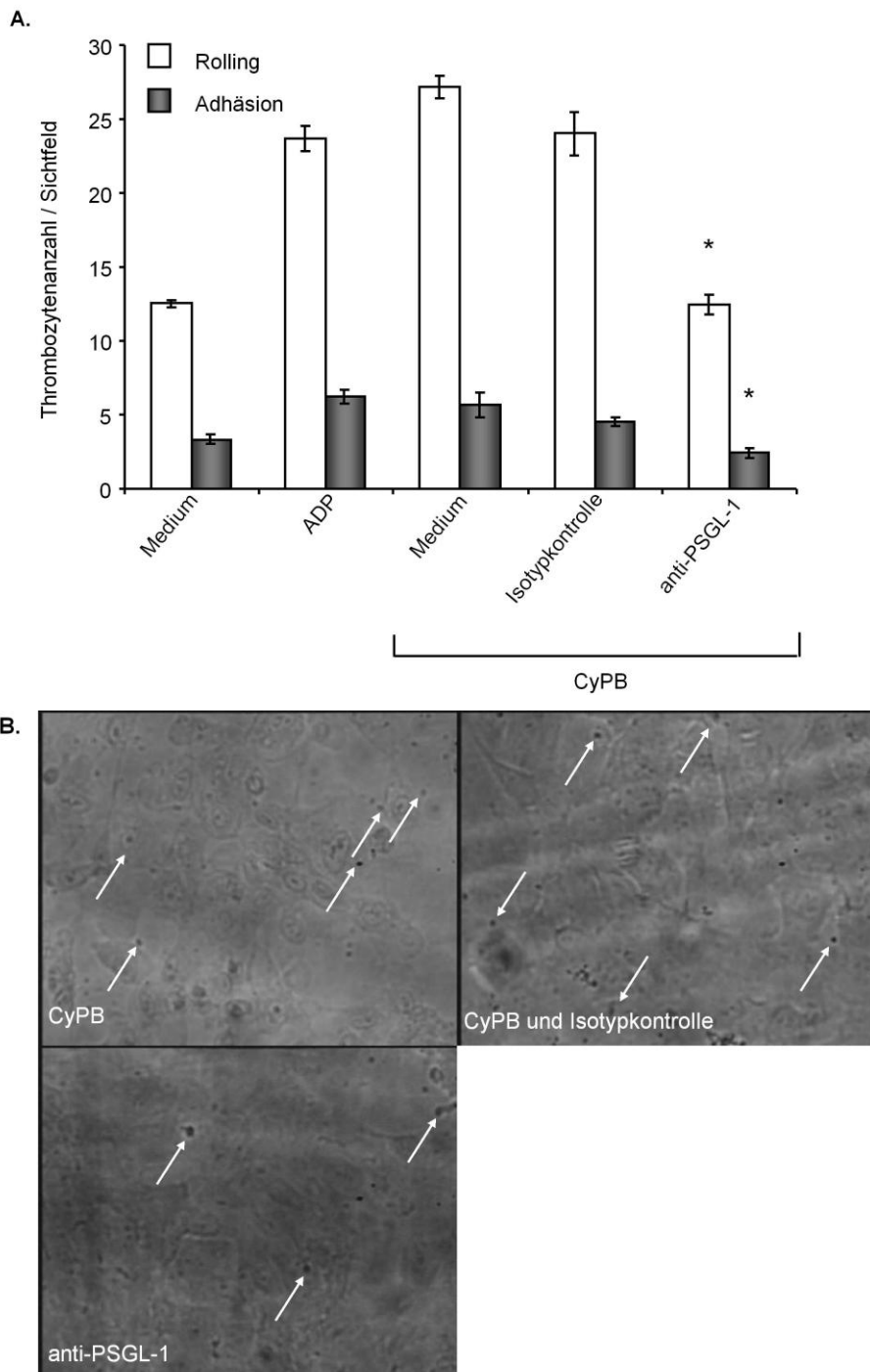


Abbildung 24: Thrombozytäres *Rolling*, welches durch CyPB-CD147 Interaktion induziert wird, wird über PSGL-1 vermittelt

Isolierte humane Thrombozyten werden zunächst mit anti-PSGL-1 (20 µg/ml) für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend werden isolierte Thrombozyten mit Medium (Negativkontrolle), ADP (10 µM, Positivkontrolle), sowie CyPB (100 nM) für 30 Min. bei 37°C vorbehandelt, gewaschen und anschließend über mit TNF-α (50 ng/ml) und IFN-γ (20 ng/ml) für sechs Stunden vorstimulierte humane konfluente Endothelzellen (HUVEC) perfundiert und

- Rolling* sowie Adhäsion statistisch quantifiziert (Flusskammer n=5, *p<0,05 im Vergleich zur Isotypkontrolle).
- Sowie repräsentative Aufnahmen bei einer 40er Vergrößerung angefertigt. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Thrombozyten stellen dabei eine repräsentative Auswahl an adhärenenten Thrombozyten auf aktivierten HUVECs dar.

4.1.4 Cyclophilin A bzw. Cyclophilin B induzieren vermehrtes *Rolling* und Adhäsion auf Kollagen

Thrombozyten können nicht nur mit Endothelzellen, sondern auch mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix interagieren, insbesondere Kollagen steht hier im Vordergrund. Es stellt sich die Frage, ob CyPA- bzw. CyPB- stimulierte Thrombozyten auch auf Kollagen eine vermehrte Adhäsivität unter arteriellen Flussbedingungen zeigen.

Dazu werden *cover slips* mit Kollagen in einer Konzentration von 10 µg/ml über Nacht bei 4°C bzw. zwei Stunden im Brutschrank beschichtet. Frisch isolierte Thrombozyten werden mit Hilfe von CyPA oder CyPB für 30 Min. in einer Konzentration von 100 nM stimuliert und anschließend in einer Konzentration von 5×10^7 /ml in der Flusskammer über Kollagen perfundiert.

Es zeigt sich, dass *Rolling* und Adhäsion der Thrombozyten signifikant erhöht ist (*Abbildung 25*).

Ergebnisse

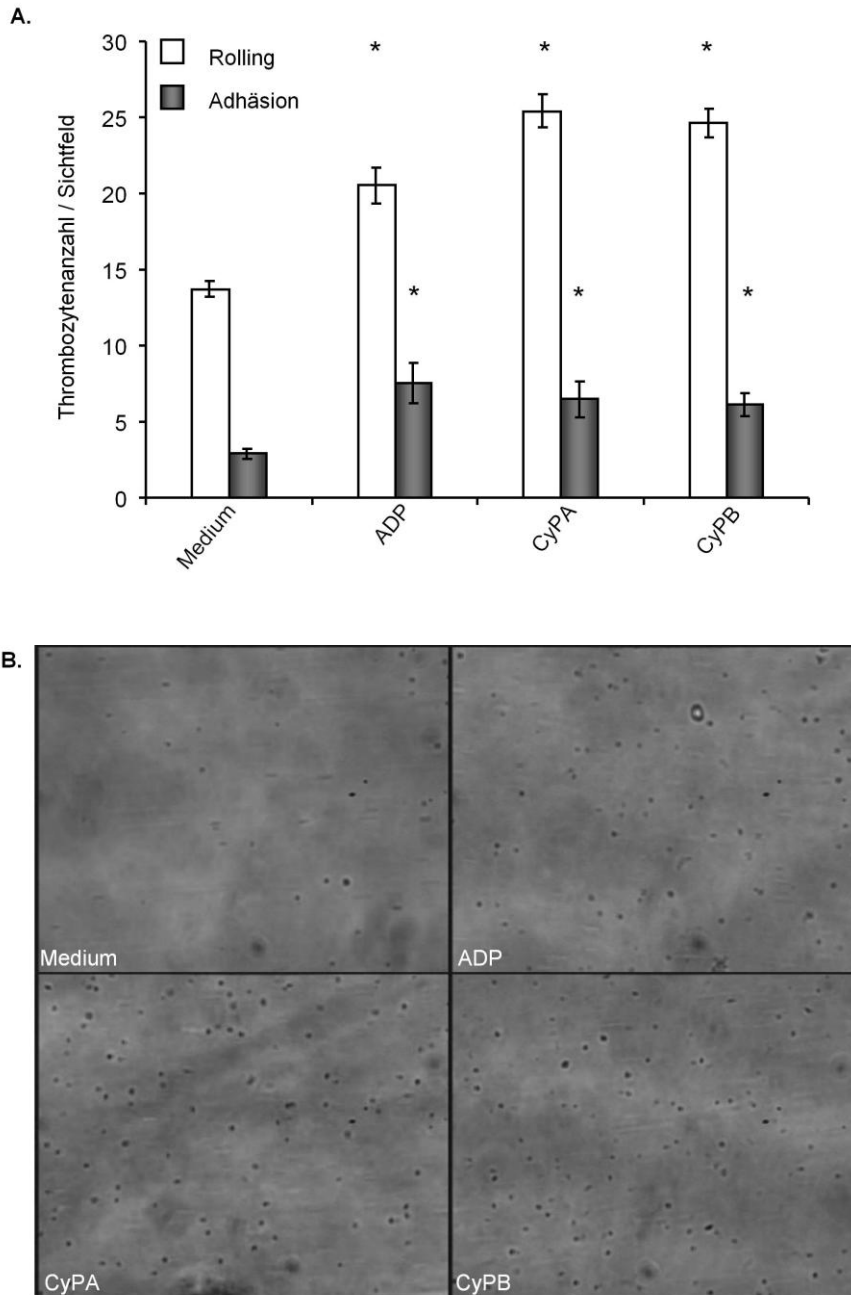


Abbildung 25: CyPA oder CyPB induziert bei humanen Thrombozyten vermehrtes *Rolling* und Adhäsion auf Kollagen

Isolierte humane Thrombozyten werden mit Medium, ADP (10 μ M, Positivkontrolle), sowie CyPA (100 nM) und CyPB (100 nM) für 30 Min. bei 37°C vorbehandelt, gewaschen und anschließend über mit Kollagen (10 μ g/ml bei 4°C über Nacht oder für zwei Stunden bei 37°C) perfundiert und

- Rolling* sowie Adhäsion statistisch quantifiziert (Flusskammer n=5, *p<0,05 im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle).
- Sowie repräsentative Aufnahmen bei einer 40er Vergrößerung angefertigt. Auf eine Darstellung der adhärenenten Thrombozyten mit Pfeilen wird verzichtet, da die adhärenenten Zellen auf Kollagen eindeutig zu erkennen sind.

4.1.5 Cyclophilin A und Cyclophilin B induzieren Thrombozytenadhäsion über CD147 (EMMPRIN)

Frisch isolierte Thrombozyten werden vor der Stimulation mit 100 nM CyPA bzw. CyPB mit Hilfe von anti-CD147 in einer Konzentration von 20 µg/ml blockiert. Für die Inkubation mit NIM811 wird dieses in einer Konzentration von 10 µM mit CyPA (*Abbildung 26*) bzw. CyPB (*Abbildung 27*) für 15 Min. und anschließend für 30 Min. mit den Thrombozyten inkubiert. Die Thrombozyten werden auf eine Konzentration von 5×10^7 /ml eingestellt und über die mit Kollagen beschichteten *cover slips* perfundiert.

Wie in *Abbildung 26* dargestellt, führt die Anwesenheit von anti-CD147 zur kompletten Inhibition der CyPA-induzierten Adhäsivität an Kollagen.

Ergebnisse

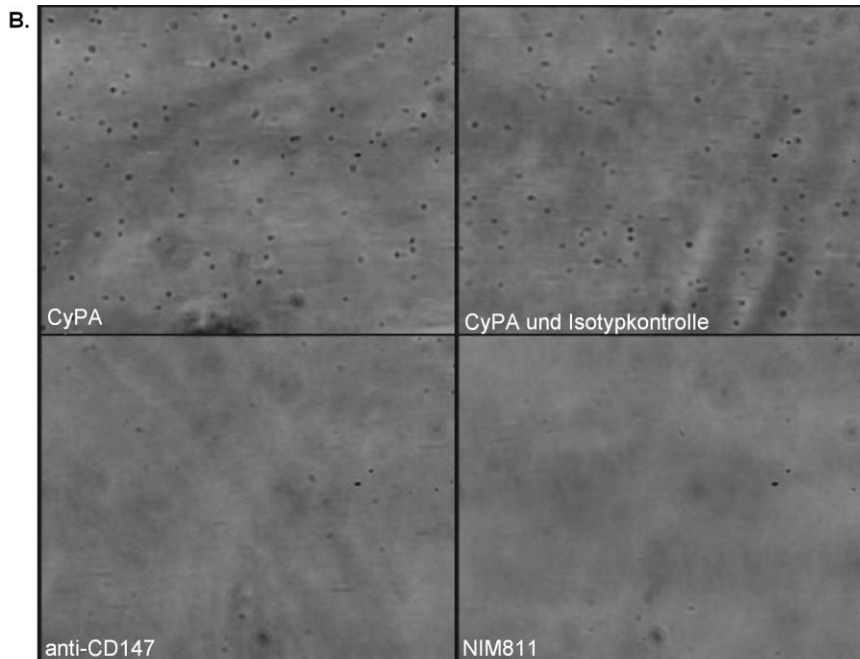
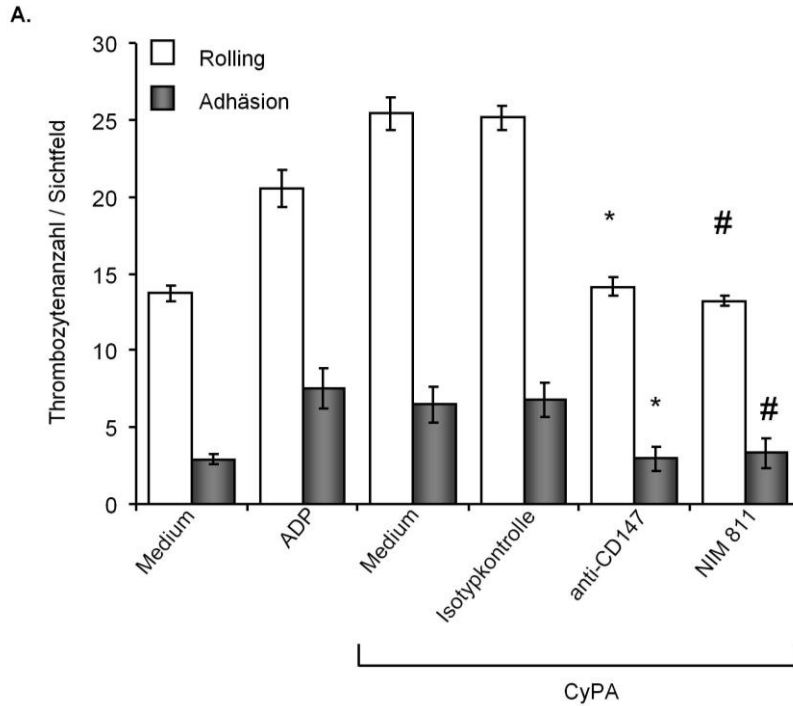


Abbildung 26 : CyPA induziert thrombozytäres *Rolling* und Adhäsion über CyPA-CD147 Interaktion

Isolierte humane Thrombozyten werden zunächst mit anti-CD147 (20 µg/ml) bzw. CyPA mit NIM811 (10 µM) für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend werden isolierte Thrombozyten mit Medium, ADP (10 µM, Positivkontrolle), sowie CyPA (100 nM) für 30 Min. bei 37°C vorbehandelt, gewaschen und anschließend über mit Kollagen (10 µg/ml bei 4°C über Nacht oder für zwei Stunden bei 37°C) perfundiert und

- Rolling* sowie Adhäsion statistisch quantifiziert (Flusskammer n=5, *p<0,05 im Vergleich zur Isotypkontrolle, # im Vergleich zum stimulierten Medium).
- Sowie repräsentative Aufnahmen bei einer 40er Vergrößerung angefertigt. Auf eine Darstellung der adhärenenten Thrombozyten mit Pfeilen wird verzichtet, da die adhärenenten Zellen auf Kollagen eindeutig zu erkennen sind.

Ergebnisse

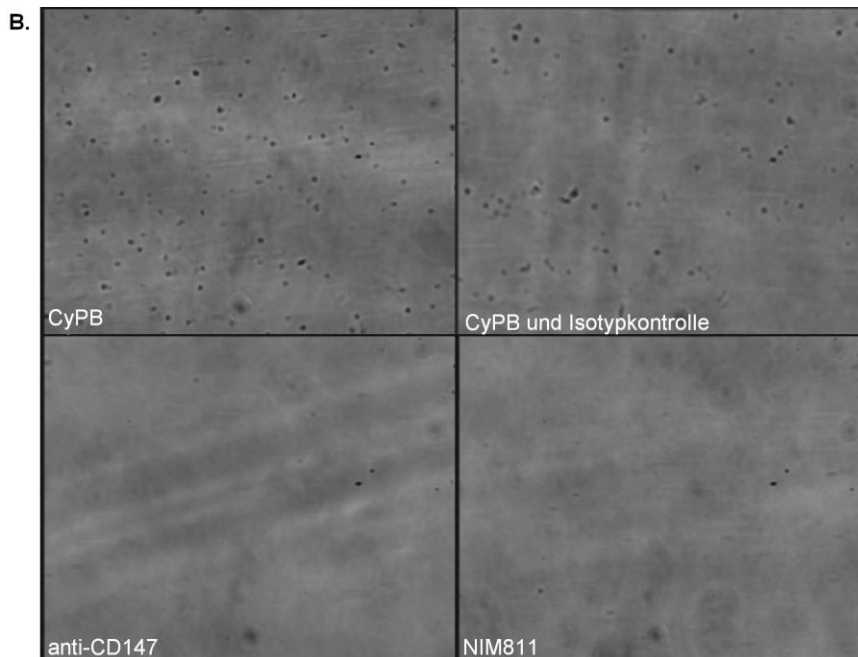
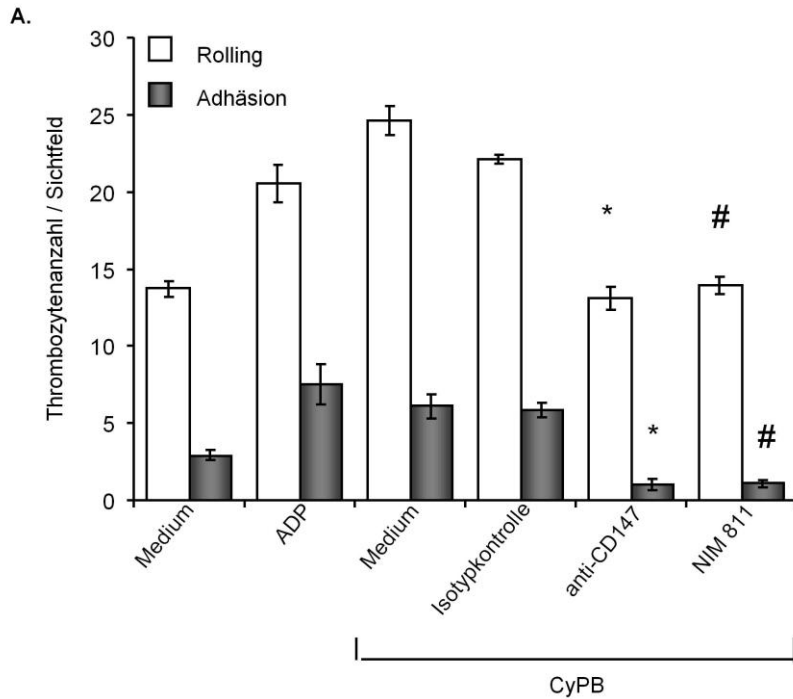


Abbildung 27 : CyPB induziert thrombozytäres *Rolling* und Adhäsion über CyPB-CD147 Interaktion

Isolierte humane Thrombozyten werden zunächst mit anti-CD147 (20 µg/ml) bzw. CyPB mit NIM811 (10 µM) für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend werden isolierte Thrombozyten mit Medium, ADP (10 µM, Positivkontrolle), sowie CyPB (100 nM) für 30 Min. bei 37°C vorbehandelt, gewaschen und anschließend über mit Kollagen (10 µg/ml bei 4°C über Nacht oder für zwei Stunden bei 37°C) perfundiert und

- Rolling* sowie Adhäsion statistisch quantifiziert (Flusskammer n=5, *p<0,05 im Vergleich zur Isotypkontrolle, # im Vergleich zum stimulierten Medium).
- Sowie repräsentative Aufnahmen bei einer 40er Vergrößerung angefertigt. Auf eine Darstellung der adhärenenten Thrombozyten mit Pfeilen wird verzichtet, da die adhärenenten Zellen auf Kollagen eindeutig zu erkennen sind.

