

Aus der I. Medizinischen Klinik
(Direktor Prof. Dr. med. A. Schömig)
und aus dem
Zentrum für Präklinische Forschung
(Leitung Dr. med. vet. J. Henke, Dr. med. vet. T. Brill)
der
Technischen Universität München

Angefertigt unter der Leitung von
Dr. med. Roland Schmidt

Vorgelegt über
Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
am Institut für Tierpathologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Charakterisierung des Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer
(EMMPRIN/CD147) auf Thrombozyten und Untersuchung zur funktionellen
Relevanz bei der Arteriosklerose**

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

von
Sina Fischel
aus
München

München, 2007

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

Dekan: Univ.- Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent: Prof. Dr. Schmahl
Koreferent: Prof. Dr. Potschka

Tag der Promotion: 09. Februar 2007

Meiner Familie
und Helga

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	2
2.1	<i>Entstehung der Arteriosklerose</i>	2
2.2	<i>Thrombozyten</i>	4
2.2.1	Morphologie.....	4
2.2.2	Hämostase	5
2.2.3	Die Rolle der Thrombozyten bei der Arteriosklerose	5
2.2.4	Interaktion Thrombozyten-Endothel	5
2.2.5	Interaktion Thrombozyten-Leukozyten	9
2.3	<i>Matrix Metalloproteinasen: Träger der zellulären Proteolyse bei der arteriosklerotischen Plaquettenentstehung</i>	10
2.4	<i>„Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer“ (EMMPRIN)</i>	15
2.4.1	Die Wirkung von EMMPRIN auf Matrix Metalloproteinasen	15
2.4.2	Darstellung von EMMPRIN.....	16
2.4.3	Mechanismus der EMMPRIN-induzierten MMP-Stimulation	17
2.4.4	Vorkommen von EMMPRIN bei der Arteriosklerose.....	18
2.4.5	Weitere Funktionen von EMMPRIN.....	19
3	ZIEL DER ARBEIT	20
4	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	21
4.1	<i>Material</i>	21
4.1.1	Geräte	21
4.1.2	Verbrauchsmaterial	22
4.1.3	Puffer.....	23
4.1.4	Lösungen, Medien, Reagenzien.....	28
4.1.5	rekombinante Proteine	32
4.1.6	Zelllinien	32
4.1.7	Antikörper	32
4.2	<i>Methoden</i>	35
4.2.1	Gewinnung und Stimulation humaner Thrombozyten.....	35
4.2.2	Durchflusszytometrie.....	36
4.2.2.1	<i>Durchführung</i>	36
4.2.3	Konfokale Laser-Rastermikroskopie.....	37

4.2.3.1	<i>Durchführung</i>	37
4.2.4	Transmissible Elektronenmikroskopie	38
4.2.4.1	<i>Durchführung</i>	39
4.2.5	Reverse Transkription (RT)	40
4.2.5.1	<i>Durchführung</i>	40
4.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
4.2.6.1	<i>Klassische, konventionelle Polymerase-Kettenreaktion</i>	41
4.2.6.2	<i>Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)</i>	42
4.2.6.3	<i>Amplifizierung der cDNA mit Assays-on-Demand</i>	44
4.2.7	Proteinnachweis mittels Western-Analyse.....	44
4.2.7.1	<i>Durchführung</i>	45
4.2.8	Inkubation der Thrombozyten mit rekombinantem EMMPRIN-Fc	47
4.2.9	Gewinnung der cDNA von CD34 positiven Zellen	47
4.2.10	Isolierung von humanen Monozyten aus dem Blut.....	48
4.2.11	Verringerung der Genprodukte (gene silencing).....	48
4.2.11.1	<i>Durchführung</i>	49
4.2.12	Enzym linked Immunosorbent Assay (ELISA)	49
4.2.13	Adhäsion von Monozyten an EMMPRIN-Fc, Inkubation mit einem NF- κ B-Inhibitor	50
4.2.14	Retrovirale Infektion von HEK 293-Zellen	51
4.2.15	In vitro Generierung von murinen Thrombozyten aus Stammzellen..	51
4.2.16	Infektion der murinen Megakaryozyten mit einem Retrovirus zur Überexpression von EMMPRIN.....	52
4.2.17	Durchflusszytometrie der rekombinanten Megakaryozyten	52
4.2.18	Konfokale Rastermikroskopie der rekombinanten Megakaryozyten	53
4.2.19	Durchflusszytometrie der rekombinanten Thrombozyten	53
4.2.20	Koinkubation rekombinanter, muriner Thrombozyten mit humanen Monozyten.....	53
4.2.21	Zymographie	54
4.2.21.1	<i>Durchführung</i>	54
5	ERGEBNISSE	55
5.1	<i>Nachweis von EMMPRIN auf Thrombozyten</i>	56

5.1.1	Nachweis von EMMPRIN auf Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie, Aufregulation durch Stimulation mit Thrombin	56
5.1.2	EMMPRIN-Nachweis mittels konfokaler Laserscanmikroskopie	57
5.1.3	Ultrastruktureller Nachweis von EMMPRIN mittels Elektronenmikroskopie	59
5.1.4	Nachweis der EMMPRIN-mRNA in Megakaryozyten und Thrombozyten mittels PCR.....	60
5.1.5	Nachweis der EMMPRIN-Expression auf Proteinebene mittels Western-Analyse	61
5.2	<i>Aktivierung von Thrombozyten durch Inkubation mit rekombinantem EMMPRIN-Fc</i>	62
5.3	<i>Auswirkung der thrombozytären EMMPRIN-Expression im Rahmen zellulärer Wechselwirkungen mit Monozyten</i>	63
5.3.1	Beeinflussung der MMP-Aktivierung durch die EMMPRIN-EMMPRIN-Wechselwirkung zwischen Monozyten und Thrombozyten	63
5.3.2	Beeinflussung der IL-6-Sezernierung von Monozyten durch die EMMPRIN-EMMPRIN-Wechselwirkung zwischen Monozyten und Thrombozyten	64
5.4	<i>Retrovirale Infektion zur Überexpression von EMMPRIN in den Zielzellen</i>	65
5.4.1	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis des Fusionsproteins auf der Oberfläche von HEK-293-Zellen	65
5.4.2	Überexpression von EMMPRIN auf murinen Megakaryozyten und Thrombozyten	66
5.4.2.1	<i>Durchflusszytometrie rekombinanter Megakaryozyten</i>	66
5.4.2.2	<i>Lokalisation des gfp an der Membran der Megakaryozyten</i>	67
5.4.2.3	<i>Nachweis von vermehrtem EMMPRIN-Gehalt nach Infektion der Zellen in den Lysaten mittels Western-Analyse</i>	68
5.4.3	Aufregulation der Aktivierungsmarker CD40L und CD62p nach Stimulation der rekombinanten Thrombozyten.....	69
5.4.4	Vermehrte MMP-9 Aktivität nach Kokultivierung humaner Monozyten mit EMMPRIN-überexprimierenden Thrombozyten.....	70
5.5	<i>Adhäsion der Monozyten an rekombinantes EMMPRIN-Fc, Inkubation mit einem NF-κB-Inhibitor.....</i>	70
5.5.1	EMMPRIN-Regulation des IL-6 über NF- κ B	71

5.5.2	Bildung der monozytären MMP-9 über NF- κ B	72
5.5.3	EMMPRIN-vermittelte Induktion des NF- κ B über den klassischen Aktivierungsweg	73
6	DISKUSSION	74
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	79
8	SUMMARY	80
9	LITERATURVERZEICHNIS	81
10	TABELLENVERZEICHNIS.....	92
11	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	93
12	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	95
13	DANKSAGUNG.....	99

1 EINLEITUNG

Herz-Kreislaufkrankungen bilden laut Angaben des statistischen Bundesamtes die häufigste Todesursache in Deutschland. In den gesamten westlichen Ländern und den asiatischen Staaten steigt die Anzahl der Betroffenen weiter an.

Meist geht eine Verkalkung der Arterien voraus, die Arteriosklerose, der eine chronische Entzündung der arteriellen Gefäßwände zugrunde liegt.

Wesentliche etablierte Risikofaktoren für die Entstehung der Arteriosklerose sind Rauchen, erhöhter Blutdruck, Adipositas, ein erhöhter Cholesterinspiegel und eine Erkrankung an Diabetes.

Einerseits führt die Arteriosklerose zu einer fortschreitenden Lumeneinengung und somit zur symptomatischen Minderdurchblutung der durch die betroffenen Arterien versorgten Organe. Andererseits kann die Gefäßverkalkung (Plaque) durch bisher nur unzureichend verstandene Mechanismen aufreißen. Dadurch kommt es zu einer lokalen Thrombusbildung und so zum Gefäßverschluss mit konsekutivem Organinfarkt.