Auch bei diesem Versuchsansatz zeigt sich, dass Thrombozyten, die mit CyPA bzw. CyPB inkubiert wurden, vermehrt mit Kollagen in Kontakt treten. Dabei ist es wichtig zu klären, welcher Rezeptor die Interaktion von Thrombozyten mit Kollagen vermittelt und ob es durch die Blockierung dieses Rezeptors zu einer verringerten Interaktion kommt.

4.1.6 Glykoprotein VI ist in die verstärkte Adhäsivität von Thrombozyten auf Kollagen nach Cyclophilin A bzw. Cyclophilin B Stimulation involviert

Die *cover slips* werden wie oben beschrieben über Nacht bei 4°C oder für zwei Stunden im Brutschrank mit Kollagen beschichtet. Anschließend werden unspezifische Bindungen mit Hilfe von 2 %igem BSA blockiert und über Nacht mit GPVI-Fc in einer Konzentration von 20 µg/ml inkubiert. Frisch isolierte Thrombozyten werden mit Hilfe von CyPA oder CyPB in einer Konzentration von 100 nM für 30 Min. stimuliert, auf eine Konzentration von 5×10^7 /ml eingestellt und anschließend über die beschichteten *cover slips* perfundiert.

Es zeigt sich, dass GPVI-Fc signifikant die durch CyPA (*Abbildung 28*) oder CyPB (*Abbildung 29*) hervorgerufenen Effekte minimiert.

Es war kein vermehrtes *Rolling* und Adhäsion zu beobachten.

Ergebnisse

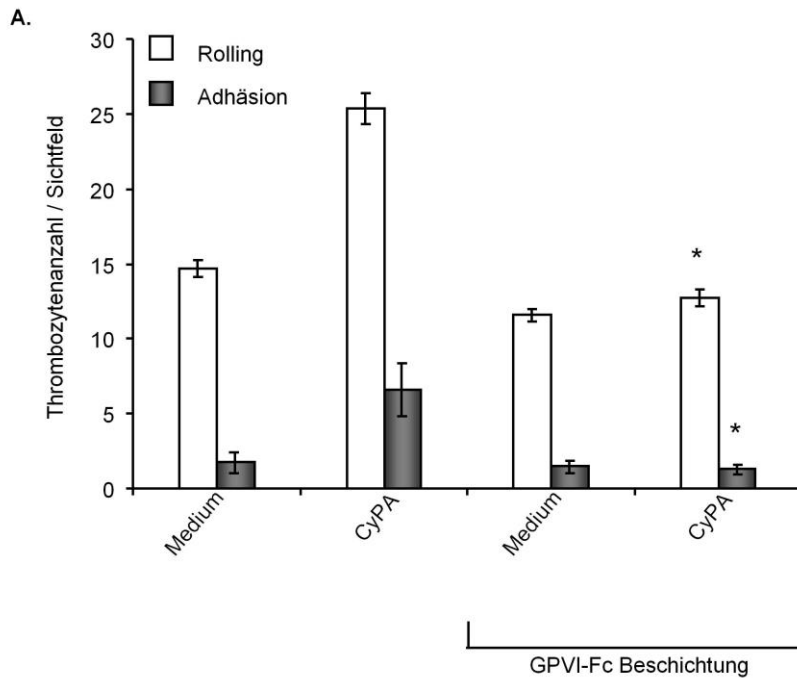


Abbildung 28: Mit Kollagen und GPVI-Fc beschichteten *cover slips* blockieren die durch CyPA-CD147 induziertes *Rolling* und *Adhäsion*

Cover slips werden zunächst mit Kollagen (10 µg/ml bei 4°C über Nacht oder für zwei Stunden bei 37°C) beschichtet und anschließend die Bindungsstellen von Kollagen mit GPVI-Fc (20 µg/ml, über Nacht) blockiert.

Isolierte humane Thrombozyten werden mit Medium (Negativkontrolle) oder CyPA (100 nM) für 30 Min. bei 37°C vorbehandelt, gewaschen und anschließend über die mit Kollagen und mit GPVI-Fc blockierten *cover slips* perfundiert und

- A. *Rolling* sowie *Adhäsion* für CyPA statistisch quantifiziert (Flusskammer n=5, *p<0,05 im Vergleich zur stimulierten Kontrolle).

Ergebnisse

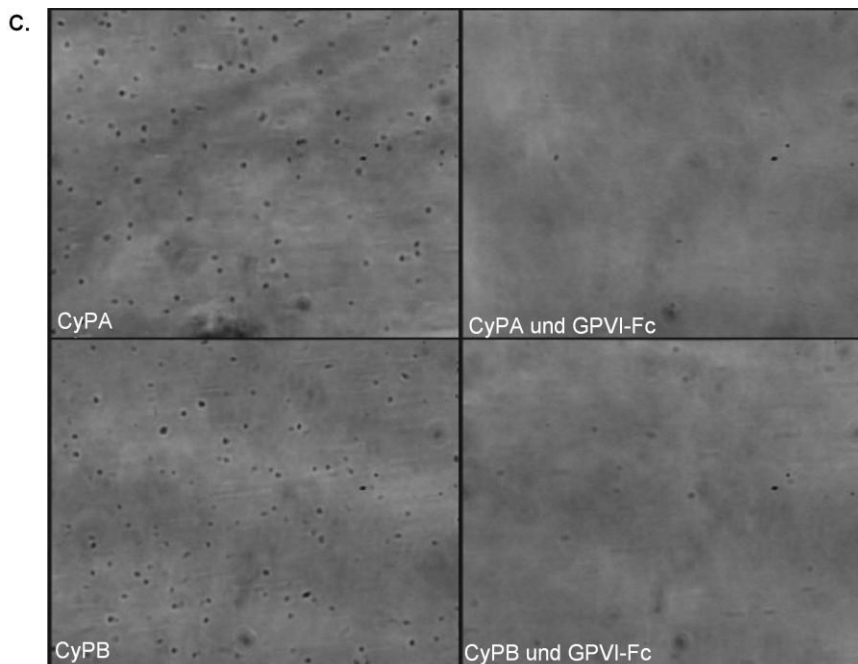
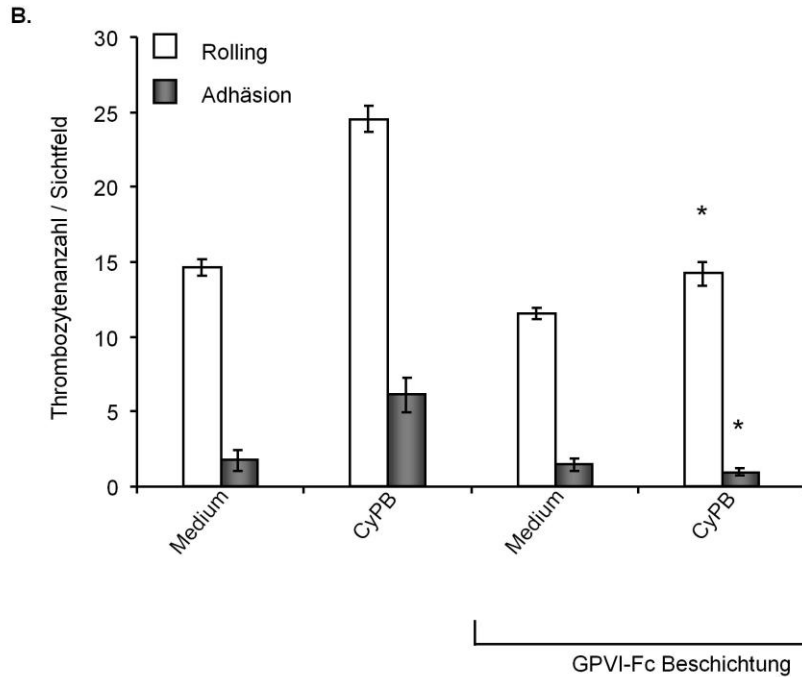


Abbildung 29: Mit Kollagen und GPVI-Fc beschichteten *cover slips* blockieren die durch CyPA-CD147 bzw. CyPB-CD147 induziertes *Rolling* und *Adhäsion*

Cover slips werden zunächst mit Kollagen (10 µg/ml bei 4°C über Nacht oder für zwei Stunden bei 37°C) beschichtet und anschließend die Bindungsstellen von Kollagen mit GPVI-Fc (20 µg/ml, über Nacht) blockiert.

Isolierte humane Thrombozyten werden mit Medium (Negativkontrolle), CyPA (100 nM) bzw. CyPB (100nM) für 30 Min. bei 37°C vorbehandelt, gewaschen und anschließend über die mit Kollagen und mit GPVI-Fc blockierten *cover slips* perfundiert und

- B. *Rolling* sowie *Adhäsion* für CyPB statistisch quantifiziert (Flusskammer n=5, *p<0,05 im Vergleich zur stimulierten Kontrolle).
- C. Sowie repräsentative Aufnahmen bei einer 40er Vergrößerung angefertigt. Auf eine Darstellung der adhärenenten Thrombozyten mit Pfeilen wird verzichtet, da die adhärenenten Zellen auf Kollagen eindeutig zu erkennen sind.

4.2 Auswirkung von Cyclophilin A auf murine Kardiomyozyten

4.2.1 Cyclophilin A inhibiert die Schlagfrequenz von murinen Kardiomyozyten

Murine Kardiomyozyten, die sich aus embryonalen Stammzellen differenzieren, werden nachdem sie Spontankontraktion zeigen, mit 200 nM CyPA über 48 Stunden inkubiert. Als Vergleich wird die entsprechende gleiche Anzahl der Wells mit PBS als Negativkontrolle über ebenfalls 48 Stunden inkubiert. Die Schlagfrequenz wird jeweils nach 4, 24, 36 und 48 Stunden für jeweils 1 Min. gezählt.

Der Zeitverlauf der Schlagfrequenz ist in *Abbildung 30* dargestellt. Dabei zeigt die prozentuale Auswertung bereits nach vier Stunden eine Verminderung der Schlagfrequenz, bei 24 Stunden ist es signifikant (*Abbildung 31*). Im Zeitverlauf wird ersichtlich, dass die mit CyPA behandelten Kardiomyozyten im Mittel weniger schnell schlagen, als die PBS Kontrolle. Auch nach 48 Stunden ist eine verminderte Schlagfrequenz noch nachweisbar.

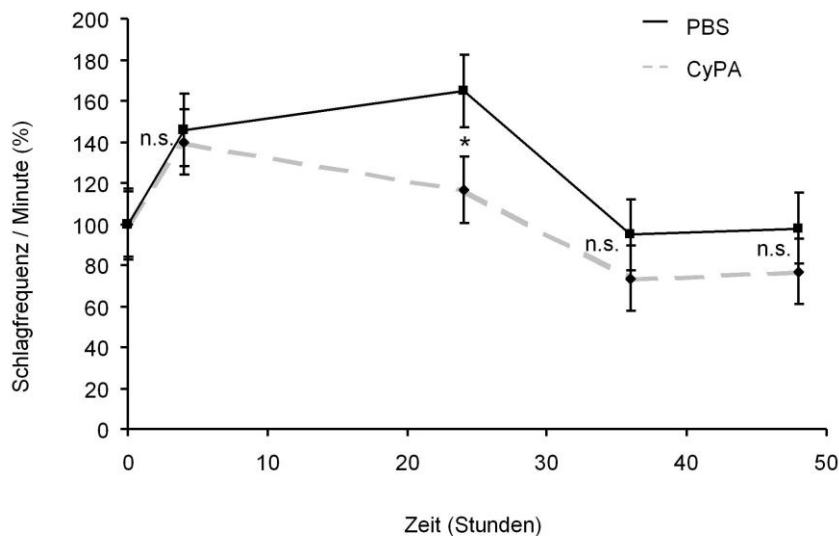


Abbildung 30: CyPA inhibiert die Schlagfrequenz kultivierter Kardiomyozyten

Kardiomyozyten werden mit 200nM CyPA und PBS inkubiert. Die Schlagfrequenz wird nach 4, 24, 36 und 48 Stunden gezählt (n=55, *p<0,05 im Vergleich zu der mit PBS inkubierten Negativkontrolle, n.s.= nicht signifikant).

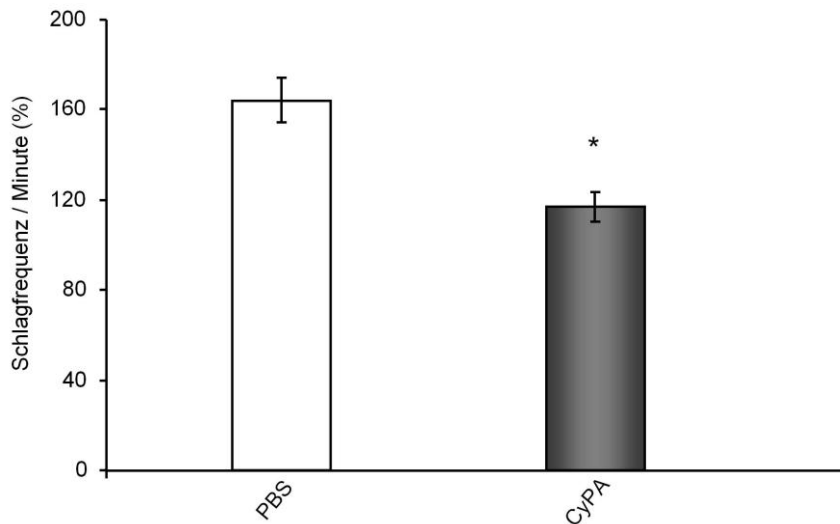


Abbildung 31: Signifikant verminderte Schlagfrequenz nach 24 Stunden bei der mit CyPA inkubierten Kardiomyozyten

Nach 24 stündiger Inkubation mit 200 nM CyPA lässt sich eine signifikant verminderte Schlagfrequenz nachweisen (n=55, *p<0,05 im Vergleich zu der mit PBS inkubierten Negativkontrolle).

4.2.2 Cyclophilin A induziert eine vermehrte Aktivität der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2)

Nach Ende der 48stündigen Inkubation mit CyPA bzw. PBS werden die Überstände abgenommen und für die Herstellung von Zymogrammen benutzt. Die Kardiomyozyten werden gefärbt.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenz wird das Glykoprotein CD147 (EMMPRIN) als Rezeptor in der Zellmembran der Kardiomyozyten dargestellt. Zur Charakterisierung der Kardiomyozyten wird Troponin I als spezifischer Marker verwendet. Der Nukleus wird mit Hilfe von Draq-5 angefärbt. Die Bilder werden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopes erstellt (*Abbildung 32*). CD147 (EMMPRIN) wird in murinen Kardiomyozyten exprimiert.

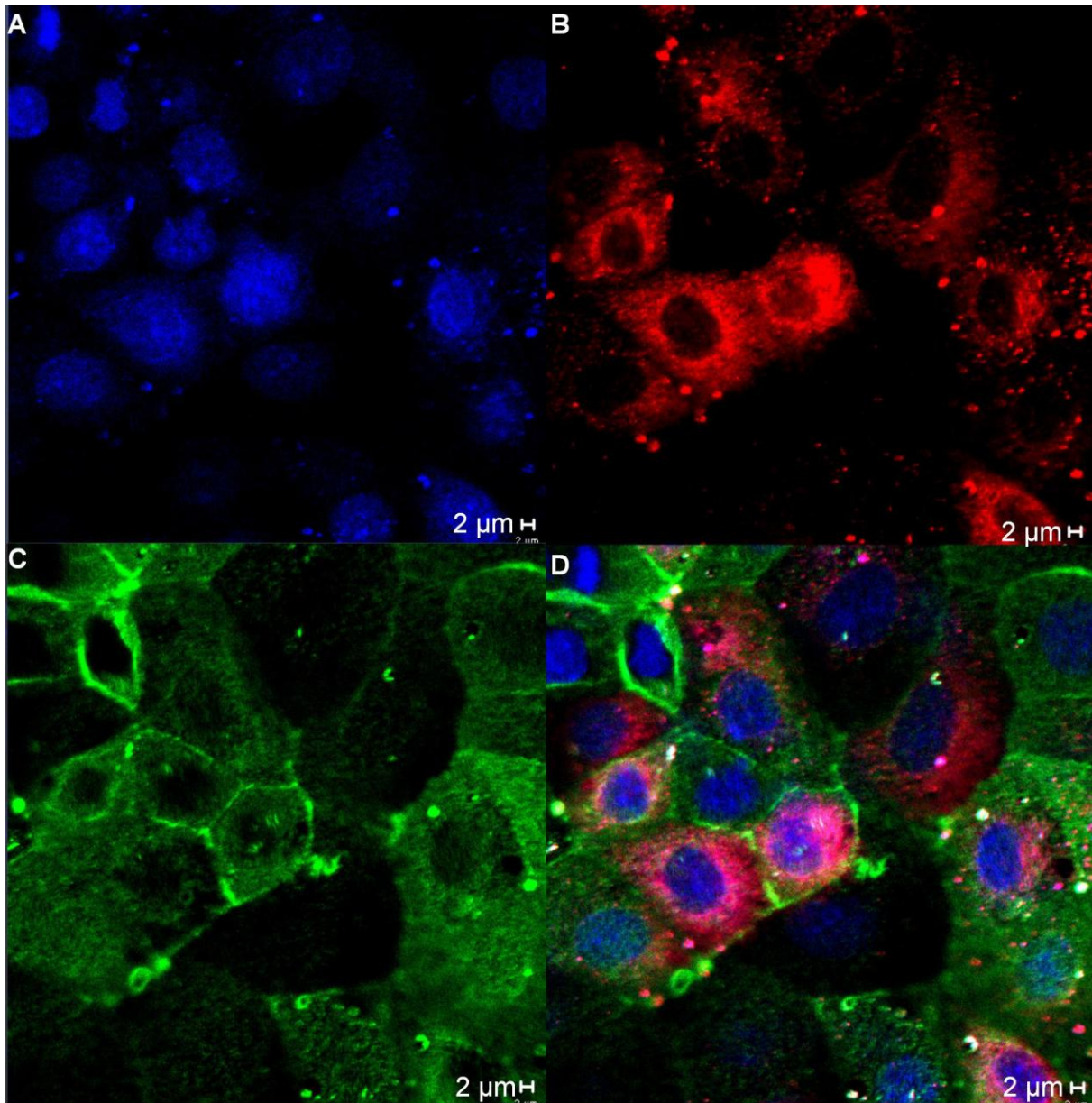


Abbildung 32: CD147 (EMMPRIN) Expression auf Kardiomyozyten

Mittels Immunfluoreszenz kann EMMPRIN als Rezeptor auf Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Troponin ist dabei der charakteristische Marker für Kardiomyozyten.