Bei der Plaqueentstehung sind Zellen der Gefäßwand (Endothelzellen, glatte Muskelzellen) und einwandernde Blutzellen (Monozyten, Thrombozyten, Lymphozyten) beteiligt. Aufgrund gegenseitiger Aktivierung kommt es zur Freisetzung verschiedener Faktoren und Enzyme, wie den Matrix Metalloproteinasen (MMPs). Die MMPs fördern das Plaquewachstum und sind durch proteolytischen Abbau der fibrösen Schutzkappe wesentlich an der Ruptur der arteriosklerotischen Plaque beteiligt. Die Sekretion und Aktivierung von MMPs kann durch den Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) induziert werden, der auf den verschiedenen Zellen der arteriosklerotischen Plaque exprimiert wird.

Ziel der Arbeit ist die Erstbeschreibung und Charakterisierung von EMMPRIN auf Thrombozyten und Untersuchungen zur funktionellen Wechselwirkung von EMMPRIN auf Thrombozyten mit anderen Zelltypen wie Monozyten und Endothelzellen.

2 **SCHRIFTTUM**

2.1 ***Entstehung der Arteriosklerose***

Die Arteriosklerose beruht auf einer chronischen Entzündung der Gefäße. Den Beginn stellt häufig eine Verletzung oder Dysfunktion des Endothels dar (Ross, 1973).

Die American Heart Association hat die Gefäßwandveränderungen der sich langfristig entwickelnden Arteriosklerose in drei ineinander übergehenden Hauptstadien unterteilt: „fatty streaks“, „intermediate“ oder „fibrofatty lesion“ und „fibrous plaque“ (Stary, 1995).

Die „fatty streaks“ werden durch eine Akkumulation von T-Lymphozyten und Makrophagen gebildet. Zunächst adhären Monozyten an das aktivierte Endothel und wandern aufgrund ihrer proteolytischen Aktivität in den Subintimalraum. Dort differenzieren sie durch inflammatorische Stimuli zu Makrophagen, phagozytieren chemisch modifizierte Lipoproteine und sterben ab (Podrez, 2000). Fatty streaks sind bereits im Kindesalter nachweisbar ohne jedoch direkten Einfluss auf deren Gefäßstabilität zu nehmen. Erst später gelten sie als Vorläufer der arteriosklerotischen Plaque (Napoli, 1997).

Bei den „intermediate“ oder „fibrofatty lesions“ nimmt der Umfang der Intima zu durch Einwanderung und Proliferation glatter Muskelzellen aus der Media der Gefäße. Die glatten Muskelzellen ändern ihren Phänotyp und sezernieren extrazelluläre Matrix (ECM). Monozyten und T-Lymphozyten wandern weiterhin in die wachsende Plaque und werden umgeben von einer dünnen extrazellulären Bindegewebsmatrix, bestehend aus Proteoglykanen und verschiedenen Kollagentypen (Murata, 1986, Stary, 1994, Stevens, 1976).

Die „fibrous plaque“ ist charakterisiert durch eine Anhäufung extrazellulärer Lipide und glatter Muskelzellen, die weiterhin zur räumlichen Ausdehnung beitragen. Die innerhalb der Plaque von Makrophagen und T-Zellen sezernierten Zytokine sind entscheidend für die weitere Migration und Proliferation glatter Muskelzellen sowie für die Produktion extrazellulärer Matrix (Schonbeck, 2000). Aufgrund absterbender Schaumzellen innerhalb der Plaque bildet sich ein nekrotischer Kern mit zahlreichen Lipiden (Stary, 1995).

SCHRIFTTUM

Die Plaques bilden eine fibröse Schutzkappe aus, die einen Kontakt der im Blut befindlichen Thrombozyten mit den im Kern vorhandenen Thrombozyten-aktivierenden Substanzen verhindert. Im Randbereich der arteriosklerotischen Plaque kommt es jedoch zur weiteren Einwanderung von Monozyten aus dem Blut. Nach Differenzierung zu Makrophagen sezernieren sie vermehrt extrazelluläre Matrix abbauende Proteasen. So wird die fibröse Schutzkappe der arteriosklerotischen Plaque besonders im Randbereich ausgedünnt. Schließlich kommt es zur physikalischen Ruptur der fibrösen Schutzkappe und zur Freilegung des nekrotischen Kerns der Plaque mit anschließender Thrombusbildung und Gefäßverschluß (Libby, 2000).

Bei den Proteasen handelt es sich vor allem um Matrix Metalloproteinasen (MMPs), wie Kollagenasen, Gelatinasen und Stromelysine (Galis, 1994). Aktivierte T-Zellen ändern die Instabilität der Plaque durch Stimulation der makrozytären Proteasensekretion und fördern so deren proteolytischen Abbau (Schonbeck, 1997).

Die Plaqueruptur ist daher von der zellulären Zusammensetzung der Plaque und weniger vom Ausmaß der Gefäßveränderungen abhängig. Rupturgefährdete Plaques weisen generell eine dünne Schutzkappe und eine erhöhte Anzahl an eingewanderten Monozyten/Makrophagen und aktivierten T-Zellen auf (Libby, 2000).

Blutplättchen nehmen in allen Stadien der Plaqueentstehung eine entscheidende Rolle ein: sie adhärieren an verändertes, aktiviertes Endothel und werden dadurch selber aktiviert. Die Aktivierung der Thrombozyten induziert eine endotheliale Freisetzung verschiedener Zytokine, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen und fördert dadurch die Rekrutierung und Einwanderung zirkulierender Monozyten in die entstehende Plaque (Bombeli, 1998).

Während der Plaqueentstehung und Plaqueruptur werden verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie der von Willebrand Faktor (vWF) und der Gewebefaktor TF (tissue factor) aus der Plaque freigesetzt. Dies führt zur vermehrten Adhäsion und Rekrutierung von Thrombozyten an die Gefäßwand. Bei der Plaqueruptur binden Thrombozyten an die jetzt freiliegenden, Thrombozyten-aktivierenden Substanzen des Kerns der Plaque. Dadurch wird die Thrombusbildung initialisiert (Slupsky, 1998).

Zusammenfassend stellt die Plaqueruptur die schwerwiegendste Komplikation der vorangeschrittenen Läsionen dar und führt zu einem instabilen Koronarsyndrom, Myokardinfarkt oder Schlaganfall (Badimon, 1997, Ross, 1999).

2.2 *Thrombozyten*

2.2.1 Morphologie

Plättchen sind die kleinsten Blutbestandteile mit einem Durchmesser von 2-4 μm . Im Knochenmark werden die Vorläuferzellen, die Megakaryozyten, aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Von den Megakaryozyten werden Thrombozyten abgeschnürt und anschließend in die Zirkulation ausgeschwemmt. Sie enthalten nur noch einen Rest an mRNA der Vorläuferzellen und eine geringe Anzahl Mitochondrien. Die kernlosen Zellen sind nur bedingt zur Neusynthese von Proteinen fähig. Die Lebensdauer beträgt etwa sieben Tage, der Abbau erfolgt in Milz und Leber. Täglich werden ungefähr 20 % der zirkulierenden Plättchen erneuert. Der Hauptspeicherort ist die Milz.

Durch Aktivierung der Thrombozyten kommt es zu einer Änderung der äußeren Gestalt. Ruhende Thrombozyten besitzen eine typische diskoide Form. Nach Stimulation der Plättchen kommt es durch Ausstülpung der Plasmamembran und des offenen kanalikulären Systems zur Bildung von Pseudopodien. Das offene kanalikuläre System besteht aus gewundenen Kanälen, die bis weit ins Innere der Zelle reichen und mit der Plasmamembran verbunden sind. Durch Porenöffnungen sind sie vom Extrazellulärraum aus zugänglich (Gawaz, 2001).

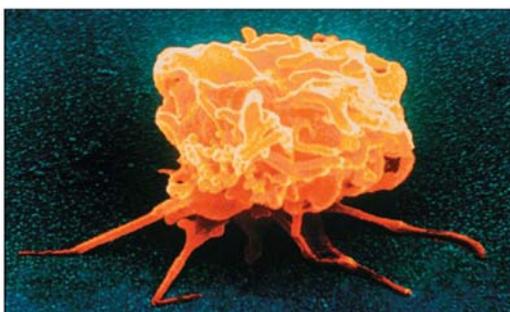


Abbildung 1 aktivierter Thrombozyt: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines aktivierten Thrombozyten mit Ausstülpung der Zellmembran zur Bildung der Pseudopodien (Ruggeri, 2002).

Im Zellinneren befinden sich Granula (dichte Granula, α -Granula), die als Speicher für verschiedene Enzyme, Wachstumsfaktoren, adhäsive Proteine und Koagulationsfaktoren dienen und nach Aktivierung ausgeschüttet werden können.

Unter physiologischen Umständen sind die Thrombozyten Träger der primären Hämostase (Blutgerinnung) (Gawaz, 2001).

2.2.2 Hämostase

Die Blutgerinnung erfolgt in zwei Phasen. Bei der primären Hämostase wird nach einer Gefäßwandverletzung mit folgender Wechselwirkung zwischen subendothelialen Strukturen, Thrombozyten und verschiedener Gerinnungsfaktoren die Gerinnungskaskade in Gang gesetzt. Durch Aktivierungsvorgänge lagern sich die Thrombozyten über der Verletzung aneinander und bilden einen weißen Thrombus, der überwiegend aus Plättchen besteht. Nach anfänglicher Blutstillung wird der Thrombus in einer sekundären Phase durch Fibrin stabilisiert und ermöglicht die Wundheilung (Gawaz, 2001).

2.2.3 Die Rolle der Thrombozyten bei der Arteriosklerose

Thrombozyten fördern in allen Stadien die Plaqueprogression, bei der klinisch bedeutsamen Plaqueruptur kommt es aufgrund einer gesteigerten Hämostase an der Rupturstelle zu einem thrombotischen Verschluss des Gefäßes (Ruggeri, 2002). Die Interaktion von Thrombozyten mit den Endothelzellen der Gefäße lässt sich in drei Abschnitte einteilen: Adhäsion, Aktivierung und Aggregation (Gawaz, 2001).

2.2.4 Interaktion Thrombozyten-Endothel

Blutplättchen rollen auch ohne vorherige Aktivierung entlang des aktivierten Endothels. Dieser Vorgang wird verstärkt durch exprimierte Adhäsionsmoleküle auf beiden Zelltypen. Dabei wird das Adhäsionsmolekül P-Selektin innerhalb von Sekunden nach Zellaktivierung auf der Oberfläche des Endothels verstärkt exprimiert (Frenette, 1995, Johnson, 1995, Massberg, 1998, Subramaniam, 1996).

Bindungsrezeptoren der Thrombozyten für das endotheliale P-Selektin sind der Glykoproteinkomplex Ib-V-IX (GPIb α) und der P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) (Laszik, 1996, Romo, 1999).

SCHRIFTTUM

Die Oberflächenpräsentation der β_3 -Integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) und $\alpha_V\beta_3$ vermittelt schließlich die feste Bindung der Thrombozyten an das Endothel (Nieswandt, 2003).

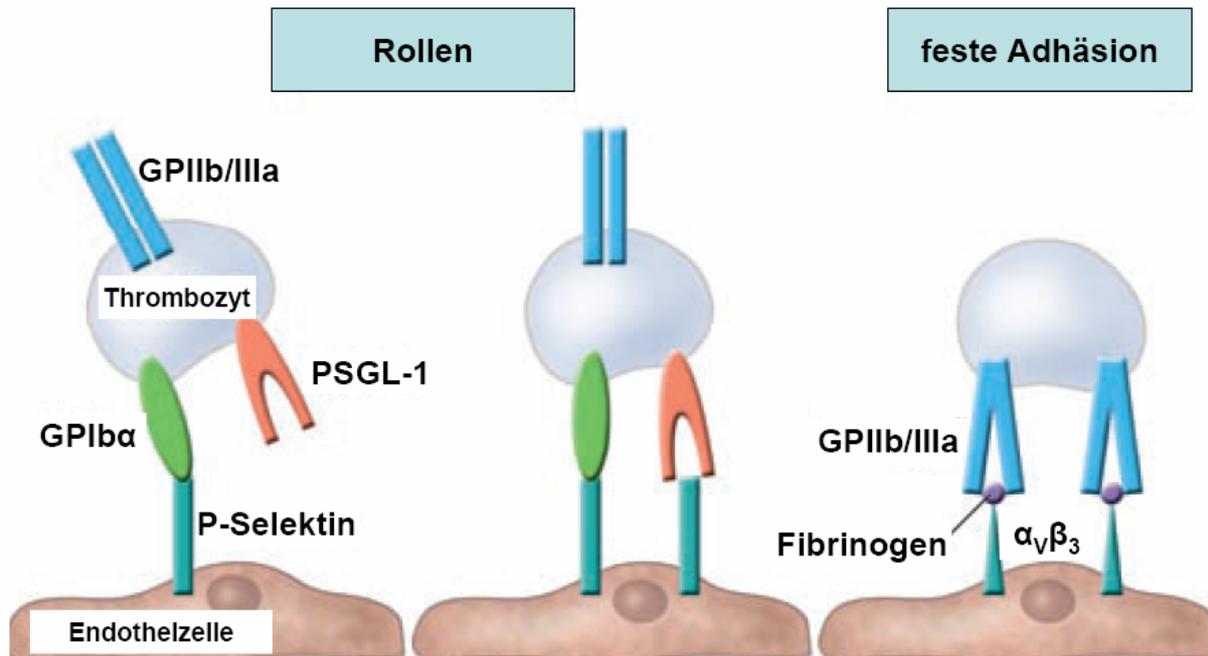


Abbildung 2 Adhäsion der Thrombozyten an das Endothel: Aktivierte Endothelzellen exprimieren P-Selektin. Die Oberflächenrezeptoren GPIIb und PSGL-1 der Plättchen binden an das endotheliale P-Selektin und rollen entlang der Gefäßwand. Die feste Adhäsion erfordert eine Aktivierung des GPIIb/IIIa der Thrombozyten und erfolgt über β_3 -Integrine des Endothels (Gawaz, 2005).

Ein weiteres Adhäsionsmolekül der Endothelzellen mit Fibrinogenbindungsstelle ist das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1). Diese Adhäsionsmoleküle tragen durch die Interaktion mit Fibrinogen zur Rekrutierung von Thrombozyten bei (Santoso, 2002).

Diese Rezeptor-abhängige Interaktion zwischen Plättchen und Endothelzellen ermöglicht eine transzelluläre Kommunikation über freie Mediatoren und könnte deshalb eine wichtige Rolle in der Initiation und Progression der Arteriosklerose spielen (Gawaz, 2005).

Die Freisetzung von Adenosindiphosphat (ADP) aus Thrombozytengranula verstärkt den Anhaftungsprozess, indem einerseits autokrin die Thrombozyten weiter aktiviert werden, andererseits stimuliert ADP weitere Plättchen aus der Zirkulation und fördert deren Aggregation mit den bereits adhären Zellen.

SCHRIFTTUM

Anfänglich entsteht eine lockere Bindung über Fibrinogenbrücken zwischen aktivierten $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrinrezeptoren (Plow, 1999), die innerhalb von Sekunden bis Minuten irreversibel stabilisiert werden kann. Der Vorgang wiederholt sich bei den neu rekrutierten Zellen (Ruggeri, 2002).

Ein weiterer Aktivierungsmarker der Thrombozyten ist der CD40-Ligand (CD40L, CD154), der innerhalb von Sekunden nach der Aktivierung an die Oberfläche abgegeben wird. Als Folge bindet er an das CD40 der Endothelzellen und induziert eine gesteigerte Freisetzung des Zytokins Interleukin-8 (IL-8) und von MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) sowie verschiedener Adhäsionsrezeptoren (E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1). Das VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) als Adhäsionsrezeptor und MCP-1 als chemotaktischer Faktor fördern entscheidend die Rekrutierung von Monozyten an die Gefäßwand.

Das sezernierte Zytokin IL-1 β der Thrombozyten aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) in Endothelzellen. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist ein zentraler Regulator der inflammatorischen Antwort von Zellen. NF- κ B liegt in unstimulierten Zellen im Zytoplasma als Dimer vor, gebunden an I κ B α . Durch Stimulation der Zellen wird der I κ B-Kinase-Komplex (IKK) aktiviert und phosphoryliert das I κ B α . Die Bindung zu dem Transkriptionsfaktor wird dadurch gelöst, das NF- κ B gelangt in den Zellkern und induziert dort die Transskription verschiedenener Gene, wie des proinflammatorischen IL-6. Das IL-6 wird vor allem von Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen ausgeschüttet und induziert in der Leber die vermehrte Synthese von Akute-Phase-Proteinen (Gawaz, 2002).

Die Interaktion der Thrombozyten mit dem Endothel fördert somit den aktivierten inflammatorischen Phänotyp des Endothels (Henn, 1998).

Weitere aus Thrombozyten degranulierte Zytokine wie der Wachstumsfaktor PDGF (platelet derived growth factor) und der transformierende Wachstumsfaktor TGF- β (transforming growth factor- β) fördern die initiierten Umbauvorgänge der Gefäßwand und damit die Proliferation der eingewanderten glatten Muskelzellen (Hawiger, 1995, Heller, 1997, Holt, 1985).