- A. Markierung der Nuklei mit Draq-5
- B. Markierung von Troponin I als herzspezifischer Marker
- C. Markierung von CD147 (EMMPRIN)
- D. Überlagerung von A,B,C

Ergebnisse

Im in *Abbildung 33* dargestelltem Zymogramm zeigen diejenigen Überstände die von mit CyPA inkubierten Kardiomyozyten stammen, eine vermehrte MMP-2 Aktivität. Eine MMP-9 Aktivität ist weder bei den mit PBS behandelten, noch bei den mit CyPA inkubierten Zellen sichtbar.

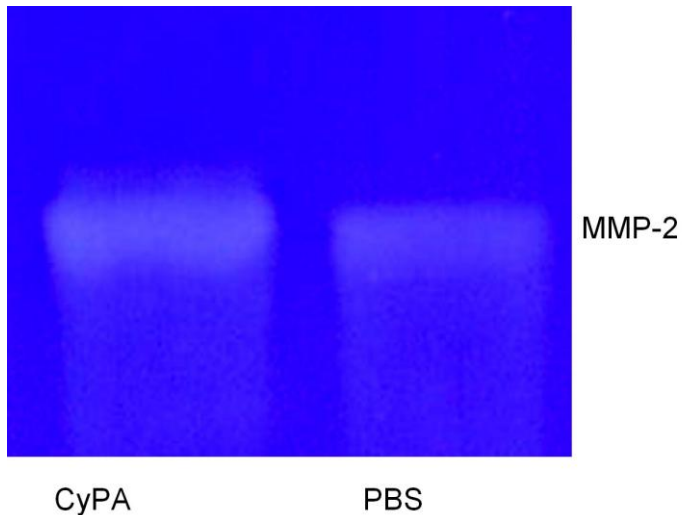


Abbildung 33: CyPA bewirkt eine verstärkte MMP-2 Aktivität in Kardiomyozyten

Werden die Überstände der Kardiomyozyten nach vorangegangenem Versuch für das Zymogramm verwendet, so zeigt sich, dass bei denjenigen Zellen, die mit CyPA inkubiert wurden, eine verstärkte MMP-2 Aktivität vorliegt (n=4). Repräsentatives Zymogramm der MMP-2 (n=4).

4.3 Intravitalmikroskopische Untersuchungen am Modell der Ischämie- und Reperfusion des Dünndarms

4.3.1 Vergleich von unstimulierten Thrombozyten mit ADP- bzw. Cyclophilin A-stimulierten Thrombozyten in den Venolen des Dünndarms

In diesem Versuch wird in drei Versuchsgruppen das Verhalten von Thrombozyten zur Gefäßwand der Venolen im Dünndarm dargestellt. In der ersten Versuchsgruppe werden unstimulierte Thrombozyten injiziert, in der zweiten mit Adenosindiphosphat (ADP) stimulierte Thrombozyten (40 μM , eine Stunde Inkubationszeit) und in der dritten Gruppe mit CyPA stimulierte Thrombozyten (200nM, eine Stunde Inkubationszeit). Unstimulierte und mit ADP stimulierte Thrombozyten stellen die Kontrollgruppen dar. Pro Maus werden 7×10^6 Thrombozyten/250 μl injiziert.

In der Übersicht (*Abbildung 34*) wird ersichtlich, dass der Anteil der transient-adhärenenten Zellen pro mm^2 in allen drei Versuchsgruppen vor Ischämie am Höchsten ist.

Aus *Abbildung 34* wird ersichtlich, dass der Anteil des *Rollings*, als auch der Anteil der transient-adhärenenten Zellen sowohl bei den mit ADP, als auch bei den mit CyPA stimulierten Thrombozyten erhöht ist. Ein signifikanter Unterschied kann bei den mit CyPA stimulierten transient-adhärenenten Thrombozyten vor Ischämie festgestellt werden (*Abbildung 34*).

Mit CyPA stimulierte und unstimulierte Thrombozyten hingegen interagieren sowohl vor Ischämie (*Abbildung 34*), als auch nach Reperfusion (*Abbildung 35*) deutlich weniger. Ein signifikant erhöhter Anteil des *Rollings* lässt sich für die mit ADP stimulierten Thrombozyten 30 Min. nach Reperfusion in den Venolen nachweisen (*Abbildung 35*).

Aus *Abbildung 36* wird ersichtlich, dass eine vermehrte Adhäsion der Thrombozyten an die Gefäßwand 5 Min. nach Reperfusion stattfindet. Dabei ist die Adhäsion von den mit ADP bzw. CyPA stimulierten Thrombozyten nur leicht erhöht.

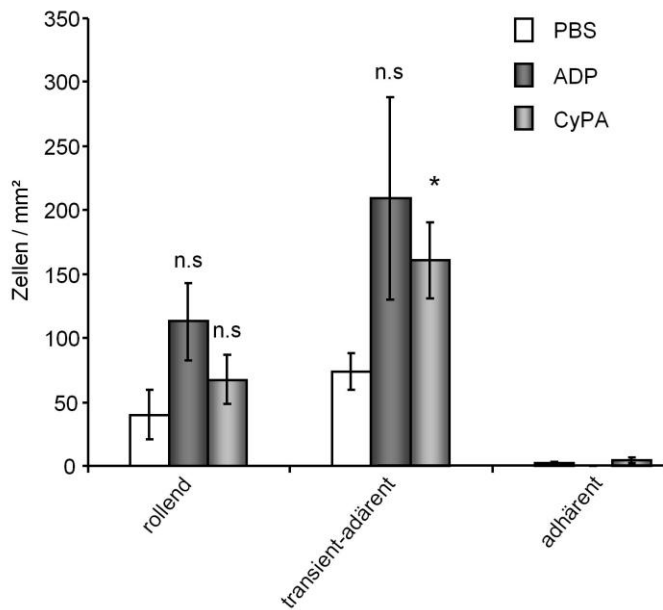


Abbildung 34: CyPA induziert transiente Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel der Mesenterialgefäße *in vivo*

Humane Thrombozyten werden *ex vivo* für 60 Min. mit PBS (Negativkontrolle), ADP (40 μ M) sowie mit CyPA (200nM) vorbehandelt, anschließend mit DCF (2,5mg/ml für 3 Min.) gefärbt und über einen Vena Jugularis-Katheter in die Maus appliziert.

Diese Abbildung verdeutlicht die Interaktion der Zellen mit der Gefäßwand ohne Ligatur der Mesenterialgefäße.

Es zeigt sich beim Vergleich der drei Versuchsgruppen ein deutlicher Unterschied zwischen unstimulierten und mit ADP bzw. mit CyPA stimulierten Thrombozyten. Aus dem Schaubild wird ersichtlich, dass der Anteil der transient-adhärenenten Zellen pro mm^2 am höchsten ist. Ein signifikanter Unterschied lässt sich bei der Gruppe der transient-adhärenenten Zellen, die mit CyPA inkubiert wurden, feststellen ($n=6$, $*p<0,05$ im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle, n.s.= nicht signifikant).

Ergebnisse

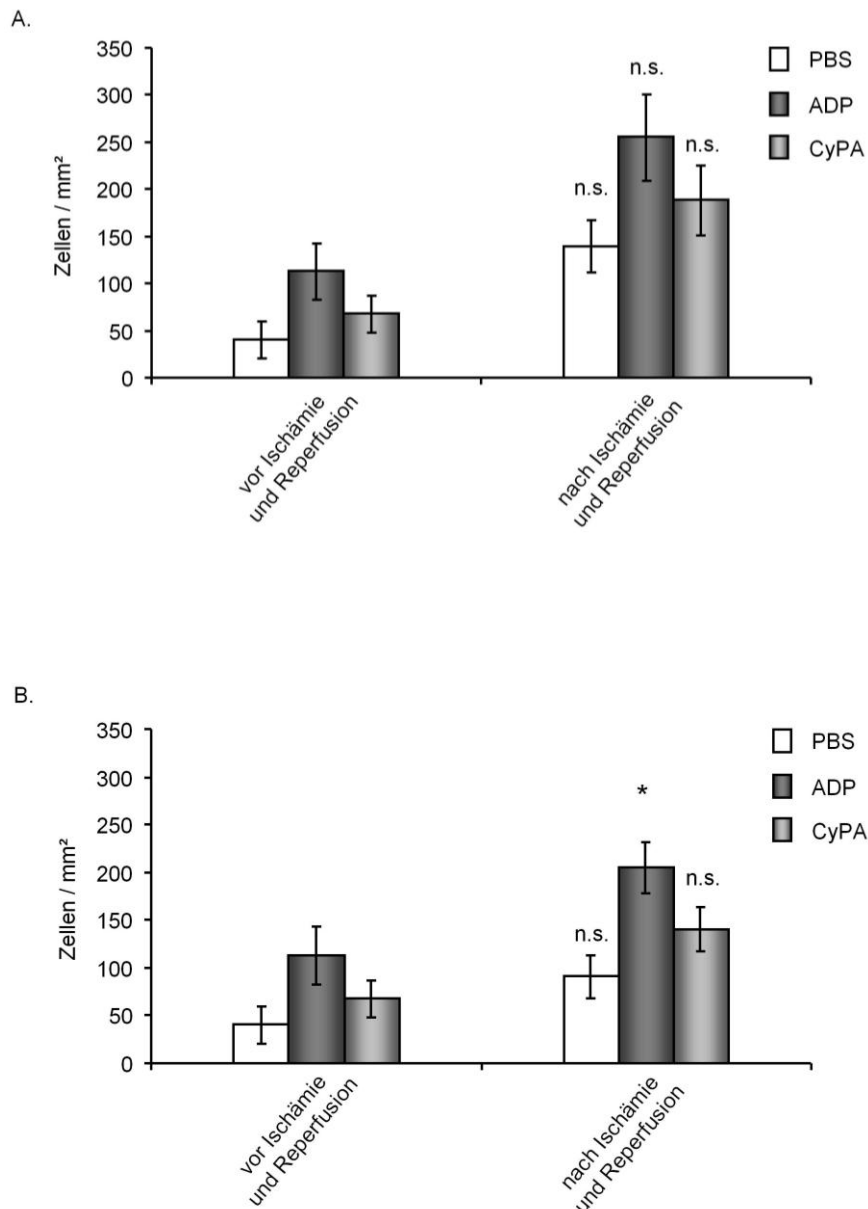


Abbildung 35: Thrombozyten *Rolling* im Ischämie- und Reperfusionsmodell des Darmes

Humane Thrombozyten werden *ex vivo* für 60 Min. mit PBS (Negativkontrolle), ADP (40 μ M), sowie CyPA (200nM) vorbehandelt, anschließend mit DCF (2,5mg/ml für 3 Min.) gefärbt und über einen Vena Jugularis-Katheter in die Maus appliziert.

Diese Abbildung verdeutlicht die Interaktion der Zellen mit der Gefäßwand vor und nach Ligatur der Mesenterialgefäße.

- 10 Min. nach Reperfusion wird deutlich, dass der Anteil des *Rollings* deutlich erhöht ist. Dabei interagieren Thrombozyten, die mit ADP bzw. CyPA stimuliert wurden, stärker mit der Zellwand als unstimulierte Thrombozyten (n=6, im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle).
- 30 Min. nach Reperfusion wird deutlich, dass der Anteil des *Rollings* deutlich erhöht ist. Dabei interagieren Thrombozyten, die mit ADP bzw. CyPA stimuliert wurden, stärker mit der Zellwand als unstimulierte Thrombozyten (n=6, *p<0,05 im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle, n.s.= nicht signifikant).

Ergebnisse

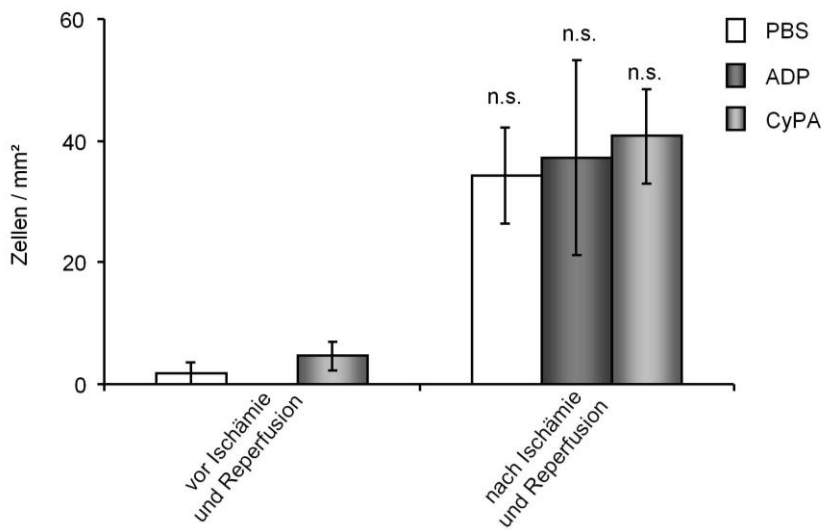


Abbildung 36: Thrombozytenadhäsion im Ischämie- und Reperusionsmodell des Darmes

Humane Thrombozyten werden *ex vivo* für 60 Min. mit PBS (Negativkontrolle), ADP (40 μ M), sowie CyPA (200nM) vorbehandelt, anschließend mit DCF (2,5mg/ml für 3 Min.) gefärbt und über einen Vena Jugularis-Katheter in die Maus appliziert.

Diese Abbildung verdeutlicht die Interaktion der Zellen mit der Gefäßwand vor und nach der Ligatur der Mesenterialgefäße.

5 Min. nach Reperfusion wird deutlich, dass der Anteil der Adhäsion deutlich erhöht ist. Dabei interagieren Thrombozyten, die mit ADP bzw. CyPA stimuliert wurden, vermehrt mit der Zellwand als die unstimulierten Thrombozyten (n=6, n.s.= nicht signifikant).

5 Diskussion

5.1 Diskussion der angewandten Verfahren

5.1.1 Die Flusskammer als *in vitro*-Modell

Die Flusskammer ist eine weit verbreitete *in vitro* Methode um die Interaktion von Zellen bei definierter Scherkraft unter dynamischen Bedingungen zu beobachten. Sie dient dazu, die physiologischen Verhältnisse von Blutgefäßen zu simulieren. In dieser Arbeit lag dabei die Interaktion der Blutplättchen mit Endothel und Bestandteilen der extrazellulären Matrix im Vordergrund. Um für jeden Versuch die gleichen Bedingungen zu gewährleisten, wurden die Blutplättchen stets bei 37°C inkubiert und das Perfusionsmedium wurde stets auf 37°C vorgewärmt. Mit der Wahl von 2000^s wurde eine Scherrate gewählt, die der Flussgeschwindigkeit im arteriellen System des Körpers entspricht. Ein pulsatile Fluss, wie es in den Arterien üblich ist, konnte dabei nicht gewährleistet werden. Das Sedimentieren der Thrombozyten auf den Boden der Perfusionsspritze während des Versuches konnte nur durch das Durchführen von kleinen Versuchsansätzen minimiert werden.

Endothelzellen werden in Kultur unter möglichst annähernd physiologischen Bedingungen gehalten. Ein Nachteil zu *in vivo* Versuchen besteht darin, dass sich Endothelzellen durch Kultivierung verändern. Für diese Versuche wurden Endothelzellen mit möglichst niedriger Passagezahl verwendet. So konnte *ex vivo* das Verhalten der Thrombozyten unter unterschiedlichen Bedingungen nachgeahmt werden.

5.1.2 Diskussion des Tierversuches

5.1.2.1 Die Maus als Tiermodell

Zu Beginn der Versuchsplanung stellt sich die Frage, an welchem Tiermodell die intravitale Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden soll. Bei der intravitalem Mikroskopie stellt die zu durchdringende Schichtdicke den limitierenden Faktor dar. Bei der Maus sind die Gefäßwände sehr dünn, sodass Interaktionen von Zellen mit der Gefäßwand gut dargestellt werden können (Lindner, Fingerle und Reidy 1993, Massberg et al. 1998a).

Die Maus bietet weiterhin viele Vorteile. Zum Einen ist die Haltung unkompliziert, platzsparend und mit geringen Kosten verbunden, zum Anderen wird beim Einsatz von Medikamenten und Therapeutika nur eine geringe Menge benötigt, sodass weniger als bei anderen Säugetieren verbraucht wird. Die Generationszeiten sind extrem kurz, sodass

Nachzuchten schnell heranwachsen. Die Maus ist als Versuchstier gut erforscht und charakterisiert. Es besteht die Möglichkeit der genetischen Manipulation um zahlreiche Knockoutstämme heranzuzüchten, zudem ist eine Vielzahl von monoklonalen Antikörpern verfügbar (Zolotareva und Kogan 1978, Lindner et al. 1993, Paigen, Plump und Rubin 1994).

Für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen werden in dieser Arbeit männliche Wildtypmäuse C57BL/6J verwendet. Da sie nach dem Versuch sofort getötet werden, ist eine Unverträglichkeitsreaktion aufgrund der Verwendung humaner Thrombozyten von geringer Bedeutung.

5.1.2.2 Charakterisierung der Zell-Endothel Interaktion mittels Intravitalmikroskopie

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie stellt eine weit verbreitete Methode zur Untersuchung des Blutflusses dar. Sie dient zur Visualisierung der Mikrozirkulation von verschiedenen Organen (Menger und Lehr 1993, Frenette et al. 1995, Frenette et al. 1998, Massberg et al. 1998a, Eriksson et al. 2000, Vajkoczy, Ullrich und Menger 2000, Vollmar et al. 2000, Becker et al. 2001, Grayson et al. 2001, Koseki et al. 2001, Read et al. 2001, Eichhorn et al. 2002). Dabei wurden u.a. Methoden entwickelt, die weder ein anästhesiertes Tier noch einen chirurgischen Eingriff erfordern (Wiedeman 1973, Mayrovitz 1992, Janssen et al. 1994). Bei anderen hingegen wird einige Tage vor Versuchsvorhaben ein chirurgischer Eingriff vorgenommen. Der eigentliche Versuch erfolgt dann an Tieren, die bei vollem Bewusstsein sind (Allison, Smith and Wood 1955, Endrich et al. 1980, Nolte et al. 1994). Für die in dieser Arbeit vorliegenden Versuche am Darm wird hingegen der gesamte Versuch am anästhesierten Tier durchgeführt. Mittels der intravitale Fluoreszenzmikroskopie können zum einen physiologische als auch pathologische Vorgänge direkt visualisiert werden, *ex vivo* Versuche sind hier oft unzuverlässig.

Die Fluoreszenzanfärbung mittels DCF hat in der Literatur zahlreich Verwendung gefunden (Koseki et al. 2001, Massberg et al. 2002, Massberg et al. 2003, Massberg et al. 2004, Massberg et al. 2006).

Die Art und Weise, wie die Zellen mit der Gefäßwand interagieren, ist in der Literatur dargestellt (Massberg et al. 1998a, Massberg et al. 1998b, Eichhorn et al. 2002). Dabei wird zwischen freien, rollenden und adhärennten Zellen unterschieden. Rollende Zellen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie langsamer als der Blutfluss sind. Die Definition, ab wann eine adhärennte Zelle als adhärennt gilt, ist in der Literatur jedoch unterschiedlich. So findet man Angaben, dass Zellen die zwischen 5 und 30 Sekunden an der gleichen Stelle des

Endothels haften, als adhärent gelten (Massberg et al. 1998a, Massberg et al. 1998b, Eichhorn et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit werden die Zellen nicht nur in rollende und adhärente Zellen gegliedert, sondern auch in die Gruppe der transient-adhärenenten. Darunter sind solche Zellen zu verstehen, die weniger als 15 Sekunden an der gleichen Stelle des Endothels haften. Zellen, die länger als diese Zeit haften, gelten als adhärent.

5.1.2.3 Durchführung der Intravitalmikroskopie mit Thrombozyten

Atherosklerose beschreibt einen chronisch-entzündlichen Prozess der Gefäßintima, der mit der Rekrutierung von Monozyten bzw. Makrophagen einhergeht. Thrombozyten spielen bereits bei der Initiierung von Atherosklerose eine bedeutende Rolle, indem sie an das dysfunktionelle Endothel adhären (Massberg et al. 2002).

Der physiologische Zustand des Endothels zeichnet sich dadurch aus, dass eine Thrombozytenadhäsion und -aktivierung ebenso wie die Leukozytenaktivierung vermieden wird. Die Aktivierung der Gerinnungskaskade wird unter allen Umständen unterbunden, die Fibrinspaltung verstärkt. Mit anderen Worten: Es herrscht ein antikoagulatorischer und antiinflammatorischer Zustand (Becker et al. 2000). Bei der Intravitalmikroskopie wird durch die einstündige Ischämiephase eine funktionelle Störung des Endothels induziert. Es liegt keine direkte Verletzung vor. Die Verletzung wird vielmehr indirekt durch die Ischämiephase gesetzt. Das Endothel wird in einen proinflammatorischen Zustand, ähnlich wie bei Atherosklerose, versetzt. Dieser Zustand zeichnet sich durch eine erhöhte Permeabilität, die Freisetzung zahlreicher Chemokine, Wachstumsfaktoren, Vasokonstriktion und einer Aktivierung der weißen Blutkörperchen und Thrombozyten aus (Becker et al. 2000). Das Endothel entwickelt adhäsionsvermittelnde Eigenschaften (Siegel-Axel et al. 2006), und Rezeptoren wie P-Selektin, ICAM-1 und vWF werden exprimiert (Becker et al. 2000).

Zur Adhäsion ist dabei ein verletztes Endothel nicht unbedingt erforderlich. Untersuchungen zeigten, dass Thrombozyten auch an Endothel haften, wenn dieses lediglich aktiviert ist (Gawaz et al. 1996, Gawaz et al. 1997, Bombeli, Schwartz und Harlan 1998). Durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen, proinflammatorischen und vasoaktiven Mediatoren wie z.B. Thromboxan A₂, Leukotrien, Serotonin, Plättchenfaktor 4 und PDGF treiben Thrombozyten die Entzündung voran (Deuel et al. 1981, Heffner, Sahn und Repine 1987, Piccardoni et al. 1996).

Das Ischämie/Reperusionsmodell stellt nicht nur ein Modell für entzündliches Geschehen dar, sondern auch für das Geschehen nach einer Plaqueruptur. Mit einer Plaqueruptur geht stets eine Thrombusbildung mit begleitender Ischämie des betroffenen Organs einher. Bei

nachfolgender Reperfusion kommt es zur Plättchenadhäsion, die wiederholt zur Einengung des Lumens und zum Verschluss des Gefäßes führen kann (Massberg et al. 1999).

Jahrelang spielten Leukozyten als Entzündungszellen bei der Reperfusion eine übergeordnete Rolle. Die Art und Weise, wie sie mit dem Endothel interagieren, wurde genaustens beobachtet. Dabei stellte man fest, dass Leukozyten in der Lage sind zu rollen und am Endothel zu adhären (Lehr, Menger und Messmer 1993, Nolte et al. 1994, Harris et al. 1996, Ley 1996). Einmal adhärent, setzen Leukozyten toxische Sauerstoffprodukte und Proteasen frei, die zu unterschiedlichen Gewebeschäden führen (Eppihimer und Granger 1997).

Thrombozyten wurden erst vor kurzem als Entzündungszellen erkannt. Dabei stellen Thrombozyten die ersten Zellen dar, die an die postischämische Gefäßwand binden (Massberg et al. 1998b). Sie interagieren mit der Gefäßwand in gleicher Weise wie Leukozyten. Der große Vorteil in der Intravitalmikroskopie besteht darin, dass ihre Interaktion nicht nur in Venolen, sondern auch in kleinen Arteriolen sichtbar ist (Massberg et al. 1998a).

5.1.2.4 Schwierigkeiten bei der Durchführung der Intravitalmikroskopie

Während des Darmversuches ergeben sich einige Komplikationen. Dies ist zum Einen darin begründet, dass die Dauer des Gesamtversuches bei ca. fünf Stunden liegt. Die Tiere liegen während des gesamten Eingriffes in Narkose, wodurch es zu einem massiven Blutdruckabfall kommt. Dies begünstigt eine Minderperfusion der Organe, einer damit einhergehender schlechten Sauerstoffversorgung des Gewebes, sowie ein Sistieren des Blutflusses in den Endstromgebieten. Mit Hilfe von Ringerlaktatinfusionen wird versucht dem entgegenzuwirken. Zusätzlich kommt es durch das ungünstige Verhältnis von Gewicht zur Körperoberfläche schnell zur Hypothermie. Um das übermäßige Auskühlen zu verhindern, wird eine Wärmematte untergelegt.

Des Weiteren stellt die Darmperistaltik ein großes Problem dar. Dadurch sind nur unscharfe Aufnahmen möglich und die Gefäße verschwinden immer wieder aus dem Aufnahmeveld. Durch Befeuchtung des Darmes mit einer geänderten Wassertemperatur und das kurzzeitige Ausschalten der Wärmematte kann die Darmperistaltik eingedämmt werden.

Darmperistaltik und die oben genannte schlechte Kreislagsituation führen dazu, dass insbesondere 5 bzw. 10 Min. nach Reperfusion der Blutfluss sistiert oder verzögert ist, sodass Aufnahmen hier unmöglich sind.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Atherosklerose ist ein chronisch-entzündlicher Prozess der Gefäßwand. Die im Zuge der Atherosklerose entstehende Plaque stellt einen Schlüsselprozess für den weiteren Krankheitsverlauf dar. Dabei stellt der Myokardinfarkt eine schwerwiegende Komplikation dar. Zum Myokardinfarkt kann es im Wesentlichen durch zwei unterschiedliche Pathomechanismen kommen:

Zum Einen durch die Ruptur von atherosklerotischen Plaques. Hier kommt es zur Freilegung der subendothelialen Matrix mit der Folge der thrombozytären Aktivierung und Aggregation. Ein Thrombus, welcher das Gefäß verlegt, ist die Folge (Gawaz 2004).

Einen weiteren Pathomechanismus stellt die Mikroembolisation von atherosklerotischem Debris und thrombozytären Mikroaggregaten dar. Die myokardiale Mikrozirkulation ist beeinträchtigt (Heusch et al. 2001, Skyschally, Erbel und Heusch 2003).

Als Folge dieser Pathomechanismen entsteht eine myokardiale Ischämie. Diese weist alle Charakteristiken einer Entzündung auf, wie z.B. die Sezernierung von Zytokinen, Expression von Adhäsionsmolekülen, Einwanderung von Neutrophilen, sowie eine gesteigerte Gefäßpermeabilität (Hansen 1998).

CyPA wird dabei von zugrundegehenden Myokardzellen freigesetzt um die umliegenden Zellen vor Apoptose zu schützen (Seko et al. 2004).

CyPA, das zur Familie der Immunophiline gehört, ist v.a. im Zytoplasma verteilt (Galat 1993). Interessanterweise kann es als proinflammatorisches Agens von LPS-stimulierten Monozyten/Makrophagen (Sherry et al. 1992) und Endothelzellen (Jin et al. 2004, Kim et al. 2004) in den extrazellulären Raum sezerniert werden.

CyPA spielt eine wichtige Rolle als Mediator im Entzündungsgeschehen.

Während der Atherogenese wird CyPA in atherosklerotischen Plaques exprimiert. Hierbei lässt sich CyPA vor allem in glatten Muskelzellen und Endothelzellen nachweisen (Jin et al. 2004). Bei Endothelzellen führt CyPA zur Apoptose (Jin et al. 2004) und zur Expression von Adhäsionsmolekülen, die v.a. für das Andocken der Leukozyten am Endothel verantwortlich ist (Satoh, Nigro und Berk 2010). Des Weiteren wirkt es auf Monozyten chemotaktisch (Payeli et al. 2008). CyPA bewirkt zudem eine Aktivierung (Kim et al. 2009) und Proliferation von Makrophagen (Satoh et al. 2010).

Eine weitere Komplikation der Atherosklerose stellt das Aneurysma dar. Darunter versteht man eine spindel- bzw. sackförmige permanente, irreversible und lokale Erweiterung der Hauptschlagader (Erdmann 2006, Jauch 2007). Bei 52 % aller Fälle liegt dem Aortenaneurysma eine atherosklerotische Grunderkrankung zugrunde (Daoud et al. 1963). Die Erweiterung der Aorta umfasst dabei alle Gefäßschichten. Als Ursache wird eine zystische Mediadegeneration mit einhergehender Degeneration der elastischen Fasern, die

Diskussion

im Zuge der Atherosklerose entsteht, vermutet. Es entsteht ein Verlust der elastischen Rückstelleigenschaften der Aortenwand und dadurch kommt es zur kontinuierlichen Erweiterung der Aorta (Erdmann 2006). Folgen stellen die Rupturblutung, sowie der Gefäßverschluss infolge arterieller Thrombosen bzw. Embolien dar (Jauch 2007).

Bei der Entstehung des Aortenaneurysmas sind zahlreiche Mediatoren beteiligt. So spielen Zytokine (Bruemmer et al. 2003), MMPs (Yoshimura et al. 2005, Sun et al. 2007), sowie *reactive oxygen species* (ROS) (Griendling und FitzGerald 2003) eine maßgeblich Rolle. Dabei begünstigt CyPA, welches von glatten Muskelzellen sezerniert wird, die Entstehung eines Aortenaneurysmas auf folgende Weise:

Zum Einen wird bei oxidativem Stress CyPA und pro-MMP-2 sezerniert, wobei CyPA wiederum die Entstehung der ROS Produktion fördert.

Zum Anderen aktiviert CyPA MT1-MMP, welches in der Lage ist MMP-2 zu aktivieren. Schließlich ist es in der Lage, CD45⁺ Entzündungszellen anzulocken.

CyPA stellt also einen Marker für Gewebeschädigung dar, der durch Entzündung und oxidativen Stress hervorgerufen wird (Satoh et al. 2009).

Auch bei anderen entzündlichen Geschehen spielt CyPA eine übergeordnete Rolle.

Bei Patienten mit schwerer Sepsis konnte ein erhöhter CyPA-Titer im Serum festgestellt werden. Dabei scheint CyPA ein wichtiger Index für massiven Zellschaden zu sein (Tegeeder et al. 1997).

Ebenso ist CyPA bei einer der häufigsten Immunerkrankungen, der rheumatoiden Arthritis (RA), maßgeblich beteiligt. In der Synovia ist CyPA erhöht (Billich et al. 1997). Dabei werden CyPA in der Pathogenese folgende Funktionen zugeschrieben:

Zum Einen induziert es die Expression von Zytokinen wie z.B. TNF- α , IL-8 (Wang et al. 2010), MCP-1 und IL-1 β (Kim et al. 2005).

Zum Anderen bewirkt es über die Bindung an seinen Rezeptor CD147 (EMMPRIN) die Aktivierung von MMP-2 und MMP-9 (Kim et al. 2005, Yang et al. 2008, Wang et al. 2010).

EMMPRIN, auch Basigin (Miyauchi et al. 1990), Neurothelin (Schlosshauer, Bauch und Frank 1995) und CD147 (Koch et al. 1999) genannt, ist ein hochglykosyliertes Transmembranprotein, welches zur Familie der Immunglobuline gehört (Sun und Hemler 2001). Ursprünglich wurde es auf der Oberfläche von Tumorzellen identifiziert (Biswas 1984). Inzwischen konnte es jedoch auch auf zahlreichen hämatopoetischen (Monozyten, Makrophagen, (Kasinrerker et al. 1992, Major et al. 2002) Thrombozyten (Schmidt et al. 2008)) und nicht-hämatopoetischen Zellen, wie z.B. glatten Muskelzellen (Schmidt et al. 2006) nachgewiesen werden. Bei diesen Zellen reguliert CD147 (EMMPRIN) die MMP-Aktivität. Die Bindung von CyPA an CD147 (EMMPRIN) führt zur Anlockung zahlreicher Entzündungszellen wie Neutrophilen, Monozyten und T-Zellen.

Diese Zellen treiben die Entzündung maßgeblich voran und führen im Rahmen der Arthritis zu einem Knorpelabbau (Damsker et al. 2009).

Allen Entzündungsgeschehen liegt dabei ein gemeinsamer Gedanke zugrunde, welcher in *Abbildung 37* dargestellt ist. Während eines entzündlichen Geschehens wird CyPA in den extrazellulären Raum sezerniert. Dieses bindet dann an seinen Rezeptor CD147 (EMMPRIN), was zur Folge hat, dass zahlreiche Entzündungszellen wie Neutrophile, Monozyten und Makrophagen ins betroffenen Gewebe einwandern und die Entzündung vorantreiben.

Zum Anderen führt die Bindung von CyPA an CD147 (EMMPRIN) zu einer Aktivierung der MMPs. MMPs sind zinkabhängige Proteasen, die in der Lage sind, Bestandteile der extrazellulären Matrix abzubauen. MMPs beeinflussen eine Vielzahl von Vorgängen. Physiologisch sind sie an der embryonalen Entwicklung, dem Menstruationszyklus und der Knochenentwicklung beteiligt (Van Lint und Libert 2007). Auch für Zellmigration, Differenzierung, Proliferation, Zelltod, sowie Zell-Zell Interaktionen sind MMPs unerlässlich (Elkington, O'Kane und Friedland 2005). Für die Aktivierung bzw. Inaktivierung von Zytokinen spielen MMPs eine unerlässliche Rolle (Van Lint und Libert 2007).

Im Falle der Atherosklerose werden dabei v.a. MMP-2 und MMP-9 aktiviert (Galis et al. 1994, Brown et al. 1995, Nikkari et al. 1995, Li et al. 1996).

In den hier durchgeführten Untersuchungen stand der Thrombozyt im Vordergrund. CD147 (EMMPRIN) wird auch auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten exprimiert (Schmidt et al. 2008). CyPA bindet an dieses und führt zur Aktivierung des Thrombozyten. Dieser wird in einen prothrombotischen Zustand versetzt, welcher mit der Ausbildung von Pseudopodien einhergeht. Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin und PSGL-1 werden an der Zelloberfläche vermehrt exprimiert. Dies zeigt sich dann in vermehrtem *Rolling* und in einer vermehrten Adhäsion der Thrombozyten am Endothel. Bei verletztem Endothel, wie es nach einer Plaqueruptur der Fall ist, haften Thrombozyten über GPVI an Kollagen. Die anhaftenden Thrombozyten bilden über Fibrinogenbrücken Aggregate, ein Thrombus entsteht. Ein solcher Thrombus hat, je nach Größe und Lokalisation, unterschiedliche Auswirkungen, vom Schlaganfall bis hin zum Myokardinfarkt.

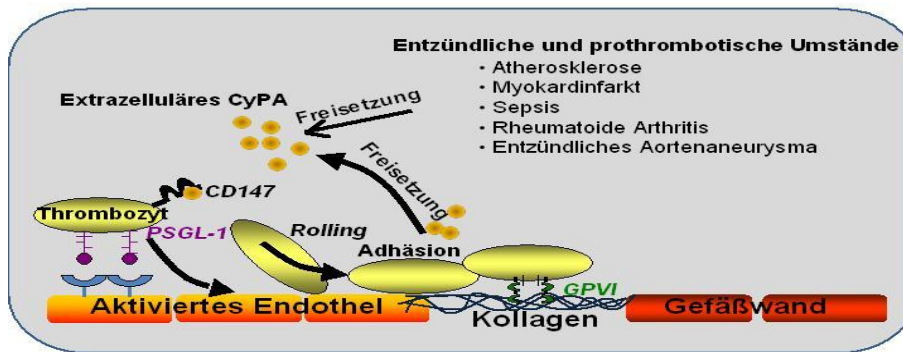


Abbildung 37: Übersicht über die Wirkungsweise von CyPA

Bei inflammatorischen Erkrankungen wird CyPA freigesetzt und bindet an seinen Rezeptor CD147 (EMMPRIN). Dies führt zu einem *Rolling* des Thrombozyten entlang des Endothels und zu einer Bindung über GPVI an Kollagen.

Thrombozyten stellen also wichtige Entzündungszellen dar, deren Bedeutung immer mehr in den Vordergrund tritt, da sie zum Einen mit anderen Zellen in Kontakt treten können und zum Anderen zahlreiche Chemokine ausschütten, um andere Zellen anzulocken (Weber 2005, May, Seizer und Gawaz 2008). Thrombozyten setzen selbst bei ihrer Aktivierung CyPA frei (Coppinger et al. 2004).

Hier konnte mit Hilfe des *in vitro* Modells gezeigt werden, dass CyPA/CyPB einen stimulierenden Effekt auf Thrombozyten hat. Dabei führt die Stimulation von CyPA/CyPB zu einer Hochregulierung der Adhäsionsmoleküle, was sich durch vermehrtes *Rolling* und eine vermehrte Adhäsion der Thrombozyten bemerkbar macht.

5.2.1 Cyclophilin A stimuliert Thrombozyten über die Bindung an *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer* (EMMPRIN / CD147)

Thrombozyten sind nicht nur in der Lage CyPA freizusetzen (Coppinger et al. 2004), sondern werden auch durch die Bindung von CyPA bzw. CyPB an CD147 (EMMPRIN) stimuliert, was sich dann *in vitro* durch ein vermehrtes *Rolling* und Adhäsion zeigt.

CD147 (EMMPRIN) wird auf Thrombozyten als Rezeptor exprimiert. Eine Interaktion von CD147-CD147 führt zu einer gesteigerten Expressierung von P-Selektin, ein Zeichen, dass Thrombozyten aktiviert sind (Schmidt et al. 2008). CD147 (EMMPRIN) stellt für CyPA/CyPB einen signalgebender Rezeptor dar (Yurchenko et al. 2001, Yurchenko et al. 2002, Yurchenko, Constant und Bukrinsky 2006). Die Bindung von CyPA an CD147 (EMMPRIN) führt zu einer gesteigerten Migration von Neutrophilen, die mittels anti-CD147 gehemmt werden konnte (Arora et al. 2005). Eine durch CyPB hervorgerufene Adhäsion von T-Lymphozyten an Fibronectin konnte mit Hilfe von anti-CD147 gemindert werden. Ein

Diskussion

vergleichbarer Effekt konnte jedoch nicht mit CyPA nachgewiesen werden (Allain et al. 2002). Bei Blutplättchen konnte bisher gezeigt werden, dass die Bindung von CyPB zur Adhäsion an Kollagen führt (Allain et al. 1999). Sowohl CyPA, als auch CyPB führt hier über die Bindung an CD147 (EMMPRIN) zu einer Aktivierung von Thrombozyten, was sich durch eine vermehrte Expression von P-Selektin bestätigen lässt (Seizer, unveröffentlichte Daten). Dieser Effekt ließ sich in der Flusskammer bei CyPA, als auch bei CyPB in gleichen Maßen nachweisen. Mittels anti-CD147 ließ sich die Stimulation blockieren.