Nach proteolytisch bedingter Ruptur der Plaque kommt es durch die lokale Freisetzung prothrombogener Substanzen aus dem Subintimalraum zur Gerinnungsaktivierung mit Thrombusbildung (Davies, 1984).

Der einleitende Schritt der Thrombozytenadhäsion an die Rupturstelle beginnt mit der Freilegung Thrombozyten-aktivierender subintimaler Substanzen, wie dem von

SCHRIFTTUM

Willebrand Faktor (vWF) und Kollagen, an die Zirkulation. Durch die Aktivierung der Thrombozyten werden weitere zirkulierende Thrombozyten rekrutiert. Dabei bindet GPIIb auch unter hohen Scherkräften an den durch Kollagen immobilisierten vWF (Ruggeri, 2002). Des Weiteren bindet der spezifische Kollagenrezeptor GPVI an Kollagen und fördert die Aktivierung verschiedener Adhäsionsrezeptoren sowie die Strukturänderung der Thrombozyten.

Integrine wie vor allem der Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa sind die wichtigsten Rezeptoren in Bezug auf die feste Plättchenadhäsion an Matrixproteine wie Kollagen, Vitronektin, Fibrinogen und Laminin (Gawaz, 1997, Gawaz, 1991).

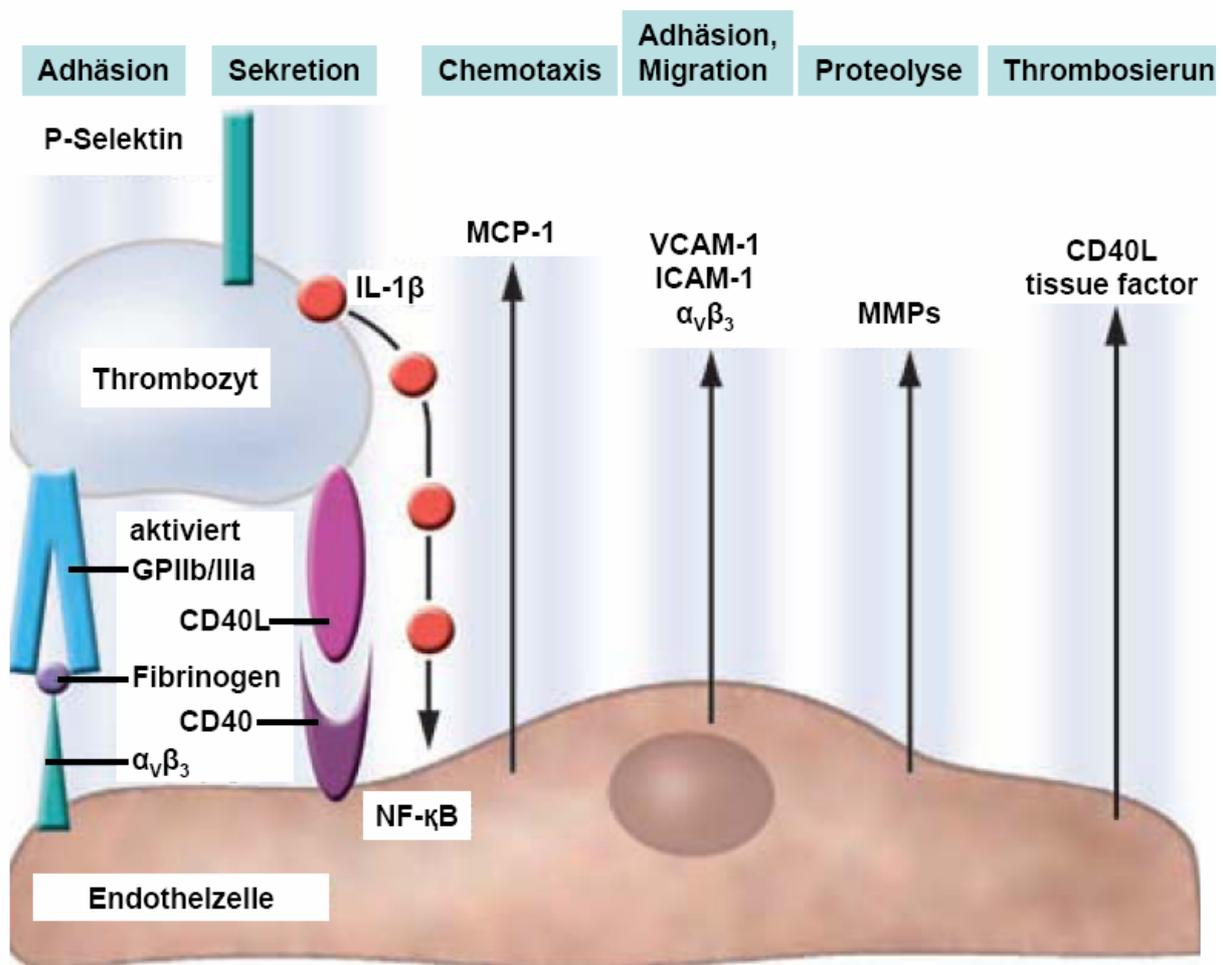


Abbildung 3 Adhärenente Thrombozyten aktivieren Endothelzellen: Die feste Adhäsion der Plättchen an das Endothel über GPIIb/IIIa induziert die thrombozytäre Oberflächenexpression von P-Selektin und von CD40L sowie die Sezernierung von IL-1 β der Thrombozyten. Hierdurch wird das Endothel weiter stimuliert und zur Bildung des Transkriptionsfaktors NF- κ B angeregt. Durch die induzierte Sekretion verschiedener Entzündungsmediatoren wird die Entstehung der Arteriosklerose begünstigt (Gawaz, 2005).

2.2.5 Interaktion Thrombozyten-Leukozyten

Zum Zeitpunkt eines akuten Myokardinfarktes sind vermehrt Aggregate von Thrombozyten und Leukozyten nachgewiesen worden (Michelson, 2001).

Nach Adhäsion der Thrombozyten an das Endothel und der darauf folgenden Aktivierung werden Substanzen freigesetzt, die die Chemotaxis und Migration der Leukozyten aus der Zirkulation an die Plättchenaggregate verstärken können.

Auch die Rekrutierung der Leukozyten, vor allem der Monozyten, verläuft in einem mehrstufigen Prozess, mit Selektin-vermitteltem Rollen am Endothel, der Aktivierung der Zellen und schließlich der Integrin-vermittelten festen Adhäsion und der Einwanderung in die Gefäßintima (Gawaz, 2004, Springer, 1994).

Durch die Bindung des P-Selektins der Plättchen an den passenden Ligand auf Leukozyten, dem PSGL-1 wird das Rollen entlang des Endothels über eine lockere Bindung der beiden Zelltypen vermittelt (Evangelista, 1999, Yang, 1999).

Aufgrund der nun folgenden Aktivierung wird auf der Oberfläche der Leukozyten vermehrt das Integrin Makrophagenantigen-1 (MAC-1, macrophage antigen-1) präsentiert. Zur festen Bindung an die Blutplättchen bindet MAC-1 sowohl an ICAM-2 der Thrombozyten als auch an das GPIIb/IIIa assoziiertes Fibrinogen (Simon, 2000).

Plättchen können über P-Selektin eine Sezernierung von IL-8, MCP-1, IL-1 β (entzündungsfördernder Signalstoff) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) aus Monozyten induzieren (Berger, 1998, Neumann, 1997). Hierdurch sorgen sie für die Rekrutierung zirkulierender Leukozyten aus dem Blutfluss.

Des Weiteren fördert die PSGL-1-P-Selektin-Verknüpfung die translational regulierte Expression des Oberflächenproteasenrezeptors uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor), der wesentlich ist für die Regulation der Integrin-assoziierten Leukozytenadhäsion (May, 1998, May, 2002).