Durch die gemeinsame Inkubation von CyPA bzw. CyPB mit NIM811, wird CyPA bzw. CyPB in seiner Aktivität gehemmt. Eine Aktivierung der Thrombozyten lässt sich nicht beobachten.

Mittels der Flusskammer konnte also gezeigt werden, dass die Aktivierung von Thrombozyten durch CyPA bzw. CyPB über CD147 (EMMPRIN) erfolgt. Es stellte sich nun die Frage, welche Rezeptoren jedoch für das *Rolling* und die Adhäsion verantwortlich sind. In der Literatur sind für das Rollen der Thrombozyten Selektine verantwortlich (Subramaniam et al. 1996). Die feste Adhäsion hingegen wird über Integrine vermittelt (Gawaz et al. 1997, Bombeli et al. 1998). P-Selektin vermittelt die thrombozytäre Rekrutierung von Leukozyten an die Gefäßwand. Über PSGL-1-P-Selektin sind Leukozyten in der Lage an adhärenente Thrombozyten zu binden und dadurch das Fortschreiten der Entzündung zu begünstigen. PSGL-1, der Ligand für P-Selektin, wird nicht nur auf Neutrophilen (Norgard et al. 1993, Moore et al. 1995) und Monozyten (Norgard et al. 1993) exprimiert, sondern auch auf Thrombozyten (Frenette et al. 2000). Bei intravitalmikroskopischen Untersuchungen konnte mit Hilfe von anti-PSGL-1 die Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothel minimiert werden (Frenette et al. 2000). Dies deckt sich mit den in der Flusskammer festgestellten Beobachtungen. Durch CyPA bzw. CyPB werden Thrombozyten zwar stimuliert, jedoch können sie durch die Blockade mit anti-PSGL-1 nicht vermehrt rollen und adhären.

Im Flusskammerversuch zeigte sich, dass alle Beobachtungen unabhängig von der Beschichtung der *cover slips* waren. Durch die sechsstündige Inkubation mit TNF- α und IFN- γ wird das Endothel aktiviert. Es wird, vergleichbar mit der einstündigen Ischämiephase im Darmmodell, eine Entzündung simuliert, die mit adhäsionsvermittelnden Eigenschaften einhergeht (Siegel-Axel et al. 2006). Dies verdeutlicht die durch CyPA bzw. CyPB vermittelte Stimulation der Thrombozyten. Unstimulierte Thrombozyten sind durchaus auch in der Lage, an aktiviertem, jedoch unverletztem Endothel zu adhären (Gawaz et al. 1996, Gawaz et al. 1997). Auch bei der Beschichtung der *cover slips* mit Kollagen, einem der Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix, konnte vermehrtes *Rolling* und Adhäsion vermittelt durch CyPA bzw. CyPB nachgewiesen werden.

5.2.2 Der Rezeptor Glykoprotein VI auf Thrombozyten ist für die CyPA-induzierte Adhäsion an Kollagen verantwortlich

Kollagen ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix. In der Gefäßwand finden sich neun verschiedene Kollagentypen darunter Kollagen Typ I, III, IV, V, VI, VIII, XII, XIII und XIV (Nieswandt und Watson 2003). In atherosklerotischen Plaques findet man v.a. Kollagen Typ I und III (Katsuda und Kaji 2003). Thrombozyten adhären über GPVI und den Integrin Rezeptor $\alpha_2\beta_1$ an Kollagen (Nieswandt und Watson 2003). In atherosklerotischen Plaques bindet GPVI v.a. an den kollagenreichen Kern. Dabei trägt GPVI erheblich zur Thrombusformation bei, indem Thrombozyten über GPVI an Kollagen adhären, aggregieren und schließlich einen Thrombus bilden (Penz et al. 2005).

Das Fusionsprotein GPVI-Fc ist in der Lage, die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen, bevorzugt Kollagen III, zu verhindern (Schulz et al. 2008). Dabei stellt Fc den signalgebenden Komplex dar und ist über eine nicht-kovalente Bindung mit GPVI verbunden (Nieswandt et al. 2000).

Mit GPVI-Fc vorbehandelte Mäuse zeigen eine geringere Plaquegröße, die Neointimabildung war geringer (Schönberger et al. 2008) und die Plättchenadhäsion an Kollagen vermindert (Schulz et al. 2008). Auch auf die Aggregation von Thrombozyten wirkt sich GPVI aus. Wird Kollagen mit GPVI-Fc vorinkubiert so wird die Aggregation gehemmt. GPVI-Fc bindet an Kollagen und blockiert die GPVI-Bindungsstellen. Thrombozyten können nun nicht mehr mit ihrem GPVI Rezeptor binden und durch die Stimulation mit Kollagen aggregieren (Clemetson et al. 1999).

Werden die *cover slips* für die Flusskammer mit Kollagen beschichtet und anschließend mit GPVI-Fc inkubiert, so blockiert GPVI-Fc die Bindungsstelle für Thrombozyten. Die Thrombozyten werden zwar mit CyPA/CyPB stimuliert, können jedoch durch die blockierte Bindungsstelle nicht mehr binden. Werden die *cover slips* hingegen nicht mittels GPVI-Fc blockiert, zeigt sich eine deutliche Aktivierung der Thrombozyten, die sich durch vermehrtes Rollen und Adhäsion äußert. Diese Ergebnisse wurden zuvor schon von Massberg et al. beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Beschichtung mit Kollagen und anschließender Blockierung mittels GPVI-Fc Thrombozyten an Kollagen *in vitro* in der Flusskammer und *in vivo* weniger adhären als mit der Fc Kontrolle (Massberg et al. 2004). Im Gegensatz dazu wurden für den hier verwendeten Versuchansatz die Thrombozyten zuvor für 30 Min. mit CyPA/CyPB inkubiert, um eine Stimulation hervorzurufen und anschließend über die GPVI-Fc beschichteten *cover slips* perfundiert.

5.2.3 Cyclophilin A bewirkt eine verminderte Schlagfrequenz und induziert die gesteigerte Aktivität von Matrixmetalloproteinase-2 bei murinen Kardiomyozyten

Die Folge der Ruptur atherosklerotischer Plaques stellt der Myokardinfarkt dar. Der betroffene Bezirk kann nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und anderen Nährstoffen versorgt werden. CD147 (EMMPRIN) konnte als Rezeptor auf zirkulierenden Monozyten bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt nachgewiesen werden. Nach einem akuten Myokardinfarkt steigt die Expression von CD147 (EMMPRIN) im linken Ventrikel an (Nie et al. 2009). Im Falle des Myokardinfarktes wird angenommen, dass CD147 (EMMPRIN) v.a. an der MMP-Produktion beteiligt ist (Zavadzkas et al. 2008). Während der Ischämie/Reperfusion wird CyPA durch zugrundegehende Zellen in den extrazellulären Raum freigesetzt um dadurch Zellen zu aktivieren (Sherry et al. 1992, Jin et al. 2000). Seko et al. zeigten, dass Hypoxie zu einer vermehrten CyPA Sekretion und einer gesteigerten CD147 (EMMPRIN) Expression in Rattenkardiomyozyten führt (Seko et al. 2004). Bei Menschen mit akutem Myokardinfarkt konnte festgestellt werden, dass CyPA und CD147 (EMMRPIN) vermehrt exprimiert werden (Seizer unveröffentlichte Daten).

CyPA wird während dieser Hypoxiephase von umliegenden Zellen freigesetzt, um diese vor Apoptose zu schützen (Seko et al. 2004). Die Folgen eines Myokardinfarktes führen unweigerlich zu einem linksventrikulärem *Remodeling*, das mit einer Fibrosierung und einer Hypertrophie des Myokards einhergeht (Zavadzkas et al. 2008). Diesem *Remodeling* liegt eine gesteigerte MMP-Aktivität zugrunde (Coker et al. 2001, Siwik, Pagano und Colucci 2001, Vanhoutte et al. 2006, Fukuta und Little 2007). Durch eine Hochregulierung von CD147 (EMMPRIN) kommt es zur gesteigerten MMP-2 und MT1-MMP Aktivität, das zu einer Dilatation des linken Ventrikels führt. Aufgrund der gesteigerten Wandspannung kommt es zur Hypertrophie (Zavadzkas et al. 2008).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass murine Kardiomyozyten CD147 (EMMRPIN) auf ihrer Zellmembran exprimieren. Die Zugabe von CyPA bewirkt eine Steigerung der MMP-2 Aktivität. Murine Vorläuferherzzellen bilden während ihrer Differenzierung, wie Herzmuskelzellen auch, charakteristische herzspezifische Proteine, Rezeptoren und Ionenkanäle aus. Während der Differenzierungsphase nimmt die Schlagfrequenz zunächst zu, im Laufe der Reifung jedoch wieder ab. Voll differenzierte Kardiomyozyten zeigen in der Regel keine Spontankontraktion mehr, können aber über einen langen Zeitraum in Kultur gehalten werden (Boheler et al. 2002). Im Laufe ihrer Entwicklung prägen sich alle Typen von Herzmuskelzellen aus. In der frühen Phase findet man v.a. Schrittmacher-ähnliche Zellen, später hingegen Vorhof-, Ventrikel-, Nodal-, His-, und Purkinje-ähnliche Zellen (Hescheler et al. 1997). Durch Zugabe von rekombinanten CyPA wird die Hypoxie während eines Myokardinfarktes simuliert, das zum Einen einen

negativen chronotropen Effekt auf die Zellen hat, zum Anderen die MMP-2 Aktivität steigert. Durch anaerobe Zustände wird MMP-2 aktiviert, was zur Degradierung von Kollagen führt und zum *Remodeling* der extrazellulären Matrix nach vorhergegangenem Myokardinfarkt beiträgt.

Es konnte gezeigt werden, dass CD147 (EMMPRIN) auf Vorläuferzellen von Myokardzellen exprimiert wird und dass CyPA die Schlagfrequenz muriner Kardiomyozyten herabsetzt.

5.2.4 Die Rolle von Cyclophilin A auf Thrombozyten ist noch nicht vollständig geklärt

Im *in vivo* Versuch kristallisiert sich heraus, dass CyPA auf die Interaktion von Thrombozyten im Ischämie/Reperusionsmodell der Maus stimulierend wirkt und eine erhöhte Interaktion der Thrombozyten mit dem Gefäßendothel hervorruft. Ein durchgehend signifikanter Unterschied, im Vergleich zum Flusskammerversuch, konnte jedoch nicht gezeigt werden. ADP ist für Thrombozyten eines der wichtigsten stimulierenden und prokoagulatorischen Agenzien und stellt im Ischämie/Reperusionsmodell die Positivkontrolle dar. ADP wird u.a. von geschädigtem Gefäßwandgewebe, Endothelzellen und Erythrozyten freigesetzt. Aber auch Thrombozyten sind in der Lage ADP freizusetzen, welches dann an Rezeptoren in der Zellmembran der Thrombozyten bindet und über Aktivierung von G-Proteinen zu einem Ca^{2+} Influx führt. Es kommt zur Aktivierung der Thrombozyten, was mit einer Formänderung und der Ausbildung von Pseudopodien einhergeht.

Diese Oberflächenvergrößerung ermöglicht eine erhöhte Interaktion von Thrombozyten mit Endothel und Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Experimentelle und klinische Studien belegen die Bedeutung ADP-induzierter Thrombozytenaktivierung, besonders unter hohen Strömungsbedingungen, wie es im arteriellen Schenkel der Fall ist oder bei gestörter Endothelfunktion, wie es bei Atherosklerose der Fall ist (Gawaz 2001).

Im Ischämie/Reperusionsversuch zeichnet sich für diejenigen Thrombozyten, die mit ADP bzw. CyPA vorinkubiert wurden, ein stimulierender Effekt ab. Ein signifikanter Unterschied kann jedoch nur selten nachgewiesen werden. Der nicht signifikante Unterschied ist dabei redundanten Mechanismen zuzuschreiben: während der Ischämiephase wird das Endothel geschädigt und ein Entzündungsprozess provoziert, der dazu führt, dass zahlreiche Entzündungsmediatoren ausgeschüttet werden. Dadurch entsteht ein proinflammatorischer und prokoagulatorischer Zustand, der zur Aktivierung von zahlreichen Zellen u.a. auch Thrombozyten führt. Somit werden die zu Versuchsbeginn unstimulierten Thrombozyten während der Ischämiephase aktiviert und ein deutlicher Unterschied zu den zu Beginn stimulierten Thrombozyten ist nicht mehr gegeben.

Diskussion

Dadurch ist die Aussage erschwert, welchen Effekt nun CyPA auf Thrombozyten hat. Das Ziel des *in vivo* Versuches bestand darin, den stimulierenden Effekt von CyPA auf Thrombozyten, wie es in der Flusskammer gezeigt werden konnte, im lebenden Organismus zu reproduzieren. Dies konnte mit Hilfe des Darmmodells nicht gezeigt werden.

Es zeichnet sich jedoch ein eindeutiger Trend ab, indem CyPA als wichtiger proinflammatorischer Stimulus dient, der nicht nur als Entzündungsmediator dient, sondern auch dafür sorgt, dass Thrombozyten vermehrt mit der Gefäßwand interagieren.

5.3 Schlussfolgerung

CyPA spielt in zahlreichen Krankheitsprozessen eine übergeordnete Rolle. Nicht nur bei Atherosklerose und Myokardinfarkt, sondern auch bei Sepsis, rheumatoider Arthritis und neoplastischem Geschehen. Dies verdeutlicht die enorme Bedeutung dieses Proteins.

CyPA wird in atherosklerotischen Plaques exprimiert und wirkt auf zahlreiche Entzündungszellen chemotaktisch. Da die Bedeutung der Thrombozyten als Entzündungszellen immer weiter in den Vordergrund tritt, galt es zu klären, welche Auswirkungen CyPA auf Thrombozyten hat.

In vitro Versuche zeigten dabei deutlich den stimulierenden Effekt von CyPA auf Thrombozyten hat. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass dieser Effekt über den Rezeptor CD147 (EMMPRIN) vermittelt wird und mit Hilfe des Cyclosporinanalogs NIM811 gehemmt werden konnte.

Allerdings konnte in der Mikrozirkulation der Maus diese deutlichen Ergebnisse nicht eindeutig reproduziert werden. Ein Trend war jedoch erkennbar: So zeigten Thrombozyten, die mit CyPA in maximaler Konzentration inkubiert wurden, eine vermehrte Interaktion mit der Gefäßwand. Zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten während der Reperfusionphase konnte eine Signifikanz nachgewiesen werden. ADP, der potenteste Stimulus für Thrombozyten galt in diesen Versuchsansätzen als Positivkontrolle. Dabei blieb auch hier der gewünschte Effekt aus. Eine vermehrte signifikante Interaktion mit der Gefäßwand konnte nicht durchgängig erzielt werden. Aufgrund der Tatsache, dass auch ADP als nachgewiesenes stimulierendes Agens keinen eindeutigen Effekt zeigt, liegt der Schluss nahe, dass das Ischämie/Reperusionsmodell möglicherweise nicht eindeutig als Erklärungsansatz geeignet ist. Der stimulierende Effekt von CyPA sollte vielmehr mit Hilfe weiterer Modelle geklärt werden. Im Ischämie/Reperusionsversuch scheinen redundante Mechanismen im Vordergrund zu stehen, die dafür sorgen, dass sowohl die zu Versuchsbeginn unstimulierten Thrombozyten aktiviert werden, sodass anschließend nicht immer ein signifikanter Unterschied zwischen unstimulierten und stimulierten Thrombozyten zu erkennen ist. Allerdings war ein durchgehender Trend eindeutig erkennbar, der daher vermuten lässt, dass die hier festgestellten Beobachtungen zutreffen.

Zukünftig sollte geklärt werden, ob die Ergebnisse, die sich im Flusskammermodell zeigten, bei anderen Modellen reproduzierbar sind und in welchem Ausmaß CyPA für das Zusammenspiel von unterschiedlichen Entzündungszellen und Zytokinen verantwortlich ist. Weiterhin sollte geklärt werden, welcher Effekt CyPA auf die Freisetzung von Zytokinen in Thrombozyten hat und inwiefern Thrombozyten mit anderen Zellen wie z.B. Monozyten durch eine Stimulation mit CyPA interagieren.

Diskussion

Im Falle des Myokardinfarktes scheint die Beteiligung von CyPA dagegen eine deutlich größere Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass Kardiomyozyten CD147 (EMMPRIN) als Rezeptor exprimieren und dass die Zugabe von CyPA eine Verminderung der Schlagfrequenz muriner Kardiomyozyten, als auch eine gesteigerte MMP-2 Aktivität zur Folge hat.

NIM811 wird immer häufiger als zukünftiger möglicher Therapieansatz angedacht, da es in der Lage ist die durch CypA induzierten Effekte zu minimieren.

6 Zusammenfassung

Zur Wirkung von Cyclophilin A bei der Thrombozyten-Endothel Interaktion und bei ischämischen Kardiomyozyten

Im Rahmen von Entzündungsprozessen in der arteriellen Gefäßwand wie der Atherosklerose spielen Interaktionen zwischen Blutplättchen, Leukozyten und dem Endothel der Gefäßwand eine herausragende Rolle. Dabei stellen Thrombozyten das Verbindungsglied zwischen Entzündung, Thrombose und Atherogenese dar. Cyclophilin A (CyPA) und sein Rezeptor das Glykoprotein CD147 (EMMPRIN) werden bei Atherosklerose vermehrt in der Schulterregion der fibrösen Kappe vorgefunden, welche eine Prädilektionsstelle für eine Plaqueruptur darstellt. Folgeerscheinungen einer Ruptur sind je nach Lokalisation ein Myokardinfarkt oder ein Schlaganfall.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von CyPA auf die Funktion der Blutplättchen zu untersuchen. Da Cyclophilin B (CyPB) auch an CD147 (EMMPRIN) binden kann, wurde der Einfluss von CyPB auf die Funktion der Blutplättchen mituntersucht.

Dabei wurde die Flusskammer als Modell für das arterielle Strömungsgebiet gewählt. Die Interaktionen von Thrombozyten mit Endothel und Kollagen standen dabei im Vordergrund. Die aus diesem Versuch gewonnenen Erkenntnisse sollten anschließend mit Hilfe der Intravitalfluoreszenzmikroskopie im Ischämie/Reperusionsmodells am Dünndarm der Maus *in vivo* verifiziert werden.

Weiterhin galt es zu klären, welchen Einfluss CyPA auf murine Kardiomyozyten hat. Dazu wurde die Anzahl der zellulären Spontankontraktionen pro Minute gezählt.

Mit Hilfe der Flusskammer gelang der Nachweis, dass sowohl CyPA als auch CyPB in der Lage sind, Thrombozyten zu stimulieren, was sich im gesteigertem *Rolling* und vermehrter Adhäsion äußert. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt über CD147 (EMMPRIN) vermittelt wird und mit Hilfe von anti-CD147, anti-PSGL-1 und NIM811, einem Cyclosporin Analogon, gehemmt werden kann.

Im Mausmodell konnte dieser Effekt jedoch nicht so deutlich nachgewiesen werden. Die stimulierende Eigenschaft von CyPA auf Thrombozyten ist als Trend jedoch erkennbar, jedoch auch nicht signifikant unter Einfluß des als Positivkontrolle gedachten Stimulus ADP. Dies lässt darauf schließen, dass in dem verwendeten Modell der Ischämie und Reperfusion die inflammatorische Aktivierung des Gefäßsystems zu ausgeprägt ist, um den Einfluß einer Vorstimulierung der Thrombozyten erkennen zu lassen.

Zusammenfassung

Im Falle der Kardiomyozyten bewirkt CyPA eine Verminderung der Spontankontraktionen: Die Schlagfrequenz der mit CyPA behandelten Kardiomyozyten war im Vergleich zu den nur mit PBS behandelten Kardiomyozyten signifikant erniedrigt. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz wurde CD147 (EMMPRIN) als Rezeptor auf troponinpositiven Kardiomyozyten nachgewiesen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CyPA eine vermehrte MMP-2 Sekretion induziert.

Im Falle der Atherogenese ist die Rolle von CyPA auf Blutplättchen noch nicht vollständig geklärt. Neue Modelle müssen zur Klärung herangezogen werden.

Im Gegensatz hierzu ergeben sich aus der Wirkung von CyPA bei den Kardiomyozyten neue Versuchsansätze. Inhibitoren von CyPA, wie NIM811 oder der anti-EMMPRIN werden jetzt zeigen müssen, inwiefern die Wirkung von CyPA reversibel ist.

Die Hemmung der CyPA-EMMPRIN Interaktion durch Inhibitoren wie NIM811 oder Antikörper gegen EMMPRIN in komplexen Tiermodellen der Thrombusbildung bzw. Atherosklerose werden das therapeutische Potential aufzeigen müssen.

7 Summary

The effect of cyclophilin A in platelet-endothel interaction and in ischemic cardiomyocytes

In the context of inflammatory processes in the arterial wall like atherosclerosis, interactions between platelets, leukocytes and the endothelium of the vessel wall play a prominent role. Platelets represent an important linkage between inflammation, thrombosis and atherogenesis. Cyclophilin A (CyPA) and its receptor the glykoprotein CD147 (EMMRPIN) are increasingly expressed in the shoulder region of the fibrous cap, which is a predilection site for plaque rupture in atherosclerosis. The most frequent complications of plaque rupture are myocardial infarction or stroke.

The aim of the present study was to clarify the influence of CyPA on platelets. Because Cyclophilin B (CyPB) can also bind to CD147 (EMMRPIN) we clarified the influence of CyPB on platelets, too. The flow chamber was chosen as a model for arterial flow. The focus was on the interactions of platelets with endothelial cells and collagen. The findings of these experiments should be verified *in vivo* using intravital fluorescencemicroscopy in an ischemia/reperfusion model of the small intestine in mice.

Furthermore, the influence of CyPA on murine cardiac myocytes was investigated. For that we count the number of spontaneous contractions per minute with and without CyPA.

With the flow chamber it was possible to show both CyPA as well as CyPB are able to stimulate platelets, that means rolling and adhesion of the platelets along the endothelium and collagen was increased. This effect is mediated by CD147 (EMMRPIN) and it was possible to inhibit the stimulatory effect by anti-CD147, anti-PSGL-1 and the cyclosporine analoge NIM811.

In the mouse model, however the stimulatory effect was not clearly seen, but there was still one.

Using the mouse model of ischemia and reperfusion, however the stimulatory effect was only seen by trend. Since this was also the fact for ADP, which was used as positive control stimulus, we would hypothesize that the baseline inflammatory activity of the model of ischemia and reperfusion is too high to allow studying additional stimulatory effects of any test substance. Future studies have to include other mouse models to study the stimulating effects of CyPA *in vivo* (e.g. thrombus formation).

CyPA-treated cardiomyocytes showed a reduction of spontaneous contractions with a significantly reduced rate of cardiomyocyte contractions compared to PBS-treated cells.

Summary

Immunofluorescence costaining confirmed expression of CD147 (EMMPRIN) on troponin positive cardiomyocytes. Furthermore, incubation with CyPA induced secretion of MMP-2.

In conclusion the role of CyPA towards platelets is not fully clarified yet. Furthermore new models have to be established.

In contrast the effect of CyPA towards cardiomyocytes enables new opportunities. Inhibition of CyPA-EMMPRIN interaction by using NIM811 or antibodies directed against CD147 will have to analyze the therapeutic potential of this receptor-ligand pair.

8 Literaturverzeichnis

- Allain, F., C. Boutillon, C. Mariller & G. Spik (1995) Selective assay for CyPA and CyPB in human blood using highly specific anti-peptide antibodies. *J Immunol Methods*, 178, 113-20.
- Allain, F., S. Durieux, A. Denys, M. Carpentier & G. Spik (1999) Cyclophilin B binding to platelets supports calcium-dependent adhesion to collagen. *Blood*, 94, 976-83.
- Allain, F., C. Vanpouille, M. Carpentier, M. C. Slomianny, S. Durieux & G. Spik (2002) Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 2714-9.
- Allison, F., Jr., M. R. Smith & W. B. Wood, Jr. (1955) Studies on the pathogenesis of acute inflammation. I. The inflammatory reaction to thermal injury as observed in the rabbit ear chamber. *J Exp Med*, 102, 655-68.
- Arora, K., W. M. Gwinn, M. A. Bower, A. Watson, I. Okwumabua, H. R. MacDonald, M. I. Bukrinsky & S. L. Constant (2005) Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *J Immunol*, 175, 517-22.
- Azhderian, E. M., J. Kolipaka, S. Lentz & M. I. Lorber (1993) Nuclear membrane-associated cyclophilins of potential importance in cyclosporine immunosuppression. *Transplant Proc*, 25, 524-6.
- Badimon, J. J., M. Lettino, V. Toschi, V. Fuster, M. Berrozpe, J. H. Chesebro & L. Badimon (1999) Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation*, 99, 1780-7.
- Ball, R. Y., E. C. Stowers, J. H. Burton, N. R. Cary, J. N. Skepper & M. J. Mitchinson (1995) Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis*, 114, 45-54.
- Becker, B. F., B. Heindl, C. Kupatt & S. Zahler (2000) Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol*, 89, 160-7.
- Becker, M. D., S. Crespo, T. M. Martin, S. R. Planck, M. Naramura & J. T. Rosenbaum (2001) Intraocular in vivo imaging of activated T-lymphocytes expressing green-fluorescent protein after stimulation with endotoxin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 239, 609-12.
- Berditchevski, F., S. Chang, J. Bodorova & M. E. Hemler (1997) Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6. *J Biol Chem*, 272, 29174-80.

- Berlanga, O., D. Tulasne, T. Bori, D. C. Snell, Y. Miura, S. Jung, M. Moroi, J. Frampton & S. P. Watson (2002) The Fc receptor gamma-chain is necessary and sufficient to initiate signalling through glycoprotein VI in transfected cells by the snake C-type lectin, convulxin. *Eur J Biochem*, 269, 2951-60.
- Billich, A., G. Winkler, H. Aschauer, A. Rot & P. Peichl (1997) Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med*, 185, 975-80.
- Biswas, C. (1982) Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 109, 1026-34.
- Biswas, C. (1984) Collagenase stimulation in cocultures of human fibroblasts and human tumor cells. *Cancer Lett*, 24, 201-7.
- Biswas, C., Y. Zhang, R. DeCastro, H. Guo, T. Nakamura, H. Kataoka & K. Nabeshima (1995) The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res*, 55, 434-9.
- Bjorkerud, S. & B. Bjorkerud (1996) Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol*, 149, 367-80.
- Boheler, K. R., J. Czyz, D. Tweedie, H. T. Yang, S. V. Anisimov & A. M. Wobus (2002) Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res*, 91, 189-201.
- Bombeli, T., B. R. Schwartz & J. M. Harlan (1998) Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha5beta3 integrin, and GPIbalpha. *J Exp Med*, 187, 329-39.
- Braaten, D., E. K. Franke & J. Luban (1996) Cyclophilin A is required for the replication of group M human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and simian immunodeficiency virus SIV(CPZ)GAB but not group O HIV-1 or other primate immunodeficiency viruses. *J Virol*, 70, 4220-7.
- Brown, D. L., M. S. Hibbs, M. Kearney, C. Loushin & J. M. Isner (1995) Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation*, 91, 2125-31.
- Bruemmer, D., A. R. Collins, G. Noh, W. Wang, M. Territo, S. Arias-Magallona, M. C. Fishbein, F. Blaschke, U. Kintscher, K. Graf, R. E. Law & W. A. Hsueh (2003) Angiotensin II-accelerated atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice. *J Clin Invest*, 112, 1318-31.
- Bundesamt, S. 2008. Pressemitteilung des Statistischen Bundesamtes Deutschland 2008. ed. s. Bundesamt.

- Cai, H. & D. G. Harrison (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 87, 840-4.
- Camejo, G., E. Hurt-Camejo, O. Wiklund & G. Bondjers (1998) Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis*, 139, 205-22.
- Chatterji, U., M. Bobardt, S. Selvarajah, F. Yang, H. Tang, N. Sakamoto, G. Vuagniaux, T. Parkinson & P. Gallay (2009) The isomerase active site of cyclophilin a is critical for hepatitis C virus replication. *J Biol Chem*, 284, 16998-7005.
- Cheng, G. C., H. M. Loree, R. D. Kamm, M. C. Fishbein & R. T. Lee (1993) Distribution of circumferential stress in ruptured and stable atherosclerotic lesions. A structural analysis with histopathological correlation. *Circulation*, 87, 1179-87.
- Clemetson, K. J., J. L. McGregor, E. James, M. Dechavanne & E. F. Luscher (1982) Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *J Clin Invest*, 70, 304-11.
- Clemetson, J. M., J. Polgar, E. Magnenat, T. N. Wells & K. J. Clemetson (1999) The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and the natural killer receptors. *J Biol Chem*, 274, 29019-24.
- Coker, M. L., J. R. Jolly, C. Joffs, T. Etoh, J. R. Holder, B. R. Bond & F. G. Spinale (2001) Matrix metalloproteinase expression and activity in isolated myocytes after neurohormonal stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281, H543-51.
- Colgan, J., M. Asmal, B. Yu & J. Luban (2005) Cyclophilin A-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine. *J Immunol*, 174, 6030-8.
- Coppinger, J. A., G. Cagney, S. Toomey, T. Kislinger, O. Belton, J. P. McRedmond, D. J. Cahill, A. Emili, D. J. Fitzgerald & P. B. Maguire (2004) Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood*, 103, 2096-104.
- Corti, R. & V. Fuster (2003) New understanding, diagnosis, and prognosis of atherothrombosis and the role of imaging. *Am J Cardiol*, 91, 17A-26A.
- Cybulsky, M. I. & M. A. Gimbrone, Jr. (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, 251, 788-91.
- Dahme, E. & E. Weiss. 1988. Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Stuttgart: Enke.
- Damsker, J. M., I. Okwumabua, T. Pushkarsky, K. Arora, M. I. Bukrinsky & S. L. Constant (2009) Targeting the chemotactic function of CD147 reduces collagen-induced arthritis. *Immunology*, 126, 55-62.

- Daoud, A. S., D. Pankin, H. Tulgan & R. A. Florentin (1963) Aneurysms of the coronary artery. Report of ten cases and review of literature. *Am J Cardiol*, 11, 228-37.
- Davies, M. J. (1996) Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation*, 94, 2013-20.
- Davies, M. J., J. L. Gordon, A. J. Gearing, R. Pigott, N. Woolf, D. Katz & A. Kyriakopoulos (1993) The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*, 171, 223-9.
- de Boer, O. J., A. C. van der Wal, P. Teeling & A. E. Becker (1999) Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc Res*, 41, 443-9.
- Deuel, T. F., R. M. Senior, D. Chang, G. L. Griffin, R. L. Henrikson & E. T. Kaiser (1981) Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 4584-7.
- Dong, Z. M., S. M. Chapman, A. A. Brown, P. S. Frenette, R. O. Hynes & D. D. Wagner (1998) The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*, 102, 145-52.
- Eichhorn, M. E., L. Ney, S. Massberg & A. E. Goetz (2002) Platelet kinetics in the pulmonary microcirculation in vivo assessed by intravital microscopy. *J Vasc Res*, 39, 330-9.
- Elkington, P. T., C. M. O'Kane & J. S. Friedland (2005) The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol*, 142, 12-20.
- Endrich, B., K. Asaishi, A. Gotz & K. Messmer (1980) Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)*, 177, 125-34.
- Eppihimer, M. J. & D. N. Granger (1997) Ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelial interactions in postcapillary venules. *Shock*, 8, 16-25.
- Erdmann, E. 2006. Klinische Kardiologie Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße ; mit 239 Tabellen, 110 Übersichten ; [Therapie evidenzbasiert]. Heidelberg: Springer.
- Erhardt, W. 2004. Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtiersowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen ; 128 Tabellen. Stuttgart [u.a.]: Schattauer.
- Eriksson, E. E., J. Werr, Y. Guo, P. Thoren & L. Lindbom (2000) Direct observations in vivo on the role of endothelial selectins and alpha(4) integrin in cytokine-induced leukocyte-endothelium interactions in the mouse aorta. *Circ Res*, 86, 526-33.
- Ezumi, Y., T. Uchiyama & H. Takayama (2000) Molecular cloning, genomic structure, chromosomal localization, and alternative splice forms of the platelet collagen receptor glycoprotein VI. *Biochem Biophys Res Commun*, 277, 27-36.
- Falk, E. (1992) Why do plaques rupture? *Circulation*, 86, III30-42.

- Falk, E., P. K. Shah & V. Fuster (1995) Coronary plaque disruption. *Circulation*, 92, 657-71.
- Fang, F., A. J. Flegler, P. Du, S. Lin & C. V. Clevenger (2009) Expression of cyclophilin B is associated with malignant progression and regulation of genes implicated in the pathogenesis of breast cancer. *Am J Pathol*, 174, 297-308.
- Felton, C. V., D. Crook, M. J. Davies & M. F. Oliver (1997) Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, 1337-45.
- Fischer, G., H. Bang & C. Mech (1984) [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]. *Biomed Biochim Acta*, 43, 1101-11.
- Fischer, G., B. Wittmann-Liebold, K. Lang, T. Kiefhaber & F. X. Schmid (1989) Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*, 337, 476-8.
- Frenette, P. S., C. V. Denis, L. Weiss, K. Jurk, S. Subbarao, B. Kehrel, J. H. Hartwig, D. Vestweber & D. D. Wagner (2000) P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med*, 191, 1413-22.
- Frenette, P. S., R. C. Johnson, R. O. Hynes & D. D. Wagner (1995) Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7450-4.
- Frenette, P. S., C. Moyna, D. W. Hartwell, J. B. Lowe, R. O. Hynes & D. D. Wagner (1998) Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood*, 91, 1318-24.
- Frenette, P. S. & D. D. Wagner (1996) Adhesion molecules--Part 1. *N Engl J Med*, 334, 1526-9.
- Fruman, D. A., S. J. Burakoff & B. E. Bierer (1994) Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB J*, 8, 391-400.
- Fukuta, H. & W. C. Little (2007) Contribution of systolic and diastolic abnormalities to heart failure with a normal and a reduced ejection fraction. *Prog Cardiovasc Dis*, 49, 229-40.
- Galat, A. (1993) Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem*, 216, 689-707.
- Galis, Z. S., G. K. Sukhova, M. W. Lark & P. Libby (1994b) Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 94, 2493-503.
- Gawaz, M. 2001a. blood platelets. 190. Stuttgart: Thieme.
- Gawaz, M. (2004) Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res*, 61, 498-511.

- Gawaz, M., H. Langer & A. E. May (2005) Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*, 115, 3378-84.
- Gawaz, M., F. J. Neumann, T. Dickfeld, A. Reininger, H. Adelsberger, A. Gebhardt & A. Schomig (1997) Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation*, 96, 1809-18.
- Gawaz, M., F. J. Neumann, I. Ott, A. Schiessler & A. Schomig (1996) Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation*, 93, 229-37.
- Gibbins, J., J. Asselin, R. Farndale, M. Barnes, C. L. Law & S. P. Watson (1996) Tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain in collagen-stimulated platelets. *J Biol Chem*, 271, 18095-9.
- Gimbrone, M. A., Jr. (1995) Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol*, 75, 67B-70B.
- Gimbrone, M. A., Jr., T. Nagel & J. N. Topper (1997) Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest*, 100, S61-5.
- Glass, C. K. & J. L. Witztum (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*, 104, 503-16.
- Gothel, S. F. & M. A. Marahiel (1999) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci*, 55, 423-36.
- Grayson, M. H., D. D. Chaplin, I. E. Karl & R. S. Hotchkiss (2001) Confocal fluorescent intravital microscopy of the murine spleen. *J Immunol Methods*, 256, 55-63.
- Griendling, K. K. & G. A. FitzGerald (2003) Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation*, 108, 2034-40.
- Handschumacher, R. E., M. W. Harding, J. Rice, R. J. Drugge & D. W. Speicher (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*, 226, 544-7.
- Hansson, G. K. (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 352, 1685-95.
- Harris, A. G., R. Leiderer, F. Peer & K. Messmer (1996) Skeletal muscle microvascular and tissue injury after varying durations of ischemia. *Am J Physiol*, 271, H2388-98.
- Haug, C., C. Lenz, F. Diaz & M. G. Bachem (2004) Oxidized low-density lipoproteins stimulate extracellular matrix metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) release by coronary smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 1823-9.
- He, Z., L. Li & S. Luan (2004) Immunophilins and parvulins. Superfamily of peptidyl prolyl isomerases in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 134, 1248-67.
- Heffner, J. E., S. A. Sahn & J. E. Repine (1987) The role of platelets in the adult respiratory distress syndrome. Culprits or bystanders? *Am Rev Respir Dis*, 135, 482-92.