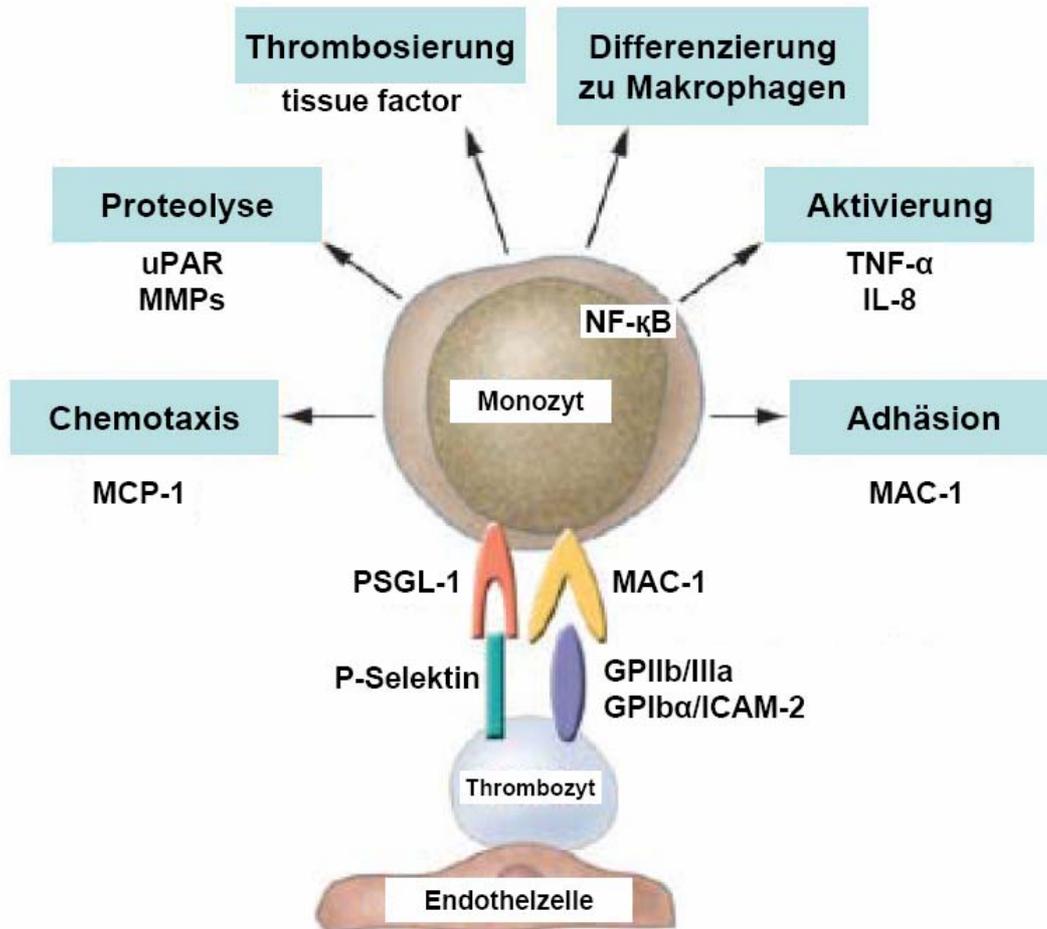


Abbildung 4 Adhärente Thrombozyten rekrutieren und aktivieren Monozyten: Aktivierte Plättchen interagieren mit dem monozytären PSGL-1 über P-Selektin und dem monozytären MAC-1 über GPIIb/IIIa oder GPIb α . Thrombozyten fördern die monozytäre Sekretion von Chemokinen, Zytokinen, prokoagulatorischen Faktoren für die Thrombosierung, die Aufregulation und Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und Proteasen und induzieren die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen. Die Wechselwirkung der beiden Zelltypen fördert das atherogene Milieu des Endothels und trägt zur Formation der Plaque bei (Gawaz, 2005).

2.3 **Matrix Metalloproteinasen: Träger der zellulären Proteolyse bei der arteriosklerotischen Plaqueentstehung**

Matrix Metalloproteinasen sind Endopeptidasen, die wesentlich an physiologischen und pathologischen Umbauprozessen beteiligt sind. Nach enzymatischer Aktivierung durch Abspaltung einer Prodomäne können sie Peptidbindungen innerhalb eines Moleküls lösen und so die extrazelluläre Matrix abbauen.

SCHRIFTTUM

Die proteolytische Aktivität der MMPs lässt sich auf mehreren Ebenen regulieren: Zum einen durch gesteigerte Genexpression, dem Initialschritt der Synthese inaktiver MMPs, durch vermehrte Sekretion der inaktiven Proteasen und schließlich durch die posttranslationale Aktivierung der inaktiven MMPs.

Andere Proteasen wie Plasmin oder zellassoziierte membranständige MMPs (MT-MMPs, membrane type-MMPs) sorgen durch die Abspaltung der Prodomäne für die Aktivierung der MMPs (Birkedal-Hansen, 1995, Gearing, 1994).

Zusätzlich erfolgt durch eine Interaktion der sezernierten MMPs mit ihren Inhibitoren, den so genannten tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) eine Regulation der MMP-Aktivität (Brew, 2000).

In unveränderten Gefäßen besteht ein Gleichgewicht zwischen TIMPs und MMPs. In arteriosklerotisch veränderten Gefäßen konnte eine erhöhte Expression und Aktivierung verschiedener MMPs gemessen werden, hierunter vor allem die Gelatinasen MMP-2, MMP-9 und die membranständige MT1-MMP (Brown, 1995, Galis, 1994, Hanemaaijer, 1993, Li, 1996, Nikkari, 1995).

Im gesamten Verlauf der Arteriosklerose nehmen die Matrix Metalloproteinasen eine entscheidende Rolle ein. Durch Interaktionen zwischen T-Lymphozyten und Endothelzellen wird die MMP-2 von T-Zellen vermehrt sezerniert, dies führt durch Zerstörung der Oberflächenmembran des Endothels zu einer verschlechterten Barrierefunktion und unterstützt die Einwanderung von Entzündungszellen sowie die Einlagerung von modifizierten Lipoproteinen (Romanic, 1994, Rosenberg, 1998). Auch die Einwanderung von glatten Muskelzellen in die Plaque wird durch MMP-vermittelte Migration gefördert (Bendeck, 1994).

Die endotheliale Proteolyse kann durch die Interaktion von Thrombozyten mit Endothelzellen erhöht werden. Das Zusammenspiel des GPIIb/IIIa und des CD40L der aktivierten Plättchen mit dem CD40 der Endothelzellen verstärkt die Expression des Plasminogen-aktivierenden Rezeptors uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor) sowie der MT1-MMP und erhöht die Aktivität der MMP-1, -2 und -9 (May, 2002).

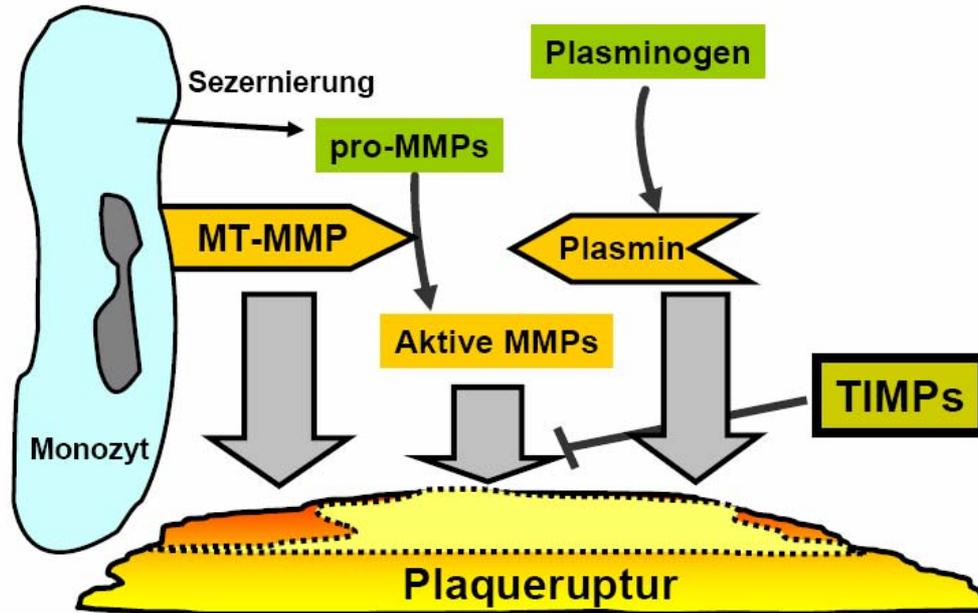


Abbildung 5 Abbau extrazellulärer Matrix durch Proteasen: Plasmin und membranständige MMPs aktivieren lösliche MMPs und tragen so neben ihrer direkten Beteiligung auch indirekt zum Abbau der fibrösen Schutzkappe der Plaque bei. TIMPs wirken inhibitorisch auf die Aktivierung der Matrix Metalloproteinasen.

Auch zelluläre Interaktionen an der Plaque fördern die Proteolyse. Thrombozyten verstärken die monozytäre MMP-Aktivität, so wird die MMP-9-Sekretion von Kollagen-gebundenen Monozyten durch die Inkubation mit Thrombozyten verstärkt (Galt, 2001).

Aktivierte Makrophagen und Schaumzellen in der arteriosklerotischen Plaque sezernieren Zytokine und induzieren dadurch autokrin eine vermehrte MMP-Produktion und sorgen parakrin für eine Aufregulierung der Genexpression in glatten Muskelzellen (Galis, 1995, Huang, 1999, Rajavashisth, 1999, Xu, 1999).

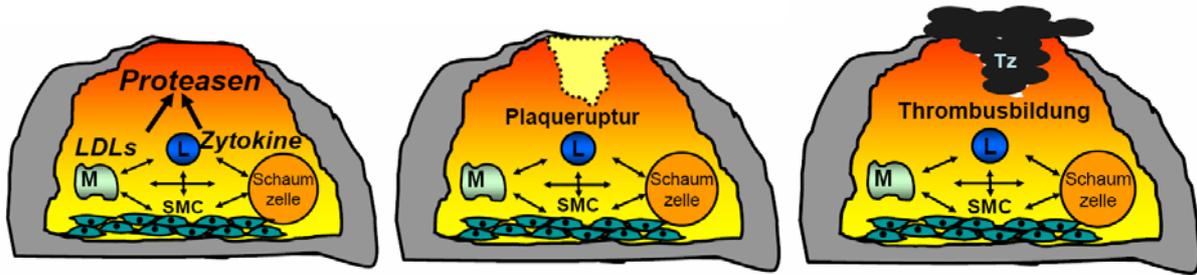


Abbildung 6 Zelluläre Interaktionen in der arteriosklerotischen Plaque: In der arteriosklerotischen Plaque kommt es zwischen den eingewanderten kardiovaskulären Zellen zu Wechselwirkungen. Über direkten Kontakt oder die Ausschüttung verschiedener Zytokine und durch Stimulation mit modifizierten Lipoproteinen kommt es zu einer erhöhten Sekretion und Aktivierung von Proteasen. Dies führt zur Ruptur der fibrösen Schutzkappe der Plaque und zu einer Thrombosierung an der Rupturstelle durch Anlagerung zirkulierender Thrombozyten. (LDL: modifizierte Lipoproteine, M: Monozyt, L: T-Lymphozyt, SMC: glatte Muskelzellen, Tz: Thrombozyten)

Schaumzellen, die gehäuft in instabilen Plaques gefunden werden, stellen die bedeutendste MMP-Quelle dar, sie produzieren MMP-1, -2, -3, -7 und -9.

Dies führt zur fokalen Degradation der fibrösen Schutzkappe und trägt damit zur Schwächung (Shah, 1995) besonders der Randbereiche der Plaque bei (Galis, 1994).

Etablierte kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie eine veränderte Hämodynamik, eine Gefäßverletzung oder -entzündung und oxidativer Stress fördern die Expression und anschließende Aktivierung der Metalloproteinasen in der Gefäßwand (Galis, 2002).

So lässt sich in entnommenen Gefäßproben von Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom einheitlich eine erhöhte MMP-9-Synthese von Makrophagen und MMP-2-Synthese von glatten Muskelzellen feststellen. Dies deutet auf eine spezifische Rolle der Matrix Metalloproteinasen bei der Plaqueruptur hin (Brown, 1995).

SCHRIFTTUM

MMP	Name	Untergruppe	Mol.-Gew.	Substrat	Stimulanzen	Vorkommen in Zellen der Plaque
MMP-1	Interstitielle Kollagenase	Kollagenasen	55 kDa	Kollagentyp I, II, VII, X, Gelatine, Proteoglykane	IL-1, TNF- α , Hypercholesterinämie	SMCs, Makrophagen, ECs, Schaumzellen
MMP-2	Gelatinase A	Gelatinasen	72 kDa	Kollagentyp IV, V, VII, X, Gelatine	IL-1, TNF- α , Thrombin	SMCs, Makrophagen, ECs, Monozyten, Schaumzellen
MMP-3	Stromelysin-1	Stromelysine	57 kDa	Kollagentyp II, IV, V, IX, Laminin, Fibronectin, Elastin, Gelatine, Proteoglykane, Progelatinase B, Prokollagenase	IL-1, TNF- α , Hypercholesterinämie, Plasmin, Mastzelldegranulation	SMCs, Makrophagen, Schaumzellen
MMP-9	Gelatinase B	Gelatinasen	92 kDa	Kollagentyp IV, V, VII, X, Gelatine	oxLDL, eLDL, hohe Scherkräfte	SMCs, Makrophagen, Monozyten, Schaumzellen
MMP-14	MT1-MMP	Membranständige MMPs	66 kDa	Kollagentyp IV, Gelatine, Progelatinase	IL-1, TNF- α , oxLDL, eLDL,	SMCs, Makrophagen, Monozyten

Tabelle 1 Darstellung der verschiedenen Matrix Metalloproteinasen: Beschreibung der verschiedenen MMPs, ihrer Substratspezifität, der jeweiligen Stimulantien und des Vorkommens in kardiovaskulären Zellen (kDa: Kilodalton, SMC: glatte Muskelzellen, EC: Endothelzellen, oxLDL: oxidativ modifiziertes LDL, eLDL: enzymatisch degradiertes LDL) (Dollery, 1995, Galis, 2002).

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass bei MMP-9 defizienten Mäusen die Größe der Plaque genauso reduziert ist, wie deren Gehalt an Kollagen und Makrophagen (Luttun, 2004). Erzeugt man hingegen eine Überexpression an aktiviertem MMP-9 auf Makrophagen wird im gleichen Tiermodell eine Plaqueruptur induziert (Gough, 2006).

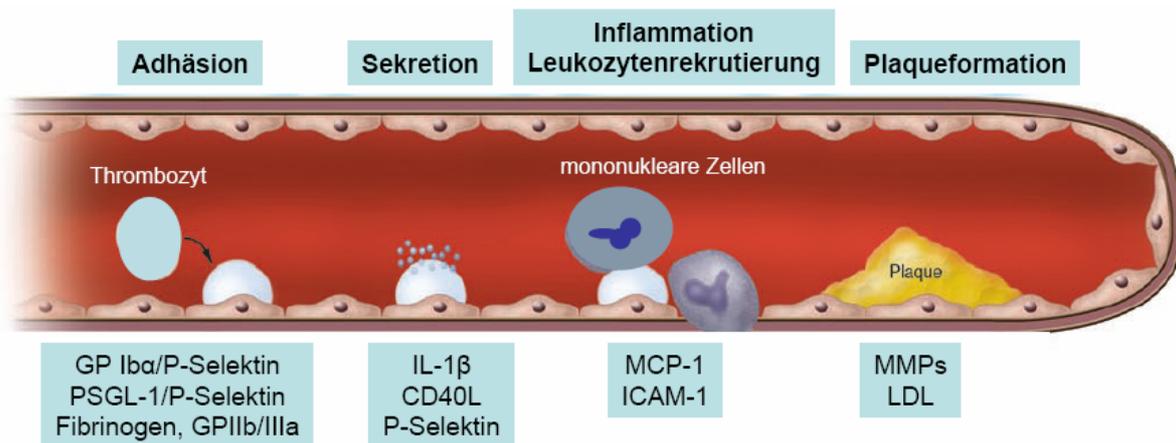


Abbildung 7 Darstellung der Entstehung der Arteriosklerose: Aktivierte Plättchen rollen entlang des Endothels über eine Bindung zwischen GPIIb/IIIa oder PSGL-1 und P-Selektin des Endothels. Im nächsten Schritt adhären die Thrombozyten fest am Gefäßendothel über β 3-Integrine und sezernieren proinflammatorische Moleküle und verändern so den Phänotyp des Endothels mit induzierter Sekretion von MCP-1 und ICAM-1. MCP-1 fördert die Chemotaxis und ICAM-1 die Adhäsion von Leukozyten. Die adhären Plättchen rekrutieren zirkulierende Leukozyten an das Endothel, binden und aktivieren diese über zelluläre Interaktionen und fördern damit die Transmigration der Leukozyten in die Gefäßintima und die Differenzierung zu Schaumzellen (Gawaz, 2005).

2.4 „Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer“ (EMMPRIN)

2.4.1 Die Wirkung von EMMPRIN auf Matrix Metalloproteinasen

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass das Tumor-assoziiertes Protein EMMPRIN in der Umgebung liegende Fibroblasten zur Expression der Kollagenase MMP-1 stimuliert (Lim, 1998).

EMMPRIN wurde 1989 erstmals aus Melanom- und Lungenkarzinomzellen isoliert und deshalb zunächst als ein von Tumoren abstammender Kollagenase Stimulationfaktor (TCSF, tumor collagenase stimulation factor) bezeichnet (Ellis, 1989). Später konnte auch die Neusynthese weiterer Matrix Metalloproteinasen (MMP-2, -3, -9, MT1-MMP) nachgewiesen werden, und es folgte die Umbenennung in EMMPRIN/CD147 (Biswas, 1995).

Die Expression von EMMPRIN konnte bisher auf verschiedenen Tumorzellen, aber auch auf aktivierten T-Zellen, Makrophagen, Monozyten, im Endometrium und auf humanen Keratinozyten nachgewiesen werden (DeCastro, 1996, Kasinrek, 1992, Major, 2002, Noguchi, 2003, Schmidt, 2006).