Literaturverzeichnis

- Hescheler, J., B. K. Fleischmann, S. Lentini, V. A. Maltsev, J. Rohwedel, A. M. Wobus & K. Addicks (1997) Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res*, 36, 149-62.
- Heusch, G., R. Schulz, D. Baumgart, M. Haude & R. Erbel (2001) Coronary microembolization. *Prog Cardiovasc Dis*, 44, 217-30.
- Igakura, T., K. Kadomatsu, T. Kaname, H. Muramatsu, Q. W. Fan, T. Miyauchi, Y. Toyama, N. Kuno, S. Yuasa, M. Takahashi, T. Senda, O. Taguchi, K. Yamamura, K. Arimura & T. Muramatsu (1998) A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis. *Dev Biol*, 194, 152-65.
- Janssen, G. H., G. J. Tangelder, M. G. Oude Egbrink & R. S. Reneman (1994) Spontaneous leukocyte rolling in venules in untraumatized skin of conscious and anesthetized animals. *Am J Physiol*, 267, H1199-204.
- Jauch, K.-W. 2007. Chirurgie - Basisweiterbildung in 99 Schritten durch den common trunk ; mit 155 Tabellen. Heidelberg: Springer.
- Jin, Z. G., A. O. Lungu, L. Xie, M. Wang, C. Wong & B. C. Berk (2004) Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 1186-91.
- Jin, Z. G., M. G. Melaragno, D. F. Liao, C. Yan, J. Haendeler, Y. A. Suh, J. D. Lambeth & B. C. Berk (2000) Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ Res*, 87, 789-96.
- Kallen, J., R. Sedrani, G. Zenke & J. Wagner (2005) Structure of human cyclophilin A in complex with the novel immunosuppressant sanglifehrin A at 1.6 Å resolution. *J Biol Chem*, 280, 21965-71.
- Kasinrerk, W., E. Fiebiger, I. Stefanova, T. Baumruker, W. Knapp & H. Stockinger (1992) Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule. *J Immunol*, 149, 847-54.
- Katsuda, S. & T. Kaji (2003) Atherosclerosis and extracellular matrix. *J Atheroscler Thromb*, 10, 267-74.
- Ke, H. M., L. D. Zydowsky, J. Liu & C. T. Walsh (1991) Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin A at 2.5 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 9483-7.
- Kim, H., W. J. Kim, S. T. Jeon, E. M. Koh, H. S. Cha, K. S. Ahn & W. H. Lee (2005) Cyclophilin A may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages. *Clin Immunol*, 116, 217-24.

- Kim, J. Y., W. J. Kim, H. Kim, K. Suk & W. H. Lee (2009) The Stimulation of CD147 Induces MMP-9 Expression through ERK and NF-kappaB in Macrophages: Implication for Atherosclerosis. *Immune Netw*, 9, 90-7.
- Kim, S. H., S. M. Lessner, Y. Sakurai & Z. S. Galis (2004) Cyclophilin A as a novel biphasic mediator of endothelial activation and dysfunction. *Am J Pathol*, 164, 1567-74.
- Kitt, T. 1982. Lehrbuch der allgemeinen Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin. Stuttgart: Enke.
- Koch, C., G. Staffler, R. Huttinger, I. Hilgert, E. Prager, J. Cerny, P. Steinlein, O. Majdic, V. Horejsi & H. Stockinger (1999) T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density. *Int Immunol*, 11, 777-86.
- Koletsky, A. J., M. W. Harding & R. E. Handschumacher (1986) Cyclophilin: distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues. *J Immunol*, 137, 1054-9.
- Koseki, S., S. Miura, H. Fujimori, R. Hokari, S. Komoto, Y. Hara, T. Ogino, H. Nagata, M. Goto, S. Hachimura, S. Kaminogawa & H. Ishii (2001) In situ demonstration of intraepithelial lymphocyte adhesion to villus microvessels of the small intestine. *Int Immunol*, 13, 1165-74.
- Kontinen, Y. T., T. F. Li, J. Mandelin, M. Liljestrom, T. Sorsa, S. Santavirta & I. Virtanen (2000) Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*, 43, 275-80.
- Le Hir, M., Q. Su, L. Weber, G. Woerly, A. Granelli-Piperno & B. Ryffel (1995) In situ detection of cyclosporin A: evidence for nuclear localization of cyclosporine and cyclophilins. *Lab Invest*, 73, 727-33.
- Lehr, H. A., M. D. Menger & K. Messmer (1993) Impact of leukocyte adhesion on myocardial ischemia/reperfusion injury: conceivable mechanisms and proven facts. *J Lab Clin Med*, 121, 539-45.
- Lendon, C. L., M. J. Davies, G. V. Born & P. D. Richardson (1991) Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophages density is increased. *Atherosclerosis*, 87, 87-90.
- Ley, K. (1996) Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res*, 32, 733-42.
- Li, H., M. I. Cybulsky, M. A. Gimbrone, Jr. & P. Libby (1993) An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb*, 13, 197-204.
- Li, M., Q. Zhai, U. Bharadwaj, H. Wang, F. Li, W. E. Fisher, C. Chen & Q. Yao (2006) Cyclophilin A is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates cell proliferation through CD147. *Cancer*, 106, 2284-94.

Literaturverzeichnis

- Li, Y. Y., C. F. McTiernan & A. M. Feldman (2000) Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res*, 46, 214-24.
- Li, Z., L. Li, H. R. Zielke, L. Cheng, R. Xiao, M. T. Crow, W. G. Stetler-Stevenson, J. Froehlich & E. G. Lakatta (1996b) Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 148, 121-8.
- Liang, L., T. Major & T. Bocan (2002) Characterization of the promoter of human extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN). *Gene*, 282, 75-86.
- Libby, P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420, 868-74.
- Libby, P. (2006) Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr*, 83, 456S-460S.
- Libby, P. (2008) The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Intern Med*, 263, 517-27.
- Libby, P. (2009) Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Lipid Res*, 50 Suppl, S352-7.
- Lindner, V., J. Fingerle & M. A. Reidy (1993) Mouse model of arterial injury. *Circ Res*, 73, 792-6.
- Liu, J., J. D. Farmer, Jr., W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman & S. L. Schreiber (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, 66, 807-15.
- Liu, S. K., L. P. Tilley, J. P. Tappe & P. R. Fox (1986) Clinical and pathologic findings in dogs with atherosclerosis: 21 cases (1970-1983). *J Am Vet Med Assoc*, 189, 227-32.
- Lloyd-Jones, D., R. Adams, M. Carnethon, G. De Simone, T. B. Ferguson, K. Flegal, E. Ford, K. Furie, A. Go, K. Greenlund, N. Haase, S. Hailpern, M. Ho, V. Howard, B. Kissela, S. Kittner, D. Lackland, L. Lisabeth, A. Marelli, M. McDermott, J. Meigs, D. Mozaffarian, G. Nichol, C. O'Donnell, V. Roger, W. Rosamond, R. Sacco, P. Sorlie, R. Stafford, J. Steinberger, T. Thom, S. Wasserthiel-Smoller, N. Wong, J. Wylie-Rosett & Y. Hong (2009) Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 119, e21-181.
- Lloyd-Jones, D. M., M. G. Larson, A. Beiser & D. Levy (1999) Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet*, 353, 89-92.
- Loree, H. M., R. D. Kamm, R. G. Stringfellow & R. T. Lee (1992) Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels. *Circ Res*, 71, 850-8.
- Lusis, A. J. (2000) Atherosclerosis. *Nature*, 407, 233-41.

- Major, T. C., L. Liang, X. Lu, W. Rosebury & T. M. Bocan (2002) Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is induced upon monocyte differentiation and is expressed in human atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 1200-7.
- Mariller, C., F. Allain, M. Kouach & G. Spik (1996) Evidence that human milk isolated cyclophilin B corresponds to a truncated form. *Biochim Biophys Acta*, 1293, 31-8.
- Massberg, S., K. Brand, S. Gruner, S. Page, E. Muller, I. Muller, W. Bergmeier, T. Richter, M. Lorenz, I. Konrad, B. Nieswandt & M. Gawaz (2002) A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*, 196, 887-96.
- Massberg, S., S. Eisenmenger, G. Enders, F. Krombach & K. Messmer (1998a) Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl)*, 198, 23-35.
- Massberg, S., G. Enders, R. Leiderer, S. Eisenmenger, D. Vestweber, F. Krombach & K. Messmer (1998b) Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood*, 92, 507-15.
- Massberg, S., G. Enders, F. C. Matos, L. I. Tomic, R. Leiderer, S. Eisenmenger, K. Messmer & F. Krombach (1999) Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood*, 94, 3829-38.
- Massberg, S., M. Gawaz, S. Gruner, V. Schulte, I. Konrad, D. Zohlnhofer, U. Heinzmann & B. Nieswandt (2003) A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med*, 197, 41-9.
- Massberg, S., I. Konrad, A. Bultmann, C. Schulz, G. Munch, M. Peluso, M. Lorenz, S. Schneider, F. Besta, I. Muller, B. Hu, H. Langer, E. Kremmer, M. Rudelius, U. Heinzmann, M. Ungerer & M. Gawaz (2004) Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *FASEB J*, 18, 397-9.
- Massberg, S., I. Konrad, K. Schurzinger, M. Lorenz, S. Schneider, D. Zohlnhoefer, K. Hoppe, M. Schiemann, E. Kennerknecht, S. Sauer, C. Schulz, S. Kerstan, M. Rudelius, S. Seidl, F. Sorge, H. Langer, M. Peluso, P. Goyal, D. Vestweber, N. R. Emambokus, D. H. Busch, J. Frampton & M. Gawaz (2006) Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med*, 203, 1221-33.
- May, A. E., P. Seizer & M. Gawaz (2008) Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, s5-10.
- Mayrovitz, H. N. (1992) Leukocyte rolling: a prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice. *Am J Physiol*, 262, H157-61.

- McDonald, M. L., T. Ardito, W. H. Marks, M. Kashgarian & M. I. Lorber (1992) The effect of cyclosporine administration on the cellular distribution and content of cyclophilin. *Transplantation*, 53, 460-6.
- Menger, M. D. & H. A. Lehr (1993) Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today*, 14, 519-22.
- Miyauchi, T., T. Kanekura, A. Yamaoka, M. Ozawa, S. Miyazawa & T. Muramatsu (1990) Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the beta-chain of major histocompatibility complex class II antigen. *J Biochem*, 107, 316-23.
- Moore, K. L. (1998) Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Leuk Lymphoma*, 29, 1-15.
- Moore, K. L., K. D. Patel, R. E. Bruehl, F. Li, D. A. Johnson, H. S. Lichenstein, R. D. Cummings, D. F. Bainton & R. P. McEver (1995) P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol*, 128, 661-71.
- Morgenstern, E. (1995) The formation of compound granules from different types of secretory organelles in human platelets (dense granules and alpha-granules). A cryofixation/-substitution study using serial sections. *Eur J Cell Biol*, 68, 183-90.
- Moroi, M. & S. M. Jung (2004) Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res*, 114, 221-33.
- Moroi, M., S. M. Jung, M. Okuma & K. Shinmyozu (1989) A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest*, 84, 1440-5.
- Muramatsu, T. & T. Miyauchi (2003) Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol*, 18, 981-7.
- Murray, C. J. & A. D. Lopez (1997) Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 349, 1436-42.
- Nabeshima, K., H. Iwasaki, K. Koga, H. Hojo, J. Suzumiya & M. Kikuchi (2006) Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathol Int*, 56, 359-67.
- Nabeshima, K., J. Suzumiya, M. Nagano, K. Ohshima, B. P. Toole, K. Tamura, H. Iwasaki & M. Kikuchi (2004) Emmprin, a cell surface inducer of matrix metalloproteinases
- Naruhashi, K., K. Kadomatsu, T. Igakura, Q. W. Fan, N. Kuno, H. Muramatsu, T. Miyauchi, T. Hasegawa, A. Itoh, T. Muramatsu & T. Nabeshima (1997) Abnormalities of sensory and memory functions in mice lacking Bsg gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 236, 733-7.

- Nie, R., S. Xie, B. Du, X. Liu, B. Deng & J. Wang (2009) Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is increased in human left ventricle after acute myocardial infarction. *Arch Med Res*, 40, 605-11.
- Nieswandt, B., W. Bergmeier, V. Schulte, K. Rackebrandt, J. E. Gessner & H. Zirngibl (2000) Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRgamma chain. *J Biol Chem*, 275, 23998-4002.
- Nieswandt, B., C. Brakebusch, W. Bergmeier, V. Schulte, D. Bouvard, R. Mokhtari-Nejad, T. Lindhout, J. W. Heemskerk, H. Zirngibl & R. Fassler (2001) Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J*, 20, 2120-30.
- Nieswandt, B. & S. P. Watson (2003) Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*, 102, 449-61.
- Nikkari, S. T., K. D. O'Brien, M. Ferguson, T. Hatsukami, H. G. Welgus, C. E. Alpers & A. W. Clowes (1995) Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation*, 92, 1393-8.
- Nolte, D., R. Hecht, P. Schmid, A. Botzlar, M. D. Menger, C. Neumueller, F. Sinowatz, D. Vestweber & K. Messmer (1994) Role of Mac-1 and ICAM-1 in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model of BALB/C mice. *Am J Physiol*, 267, H1320-8.
- Norgard, K. E., K. L. Moore, S. Diaz, N. L. Stults, S. Ushiyama, R. P. McEver, R. D. Cummings & A. Varki (1993) Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells. A minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides. *J Biol Chem*, 268, 12764-74.
- Paigen, B., A. S. Plump & E. M. Rubin (1994) The mouse as a model for human cardiovascular disease and hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol*, 5, 258-64.
- Payeli, S. K., C. Schiene-Fischer, J. Steffel, G. G. Camici, I. Rozenberg, T. F. Luscher & F. C. Tanner (2008) Cyclophilin A differentially activates monocytes and endothelial cells: role of purity, activity, and endotoxin contamination in commercial preparations. *Atherosclerosis*, 197, 564-71.
- Penz, S., A. J. Reininger, R. Brandl, P. Goyal, T. Rabie, I. Bernlochner, E. Rother, C. Goetz, B. Engelmann, P. A. Smethurst, W. H. Ouwehand, R. Farndale, B. Nieswandt & W. Siess (2005) Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *FASEB J*, 19, 898-909.
- Piccardoni, P., V. Evangelista, A. Piccoli, G. de Gaetano, A. Walz & C. Cerletti (1996) Thrombin-activated human platelets release two NAP-2 variants that stimulate polymorphonuclear leukocytes. *Thromb Haemost*, 76, 780-5.

- Poston, R. N., D. O. Haskard, J. R. Coucher, N. P. Gall & R. R. Johnson-Tidey (1992) Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*, 140, 665-73.
- Pötzsch & Madlener. Hämostaseologie. Springer Berlin Heidelberg.
- Pushkarsky, T., V. Yurchenko, C. Vanpouille, B. Brichacek, I. Vaisman, S. Hatakeyama, K. I. Nakayama, B. Sherry & M. I. Bukrinsky (2005) Cell surface expression of CD147/EMMPRIN is regulated by cyclophilin 60. *J Biol Chem*, 280, 27866-71.
- Qiao, J. H., J. Tripathi, N. K. Mishra, Y. Cai, S. Tripathi, X. P. Wang, S. Imes, M. C. Fishbein, S. K. Clinton, P. Libby, A. J. Lusis & T. B. Rajavashisth (1997) Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol*, 150, 1687-99.
- Read, T. A., M. Farhadi, R. Bjerkvig, B. R. Olsen, A. M. Rokstad, P. C. Huszthy & P. Vajkoczy (2001) Intravital microscopy reveals novel antivascular and antitumor effects of endostatin delivered locally by alginate-encapsulated cells. *Cancer Res*, 61, 6830-7.
- Renno, T., A. Wilson, C. Dunkel, I. Coste, K. Maisnier-Patin, A. Benoit de Coignac, J. P. Aubry, R. K. Lees, J. Y. Bonnefoy, H. R. MacDonald & J. F. Gauchat (2002) A role for CD147 in thymic development. *J Immunol*, 168, 4946-50.
- Riethdorf, S., N. Reimers, V. Assmann, J. W. Kornfeld, L. Terracciano, G. Sauter & K. Pantel (2006) High incidence of EMMPRIN expression in human tumors. *Int J Cancer*, 119, 1800-10.
- Rollins, B. J., T. Yoshimura, E. J. Leonard & J. S. Pober (1990) Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol*, 136, 1229-33.
- Romo, G. M., J. F. Dong, A. J. Schade, E. E. Gardiner, G. S. Kansas, C. Q. Li, L. V. McIntire, M. C. Berndt & J. A. Lopez (1999) The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med*, 190, 803-14.
- Ross, R. (1995) Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*, 57, 791-804.
- Ross, R. (1999a) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340, 115-26.
- Ross, R. (1999b) Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*, 138, S419-20.
- Ross, R. & J. A. Glomset (1973) Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*, 180, 1332-9.
- Ruggeri, Z. M. (2002) Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*, 8, 1227-34.
- Rycyzyn, M. A. & C. V. Clevenger (2002) The intranuclear prolactin/cyclophilin B complex as a transcriptional inducer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 6790-5.

- Ryffel, B., G. Woerly, B. Greiner, B. Haendler, M. J. Mihatsch & B. M. Foxwell (1991) Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues. *Immunology*, 72, 399-404.
- Satoh, K., P. Nigro & B. C. Berk (2010) Oxidative stress and vascular smooth muscle cell growth: a mechanistic linkage by cyclophilin A. *Antioxid Redox Signal*, 12, 675-82.
- Satoh, K., P. Nigro, T. Matoba, M. R. O'Dell, Z. Cui, X. Shi, A. Mohan, C. Yan, J. Abe, K. A. Illig & B. C. Berk (2009) Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms. *Nat Med*, 15, 649-56.
- Schlosshauer, B., H. Bauch & R. Frank (1995) Neurothelin: amino acid sequence, cell surface dynamics and actin colocalization. *Eur J Cell Biol*, 68, 159-66.
- Schmidt, R., A. Bultmann, S. Fischel, A. Gillitzer, P. Cullen, A. Walch, P. Jost, M. Ungerer, N. D. Tolley, S. Lindemann, M. Gawaz, A. Schomig & A. E. May (2008) Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor kappaB-dependent inflammation in monocytes. *Circ Res*, 102, 302-9.
- Schmidt, R., A. Bultmann, M. Ungerer, N. Joghetaei, O. Bulbul, S. Thieme, T. Chavakis, B. P. Toole, M. Gawaz, A. Schomig & A. E. May (2006) Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction. *Circulation*, 113, 834-41.
- Schönberger, T., D. Siegel-Axel, R. Buszl, S. Richter, M. S. Judenhofer, R. Haubner, G. Reischl, K. Klingel, G. Munch, P. Seizer, B. J. Pichler & M. Gawaz (2008) The immunoadhesin glycoprotein VI-Fc regulates arterial remodelling after mechanical injury in ApoE^{-/-} mice. *Cardiovasc Res*, 80, 131-7.
- Schulz, C., S. Penz, C. Hoffmann, H. Langer, A. Gillitzer, S. Schneider, R. Brandl, S. Seidl, S. Massberg, B. Pichler, E. Kremmer, K. Stellos, T. Schonberger, W. Siess & M. Gawaz (2008) Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession in vivo. *Basic Res Cardiol*, 103, 356-67.
- Seizer, P., O. Borst, H. F. Langer, A. Bultmann, G. Munch, Y. Herouy, K. Stellos, B. Kramer, B. Bigalke, B. Buchele, M. G. Bachem, D. Vestweber, T. Simmet, M. Gawaz & A. E. May (2009a) EMMPRIN (CD147) is a novel receptor for platelet GPVI and mediates platelet rolling via GPVI-EMMPRIN interaction. *Thromb Haemost*, 101, 682-6.
- Seizer, P., T. Schonberger, M. Schott, R. L. M, H. F. Langer, B. Bigalke, B. F. Kramer, O. Borst, K. Daub, O. Heidenreich, R. Schmidt, S. Lindemann, Y. Herouy, M. Gawaz & A. E. May (2009b) EMMPRIN and its ligand cyclophilin A regulate MT1-MMP, MMP-9 and M-CSF during foam cell formation. *Atherosclerosis*.