Nachdem EMMPRIN keine Wirkung auf die Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 zeigt, wird durch EMMPRIN das Gleichgewicht nur in Richtung vermehrte MMP-Produktion und MMP-Aktivität verschoben (Ellis, 1989, Guo, 1997, Kataoka, 1993, Polette, 1997, Taylor, 2002).

Bei Tumoren sind Proteasen wichtig für das Wachstum, die Infiltration in gesundes Gewebe sowie die Metastasierung (Benbow, 1999, Fisher, 1994). Tumorzellen exprimieren deutlich mehr EMMPRIN als unveränderte Zellen. Die Tumorprogression wird gefördert durch EMMPRIN-induzierte MMP-Aktivität und dem konsekutiven Abbau der umliegenden Bindegewebszellen (Biswas, 1995, Muraoka, 1993, Polette, 1997, Sameshima, 2000). Daher besteht eine direkte Korrelation der Expression von EMMPRIN auf Tumorzellen mit der Rate der Metastasierung und der Mortalität der betroffenen Patienten (Davidson, 2003).

2.4.2 Darstellung von EMMPRIN

EMMPRIN, auch bekannt unter den Namen Basigin, M6 oder CD147 ist ein N-glykosiliertes Zelloberflächenprotein bestehend aus 269 Aminosäuren und einer Molekularmasse von 58 Kilodalton (kDa). Es gehört zu der Familie der Immunglobuline und enthält im extrazellulären Abschnitt zwei Domänen des C2-Typs (Phospholipid-bindend), wobei die C-terminale Domäne ebenfalls Gemeinsamkeiten mit dem V-Typ (variabel) aufweist.

SCHRIFTTUM

Die transmembranöse Domäne besteht aus 21 AAs und ist zu 100 % identisch mit den Homologen der Ratte (OX-47) und des Huhnes (HT7) und unterscheidet sich nur in einer Aa zu dem der Maus (Basigin) und des Kaninchens (HT7). Diese Glutamin- und Leucinreiche Aminosäuresequenz wird daher als wichtige funktionelle Einheit angesehen und deutet auf die Möglichkeit einer Protein-Protein-Interaktion innerhalb der Zellmembran hin (Biswas, 1995, Fossum, 1991, Kasinrerck, 1992, Miyauchi, 1990, Miyauchi, 1991, Schuster, 1996, Seulberger, 1992).

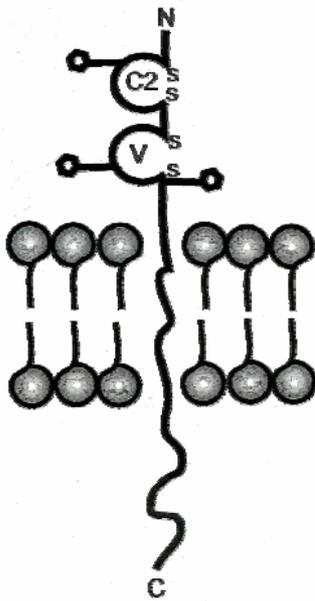


Abbildung 8 Schematische Darstellung des EMMPRIN: Die C-terminale Domäne des Moleküls ist intrazellulär, gefolgt von einer kurzen transmembranösen Domäne. Extrazellulär befindet sich der längste, N-terminale Abschnitt mit einer C2-Domäne, verantwortlich für die Induktion der MMPs und einer V-Domäne (Staffler, 2000).
(C2: Ig C2-Domäne, V: Ig V-Domäne)

2.4.3 Mechanismus der EMMPRIN-induzierten MMP-Stimulation

Zelloberflächenproteine, wie die Gruppe der Immunglobuline (Ig) bilden so genannte Oligomerformationen. Dies sind Makromoleküle, die aus mehreren strukturell ähnlichen oder gleichen Einheiten bestehen (Rao, 1992, Rao, 1994). Diese Interaktionen sind auch bei EMMPRIN entscheidend für verschiedene biologische Aspekte. In diesem Fall wird ein Homo-Oligomer zwischen zwei EMMPRIN-Proteinen auf der Plasmamembran geformt („clustering“). Für diese Formation ist die N-terminal lokalisierte Ig-ähnliche Domäne durch Bildung hydrophober Wechselwirkungen funktionell entscheidend, ihr wird auch die MMP-induzierende Aufgabe zugesprochen (Biswas, 1995, Sun, 2001, Yoshida, 2000).

EMMPRIN sorgt nicht nur für die Aktivierung der MMPs, sondern kann auch MMP-1 auf der Oberfläche von Tumorzellen binden und so die proteolytische Aktivität in Richtung der Migration lenken (Gabison, 2005).

Die zweite Domäne bewirkt vor dem Transfer zur Zellmembran eine Wechselwirkung mit Caveolin-1, dem Integralmembranprotein der Caveolae, kleinen Einbuchtungen auf der Zelloberfläche (Tang, 2004). Diese Verbindung hemmt das EMMPRIN-„clustering“ auf der Zellmembran und damit die MMP-Aktivierung. Caveolin-1 bindet dabei selektiv an wenig glykosiliertes EMMPRIN und verhindert die posttranslationale Glykosilierung von EMMPRIN. Diese Untersuchungen zeigen den negativen Einfluss des Caveolin-1 auf die Glykosilierung, die Bindung untereinander und die MMP-induzierende Funktion von EMMPRIN. Diese Ergebnisse könnten die hemmende Wirkung von Caveolin-1 auf die Tumorprogression erklären (Shi, 2000, Tang, 2004). Annexin II (Ca²⁺-bindendes Protein) und Cyclophilin (hemmt Vermehrung der T-Zellen) wurden als weitere Bindungspartner auf benachbarten Zellen beschrieben (Toole, 2003, Yurchenko, 2002).

Die gewebeabhängige unterschiedliche Glykosilierung von EMMPRIN lässt auf eine Beteiligung von Kohlenhydratketten bei gewebespezifischen Funktionen schließen (Yoshida, 2000). Die unterschiedlichen Glykosilierungsformen des ursprünglich 28kDa großen Proteins sind verantwortlich für die Spanne des Molekulargewichts zwischen 44 und 66kDa (Biswas, 1995). Die Glykosilierung ist auch maßgebend für die Aktivierung der MMPs. Das reine, deglykosilierte EMMPRIN induziert keine MMP-Aktivität, sondern antagonisiert die Aktivität von natürlich glykosiliertem EMMPRIN (Guo, 1997, Kanekura, 2002).

Als weitere Aktivierungsmechanismen gelten die proteolytische Abspaltung des EMMPRIN von der Plasmamembran und das Abschnüren EMMPRIN-tragender Mikrovesikel, die bald nach Freisetzung degradiert werden und so freies zirkulierendes EMMPRIN in voller Länge abgeben (Caudroy, 1999, Sidhu, 2004).

2.4.4 Vorkommen von EMMPRIN bei der Arteriosklerose

In vitro führt die Differenzierung humaner Monozyten zu Makrophagen durch den Makrophagenkolonien-stimulierenden Faktor M-CSF (macrophage colony-stimulation

factor) zu einer vermehrten Expression von EMMPRIN auf Makrophagen. Innerhalb der arteriosklerotischen Plaque lässt sich immunhistochemisch eine räumliche Assoziation mit der MMP-9 nachweisen (Major, 2002).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass EMMPRIN auf glatten Muskelzellen humaner Koronararterien exprimiert wird und die Stimulation mit oxidativ modifiziertem LDL eine proteolytische Freisetzung von EMMPRIN aus den glatten Muskelzellen auslöst (Haug, 2004).

Vorarbeiten unserer Gruppe konnten erstmals die Aufregulation von EMMPRIN und der membranständigen Protease MT1-MMP auf Monozyten bei Patienten während eines akuten Myokardinfarkts nachweisen. Im Rahmen zellulärer Interaktionen stimuliert EMMPRIN die MMP-9 in Monozyten und die MMP-2 in glatten Muskelzellen. Dies lässt eine entscheidende Funktion von EMMPRIN bei der MMP-Aktivierung bei kardiovaskulären Erkrankungen vermuten (Schmidt, 2006).

Dennoch sind die kausale, funktionelle Relevanz von EMMPRIN in der Plaqueprogression und die tatsächliche Regulation bei kardiovaskulären Zellen bisher nur unzureichend beschrieben.

2.4.5 Weitere Funktionen von EMMPRIN

Untersuchungen an Basigin-Knockout-Mäusen zeigten die Bedeutung des Moleküls für zahlreiche weitere biologische Prozesse. So können sich befruchteten Eizellen nicht oder nur sehr schlecht in der Plazenta einnisten. Die wenigen überlebenden Embryos zeigen Schwächen in der Sensorik, dem Immunsystem und leiden an Gedächtnisstörungen. Die männlichen Tiere haben eine gestörte Spermatogenese und sind daher steril (Igakura, 1998).