- Seko, Y., T. Fujimura, H. Taka, R. Mineki, K. Murayama & R. Nagai (2004) Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 317, 162-8.
- Sherry, B., N. Yarlett, A. Strupp & A. Cerami (1992) Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 3511-5.
- Siegel-Axel, D., H. Langer, S. Lindemann & M. Gawaz (2006) [Role of platelets in atherosclerosis and inflammation]. *Med Klin (Munich)*, 101, 467-75.
- Siwik, D. A., P. J. Pagano & W. S. Colucci (2001) Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C53-60.
- Skalen, K., M. Gustafsson, E. K. Rydberg, L. M. Hulten, O. Wiklund, T. L. Innerarity & J. Boren (2002) Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*, 417, 750-4.
- Skyschally, A., R. Erbel & G. Heusch (2003) Coronary microembolization. *Circ J*, 67, 279-86.
- Smith, J. D., E. Trogan, M. Ginsberg, C. Grigaux, J. Tian & M. Miyata (1995) Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8264-8.
- Spinale, F. G., M. L. Coker, L. J. Heung, B. R. Bond, H. R. Gunasinghe, T. Etoh, A. T. Goldberg, J. L. Zellner & A. J. Crumbley (2000) A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation*, 102, 1944-9.
- Stamnes, M. A., S. L. Rutherford & C. S. Zuker (1992) Cyclophilins: a new family of proteins involved in intracellular folding. *Trends Cell Biol*, 2, 272-6.
- Subramaniam, M., P. S. Frenette, S. Saffaripour, R. C. Johnson, R. O. Hynes & D. D. Wagner (1996) Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice. *Blood*, 87, 1238-42.
- Sugiyama, T., M. Okuma, F. Ushikubi, S. Sensaki, K. Kanaji & H. Uchino (1987) A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood*, 69, 1712-20.
- Sun, J. & M. E. Hemler (2001) Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res*, 61, 2276-81.
- Sun, J., G. K. Sukhova, P. J. Wolters, M. Yang, S. Kitamoto, P. Libby, L. A. MacFarlane, J. Mallen-St Clair & G. P. Shi (2007) Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. *Nat Med*, 13, 719-24.

- Suter, P., F. 2006. *Praktikum der Hundeklinik*. Stuttgart: Suter, Peter F. Arnold-Gloor, Susi Parey.
- Suzuki, J., Z. G. Jin, D. F. Meoli, T. Matoba & B. C. Berk (2006) Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 98, 811-7.
- Tang, W., S. B. Chang & M. E. Hemler (2004) Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. *Mol Biol Cell*, 15, 4043-50.
- Tang, W. & M. E. Hemler (2004) Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering. *J Biol Chem*, 279, 11112-8.
- Tang, Y., M. T. Nakada, P. Kesavan, F. McCabe, H. Millar, P. Rafferty, P. Bugelski & L. Yan (2005) Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. *Cancer Res*, 65, 3193-9.
- Tegeder, I., A. Schumacher, S. John, H. Geiger, G. Geisslinger, H. Bang & K. Brune (1997) Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis. *J Clin Immunol*, 17, 380-6.
- Thygesen, K., J. S. Alpert, H. D. White, A. S. Jaffe, F. S. Apple, M. Galvani, H. A. Katus, L. K. Newby, J. Ravkilde, B. Chaitman, P. M. Clemmensen, M. Dellborg, H. Hod, P. Porela, R. Underwood, J. J. Bax, G. A. Beller, R. Bonow, E. E. Van der Wall, J. P. Bassand, W. Wijns, T. B. Ferguson, P. G. Steg, B. F. Uretsky, D. O. Williams, P. W. Armstrong, E. M. Antman, K. A. Fox, C. W. Hamm, E. M. Ohman, M. L. Simoons, P. A. Poole-Wilson, E. P. Gurfinkel, J. L. Lopez-Sendon, P. Pais, S. Mendis, J. R. Zhu, L. C. Wallentin, F. Fernandez-Aviles, K. M. Fox, A. N. Parkhomenko, S. G. Priori, M. Tendera, L. M. Voipio-Pulkki, A. Vahanian, A. J. Camm, R. De Caterina, V. Dean, K. Dickstein, G. Filippatos, C. Funck-Brentano, I. Hellemans, S. D. Kristensen, K. McGregor, U. Sechtem, S. Silber, P. Widimsky, J. L. Zamorano, J. Morais, S. Brener, R. Harrington, D. Morrow, M. Lim, M. A. Martinez-Rios, S. Steinhubl, G. N. Levine, W. B. Gibler, D. Goff, M. Tubaro, D. Dudek & N. Al-Attar (2007) Universal definition of myocardial infarction. *Circulation*, 116, 2634-53.
- Tolonen, H., A. Dobson & S. Kulathinal (2005) Effect on trend estimates of the difference between survey respondents and non-respondents: results from 27 populations in the WHO MONICA Project. *Eur J Epidemiol*, 20, 887-98.
- Tomita, T., T. Nakase, M. Kaneko, K. Shi, K. Takahi, T. Ochi & H. Yoshikawa (2002) Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 46, 373-8.
- Vajkoczy, P., A. Ullrich & M. D. Menger (2000) Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia*, 2, 53-61.

- Van Lint, P. & C. Libert (2007) Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol*, 82, 1375-81.
- Vanhoutte, D., M. Schellings, Y. Pinto & S. Heymans (2006) Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc Res*, 69, 604-13.
- Varga-Szabo, D., I. Pleines & B. Nieswandt (2008) Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 403-12.
- Virmani, R., F. D. Kolodgie, A. P. Burke, A. Farb & S. M. Schwartz (2000) Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1262-75.
- Vollmar, B., M. Morgenthaler, M. Amon & M. D. Menger (2000) Skin microvascular adaptations during maturation and aging of hairless mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279, H1591-9.
- Waldmeier, P. C., J. J. Feldtrauer, T. Qian & J. J. Lemasters (2002) Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811. *Mol Pharmacol*, 62, 22-9.
- Wang, L., C. H. Wang, J. F. Jia, X. K. Ma, Y. Li, H. B. Zhu, H. Tang, Z. N. Chen & P. Zhu (2010) Contribution of cyclophilin A to the regulation of inflammatory processes in rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol*, 30, 24-33.
- Watson, S. P., J. M. Auger, O. J. McCarty & A. C. Pearce (2005) GPVI and integrin α IIb β 3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost*, 3, 1752-62.
- Weber, C. (2005) Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res*, 96, 612-6.
- Welgus, H. G., E. J. Campbell, J. D. Cury, A. Z. Eisen, R. M. Senior, S. M. Wilhelm & G. I. Goldberg (1990) Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development. *J Clin Invest*, 86, 1496-502.
- Wiedeman, M. P. (1973) Preparation of the bat wing for in vivo microscopy. *Microvasc Res*, 5, 417-22.
- Xu, Q., M. C. Leiva, S. A. Fischkoff, R. E. Handschumacher & C. R. Lyttle (1992) Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J Biol Chem*, 267, 11968-71.
- Yan, L., S. Zucker & B. P. Toole (2005) Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. *Thromb Haemost*, 93, 199-204.
- Yang, Y., N. Lu, J. Zhou, Z. N. Chen & P. Zhu (2008) Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 47, 1299-310.

Literaturverzeichnis

- Yoshida, S., M. Shibata, S. Yamamoto, M. Hagihara, N. Asai, M. Takahashi, S. Mizutani, T. Muramatsu & K. Kadomatsu (2000) Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its N-terminal immunoglobulin domain. *Eur J Biochem*, 267, 4372-80.
- Yoshimura, K., H. Aoki, Y. Ikeda, K. Fujii, N. Akiyama, A. Furutani, Y. Hoshii, N. Tanaka, R. Ricci, T. Ishihara, K. Esato, K. Hamano & M. Matsuzaki (2005) Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Nat Med*, 11, 1330-8.
- Yurchenko, V., S. Constant & M. Bukrinsky (2006) Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins. *Immunology*, 117, 301-9.
- Yurchenko, V., M. O'Connor, W. W. Dai, H. Guo, B. Toole, B. Sherry & M. Bukrinsky (2001) CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B. *Biochem Biophys Res Commun*, 288, 786-8.
- Yurchenko, V., T. Pushkarsky, J. H. Li, W. W. Dai, B. Sherry & M. Bukrinsky (2005) Regulation of CD147 cell surface expression: involvement of the proline residue in the CD147 transmembrane domain. *J Biol Chem*, 280, 17013-9.
- Yurchenko, V., G. Zybarth, M. O'Connor, W. W. Dai, G. Franchin, T. Hao, H. Guo, H. C. Hung, B. Toole, P. Gallay, B. Sherry & M. Bukrinsky (2002) Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J Biol Chem*, 277, 22959-65.
- Zander, K., M. P. Sherman, U. Tessmer, K. Bruns, V. Wray, A. T. Prectel, E. Schubert, P. Henklein, J. Luban, J. Neidleman, W. C. Greene & U. Schubert (2003) Cyclophilin A interacts with HIV-1 Vpr and is required for its functional expression. *J Biol Chem*, 278, 43202-13.
- Zavadzkas, J. A., R. A. Plyler, S. Bouges, C. N. Koval, W. T. Rivers, C. U. Beck, E. I. Chang, R. E. Stroud, R. Mukherjee & F. G. Spinale (2008) Cardiac-restricted overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer causes myocardial remodeling and dysfunction in aging mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295, H1394-402.
- Zhou, S., H. Zhou, P. J. Walian & B. K. Jap (2005) CD147 is a regulatory subunit of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease amyloid beta-peptide production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 7499-504.
- Zolotareva, A. G. & M. E. Kogan (1978) Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice. *Cor Vasa*, 20, 308-14.

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über Speichergranula mit Inhaltsstoffen

Tab. 2: Aufstellung über die jeweiligen Speichergranula mit ihren Inhaltsstoffen

10 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Initiierung der atherosklerotischen Läsionsbildung
- Abb. 2:** Progression der atherosklerotischen Läsion
- Abb. 3:** Verlaufsformen von Atherosklerose
- Abb. 4:** Verminderung der Kollagensynthese und Abbau von Kollagen
- Abb. 5:** Ruptur der Gefäßwand-Plaque
- Abb. 6:** Ruhende (diskoide Form) und aktivierte Thrombozyten
(Echinospherozyten)
- Abb. 7:** Thrombozyten-Endothel Interaktion
- Abb. 8:** Struktur von CD147 (EMMPRIN)
- Abb. 9:** Die Peptidyl-Prolyl-cis / trans-Isomerase: Umwandlung von cis zu trans
Peptidyl-Prolyl Brücken
- Abb. 10:** Aufbau von Cyclophilin A
- Abb. 11:** Wirkungsweise von Cyp60: Intrazellulärer Transport von CD147
(EMMPRIN)
- Abb. 12:** Struktur von Glykoprotein VI
- Abb. 13:** Schematischer Aufbau der Flusskammer
- Abb. 14:** Versuchsaufbau einer dynamischen Flusskammeruntersuchung
- Abb. 15:** Entwicklung und Kultivierung von Kardiomyozyten
- Abb. 16:** Schematischer Aufbau des Arbeitsplatzes für die intravitale Mikroskopie
- Abb. 17:** Korrekte Lage des Vena Jugularis-Katheters
- Abb. 18:** Mikroskopische Darstellung eines ausgelagerten Darmsegmentes
einer Maus
- Abb. 19:** Mikroskopische Darstellung eines ausgelagerten Darmsegmentes
während der Ischämiephase mit Ligatur der Mesenterialgefäße und der
betroffenen Darmsegmente

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 20:** CyPA oder CyPB induziert bei aktivierten humanen Endothelzellen vermehrtes thrombozytäres *Rolling* und Adhäsion
- Abb. 21:** CyPA induziert thrombozytäres *Rolling* und Adhäsion an humane Endothelzellen (HUVEC) über CyPA-CD147 Interaktion
- Abb. 22:** CyPB induziert thrombozytäres *Rolling* und Adhäsion an humane Endothelzellen (HUVEC) über CyPB-CD147 Interaktion
- Abb. 23:** Thrombozytäres *Rolling*, welches durch CyPA-CD147 Interaktion induziert wird, wird über PSGL-1 vermittelt
- Abb. 24:** Thrombozytäres *Rolling*, welches durch CyPB-CD147 Interaktion induziert wird, wird über PSGL-1 vermittelt
- Abb. 25:** CyPA oder CyPB induziert bei humanen Thrombozyten vermehrtes *Rolling* und Adhäsion auf Kollagen
- Abb. 26:** CyPA induziert thrombozytäres *Rolling* und Adhäsion über CyPA-CD147 Interaktion
- Abb. 27:** CyPB induziert thrombozytäres *Rolling* und Adhäsion über CyPB-CD147 Interaktion
- Abb. 28:** Mit Kollagen und GPVI-Fc beschichteten *cover slips* blockieren die durch CyPA-CD147 induziertes *Rolling* und Adhäsion
- Abb. 29:** Mit Kollagen und GPVI-Fc beschichteten *cover slips* blockieren die durch CyPA-CD147 bzw. CyPB-CD147 induziertes *Rolling* und Adhäsion
- Abb. 30:** CyPA inhibiert die Schlagfrequenz kultivierter Kardiomyozyten
- Abb. 31:** Signifikant verminderte Schlagfrequenz nach 24 Stunden bei der mit CyPA inkubierten Kardiomyozyten
- Abb. 32:** CD147 (EMMPRIN) Expression auf Kardiomyozyten
- Abb. 33:** CyPA bewirkt eine verstärkte MMP-2 Aktivität in Kardiomyozyten
- Abb. 34:** CyPA induziert transiente Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel der Mesentrialgefäße *in vivo*
- Abb. 35:** Thrombozyten *Rolling* im Ischämie- und Reperusionsmodell des Darmes

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 36:** Thrombozytenadhäsion im Ischämie- und Reperfusionsmodell des Darmes
- Abb. 37:** Übersicht über die Wirkungsweise von CyPA

11 Abkürzungsverzeichnis

Abb.:	Abbildung
ACD:	Acid-Citrate-Dextrose
ADP:	Adenosindiphosphat
Apo:	Apolipoprotein
ATP:	Adenosintriphosphat
BFGF:	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA:	bovines Serumalbumin
°C:	Grad Celsius
Ca ²⁺ :	zweiwertiges Kalzium
CCD:	charges-coupled-device
CD:	<i>cluster of differentiation</i> (Differenzierungsmarker)
CyP:	Cyclophilin
CyPA:	Cyclophilin A
CyPB:	Cyclophilin B
CyP60:	Cyclophilin 60
DCF:	<i>5(and-6)-carboxyfluorescein diacetate</i>
DMEM :	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
EB:	<i>embryonal body</i>
ECGF:	<i>endothelial cell growth factor</i>
ECS:	<i>embryonic stem cells</i>
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EMMPRIN:	<i>Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer</i>
ER:	Endoplasmatische Retikulum
Fc:	konstanter Abschnitt eines Antikörpers
FcR γ :	Fc-Rezeptor γ
FCS:	Fetales Kälberserum
g:	relative Zentrifugalbeschleunigung

Abkürzungsverzeichnis

GAG:	Glykosaminoglykane
GDP:	Guanindiphosphat
GM-CSF:	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GP:	Glykoprotein
GmbH:	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GTP:	Guanintriphosphat
HCl:	Salzsäure
HEPES:	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure
HIV:	<i>human immunodeficiency virus</i>
HSPG:	Heparansulfatproteoglykane
HUVEC :	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM-1 :	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 (<i>intercellular adhesion molecule-1</i>)
ICM :	<i>inner cell mass</i>
IFN- γ :	Interferon γ
Ig :	Immunglobulin
IGF-1 :	<i>insulin-like growth factor-1</i>
IL :	Interleukin
IMDM:	<i>Iscoe´s Modified Dulbecco´s Medium</i>
ITP:	idiopathische thrombozytopenische Purpura
IVM:	Intravitalmikroskopie
KCl:	Kaliumchlorid
kDa:	Kilodalton
kg:	Kilogramm
KGW:	Körpergewicht
KHK:	koronare Herzkrankheit
LDL:	<i>low density lipoprotein</i>
LPS:	Lipopolysaccharid
MCP-1:	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>

Abkürzungsverzeichnis

MCT1:	Monocarboxylat-Transporter 1
M-CSF:	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
Mg ²⁺ :	zweiwertiges Magnesium
mg:	Miligramm
ml:	Mililiter
Min.:	Minute
MMP:	Matrixmetalloproteinase
MT-MMP:	<i>membran-type MMP</i>
n:	Anzahl
NaCl:	Natriumchlorid
NF-κB:	<i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of B-cells</i>
nm:	Nanometer
oxLDL:	oxidiertes LDL
p:	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE:	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS:	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGF:	<i>platelet derived growth factor</i>
PF-4:	<i>platelet factor-4</i>
pH:	Kraft des Wasserstoffes <i>potentia hydrogenii</i> (lat.)
PPIase:	Peptidylprolylisomerase
PSGL-1:	P-Selektin Glycoprotein Ligand-1
PSI:	Penicillin-Streptomycin
RA:	rheumatoide Arthritis
ROS:	<i>reactive oxygen species</i>
SDF-1:	<i>stromal derived factor-1</i>
SDS:	<i>Sodium dodecyl sulfat</i>
sec.:	Sekunde
SEM:	Standardabweichung der Mittelwerte (<i>standard error mean</i>)

Abkürzungsverzeichnis

SOXF:	<i>secreted oxidative stress induced factors</i>
Tab.:	Tabelle
TCSF:	<i>tumor cell derived collagenase stimulatory factor</i>
TGF- β :	<i>transforming growth factor</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
VCAM-1:	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i> (Adhäsionsmolekül für vaskuläre Zellen)
VEGF:	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vWF:	von-Willebrand-Faktor
WHO:	<i>world health organisation</i>
μ g:	Mikrogramm
μ l:	Mikroliter
μ M:	Mikromolar
μ m:	Mikrometer
UV:	ultraviolett

12 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. vet. M. Stangassinger danke ich für die Übernahme meiner Arbeit und deren Einreichung an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. med. A. May, leitender Oberarzt der Kardiologie des Universitätsklinikums Tübingen. Dieser überließ mir das interessante Thema und gab mir die Möglichkeit unter seiner Betreuung die Fragestellung der vorliegenden Dissertation zu bearbeiten.

Dr. med. P. Seizer danke ich für seine große Hilfe. Er stand mir bei Rückfragen immer wieder äußerst hilfsbereit zur Verfügung und half mir bei der praktischen Durchführung.

Frau Dr. med. vet. T. Schöneberger danke ich für die Einführung in die Intravitalmikroskopie. Mit Fachkunde und einem offenem Ohr half sie mir stets bei der Durchführung der *in vivo* Versuche.

Herzlich bedanke ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. M. Gawaz, dem ärztlichen Direktor der Kardiologie des Universitätsklinikums Tübingen, für die durch ihn geschaffenen hervorragenden Arbeitsbedingungen in den von ihm freundlicherweise zu Verfügung gestellten Forschungseinrichtungen.

Herrn Dr. med. O. Borst möchte ich herzlich für die Erstellung der Immunfluoreszenzbilder mit Hilfe des konfokalen Mikroskopes danken.

Frau Dr. med. C. Lengerke und Herrn M. Grauer danke ich für die Überlassung der murinen Kardiomyozyten.

Mein besonderer Dank gilt Frau K. Posavec. Sie stand mir bei allen Fragen stets zur Seite und sorgte mit Fr. H. Schnell und Fr. C. Flaum für eine tolles Arbeitsklima im Labor.

Schließlich möchte ich mich besonders bei meiner Familie bedanken, die mich während des Studiums und Promotion stets unterstützt und Rückhalt gegeben hat. Besonderen Dank gilt auch meinem Freund, der mich gerade in den letzten Phasen der Dissertation unterstützt hat.