Weitere Untersuchungen schreiben EMMPRIN eine Rolle in der Formation der Blut-Hirn-Schranke sowie der Blut-Augen-Schranke zu, auch eine Beteiligung an der embryonalen Ausbildung der Netzhaut wird vermutet sowie eine Funktion in der Aktivierung von Leukozyten (Fadool, 1993, Fossum, 1991, Kasinrerck, 1992, Schlosshauer, 1990, Seulberger, 1992).

3 ZIEL DER ARBEIT

Die vorliegende Arbeit soll das Vorkommen von EMMPRIN auf Thrombozyten näher untersuchen. Da es sich hierbei um eine Erstbeschreibung des Rezeptors auf diesen Zellen handelt, soll der Nachweis zunächst auf mehreren Ebenen erbracht werden. Auf Proteinebene mittels Western-Analyse und auf RNA-Ebene mittels Polymerasekettenreaktion. Des Weiteren soll die Lokalisation und Regulation von EMMPRIN festgestellt werden. Hierzu dient die Methode der Durchflusszytometrie und zur genaueren Beschreibung die Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie. Zudem soll die funktionelle Relevanz von EMMPRIN auf Thrombozyten näher charakterisiert werden.

Es ist bekannt, dass sich kardiovaskuläre Zellen gegenseitig durch zelluläre Interaktionen beeinflussen und so das Fortschreiten der Plaqueentwicklung fördern. Es soll geklärt werden, ob EMMPRIN an der Interaktion mit anderen Zelltypen wie Leukozyten und Endothelzellen beteiligt ist. Weiterhin ist die Relevanz von EMMPRIN an der Wechselwirkung zwischen Thrombozyten untereinander zu überprüfen.

Zur besseren Untersuchung der Funktionalität von EMMPRIN wurden einerseits mittels retroviralem Gentransfers EMMPRIN-überexprimierende Zellen gewonnen und andererseits mittels siRNA-Technologie die EMMPRIN-Synthese in den Zellen inhibiert.

Da der Mechanismus der zellulären Wechselwirkungen, die an der Bildung der arteriosklerotischen Plaque beteiligt sind, nur unvollständig beschrieben ist, sollen so neue Erkenntnisse gewonnen werden, die den Grundstein für die Entwicklung neuer pharmakologischer Angriffspunkte bilden könnten.

4 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

4.1 *Material*

4.1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank	Hera cell, Hereaus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Durchflusszytometer (FACSCalibur)	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektronenmikroskop, 10 CR	Carl Zeiss GmbH, Jena
ELISA-Lesegerät (Biotrak II)	Amersham Bioscience, Freiburg
Heizplatte MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
konfokales Laserscanmikroskop, Axiovert 100 M Meta, LSM 510	Carl Zeiss GmbH, Jena
Lichtmikroskop Axiovert 100, invers	Carl Zeiss GmbH, Jena
Novex-Mini-Zellkammer	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PCR-Gerät	Applied Biosystems, Foster City, USA
Photometer, Dynatech MR5000	Dynex Technologies, Denkendorf
pH-Meter (pH 525)	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Power Pac 300	Bio Rad Laboratories, CA, USA
Real-Time PCR-Gerät (ABI Prism 7700)	PerkinElmer- Applied Biosystems, Foster City, USA
Rolling Mixer RM 810	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt
Spektrometer (GeneQuant pro RNA/DNA Calculator, Classic)	Amersham Bioscience, Freiburg
Sterilbank	Herasafe, Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Sysmex KX-21N (Blutzellenzählgerät)	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tischzentrifuge	Megafuge 1.0R, Hereaus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Ultramikrotom, Reichert-Jung Ultracut E	Leica, Wetzlar
Vakuumpumpe	Helmut Saur Laborbedarf, Reutlingen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA

4.1.2 Verbrauchsmaterial

Abdeckfolien für qPCR-Platten	Applied Biosystems, Foster City, USA
BEEM-Kapseln	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Cellophane, large	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dako Cytomation Pen	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Deckgläschen 18x18 mm #1	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Einweg-Pipetten aus Glas	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einmalspritzen, steril	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Falcon-Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Gewebekulturschalen, Cellstar, steril	Greiner Bio-One GmbH. Frickenhausen
IL-6-ELISA, Quantikine	R&D Systems GmbH, Wiesbaden- Nordenstadt
Lochplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
MACS magnetische Halterungen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS Säulen zur Zelltrennung	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Micro Amp Autoclaved Reaction Tube	Applied Biosystems, Foster City, USA
Micro Amp Optical 96-well Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City, USA
Butterfly Multifly Set	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Objektträger 76x26x1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe (easypet)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	Eppendorf AG, Hamburg
RNeasy Mini Kit zur RNA Isolierung	Qiagen GmbH, Köln
Röntgenfolien Super R/X	FujiFilm Europe GmbH, Düsseldorf
Rundbodenröhrchen für FACS (5 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
S-Monovetten CPDA, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sterilfilter (0,20 µm)	Amicon-Millipore, Schwalbach
TBE-Gel, 6 %	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Transferringpipetten (3 ml), steril	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Tris-Glycin Gel, 4-20 %	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zymogram (Gelatin) Gel, 10 %	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe

4.1.3 Puffer

ACD:

Na₃Citrat (12,5 g)

Citronensäure (6,82 g)

Glucose (10 g)

destilliertes Wasser ad 500 ml mit NaOH auf pH 4,6 einstellen

IMDM-Medium, modifiziert:

IMDM-Medium

1x MEM-Vitamine

1x MEM-nicht-essentielle Aminosäuren

300 µg/ml Eisen-gesättigtes Transferrin

1 mM Natiumpyruvat

0,02 mg/ml L-Asparagine

0,01 mM Monothioglycerol

10 ng/ml Thrombopoetin (TPO)

10 ng/ml Interleukin-1β (IL-1β)

10 ng/ml Interleukin (IL-6)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

50 ng/ml Stammzellofaktor (SCF)

Lämml-Probenpuffer (3x):

1 M Tris pH 6,8 (1,25 ml)

20 % SDS (2 ml)

Glycerin (2 ml)

2-Mercapto-Ethanol (1 ml)

Bromphenolblau (2 Körner)

destilliertes Wasser ad 10 ml

LiDS-Waschpuffer:

100 mM Tris-HCl (pH 7,5)

150 mM LiCl

1 mM EDTA (pH 8,0)

0,1 % LiDS

Lysepuffer:

100 mM Tris-HCl (pH 7,5)

500 mM LiCl

10 mM EDTA (pH 8,0)

1 % LiDS

5 mM DTT

L1-Mix (cDNA-Synthese):

5x First Strand Buffer

0,01 mol/l DTT

0,25 % Igepal

50 µmol/l CFL 5C (Primer)

H₂O

L2-Mix (cDNA-Synthese):

5x First Strand Buffer

0,01 mol/l DTT

0,5 mmol/l dNTP

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

H₂O

200 U Superscript II (1 µl)

M1-Mix (PCR):

Enzym-Mix (Expanded Long Template)

3 % Formamid

H₂O

M2-Mix (PCR):

1,2 µmol/l CP2 (Primer)

350 µmol/l dNTP

4,5 U Pol-Mix (DNA-Polymerase-Mix)

MACS-Puffer:

PBS (ohne Mg⁺/Ca⁺)

0,6 % CPDA

0,5 % BSA

NTE-Lysepuffer:

100 mM NaCl

10 mM Tris (pH 7,4)

in destilliertem Wasser aufnehmen,

kurz vor der Lyse Nonidet P-40 (Endkonzentration 1 %) und Phenylisocyanat

PIC (Endkonzentration 0,25 %) zugeben

Ripa-Lyse-Puffer (2x):

1 M Tris pH 7,2 (10 ml)

NaCl (9,2 g)

EGTA (0,38 g)

20 % Triton-X-100 (50 ml)

Na-desoxycholat (10 g)

10 % SDS (10 ml)

destilliertes Wasser ad 500 ml

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Ripa-Gebrauchslösung:

Ripa-Lyse-Puffer (2,5 ml)
destilliertes Wasser (2,5 ml)
Aprotinin 1 mg/ml (15 µl)
PMSF 100 mM (25 µl)
Leupeptin 1 mg/ml (1,5 µl)

SDS-Laufpuffer (10x):

Glycin (144 g)
Tris Base (30 g)
20 % SDS (50 ml)
destilliertes Wasser ad 1 l

TBS (10x):

Tris HCl (13,2 g)
Tris Base (2 g)
NaCl (82 g)
destilliertes Wasser ad 1 l

TBS-T:

TBS 10x (200 ml)
Tween 20 (1 ml)
destilliertes Wasser ad 2 l

Tailing-Waschpuffer (TWP):

50 mmol/l KH_2PO_4 (pH 7,0)
1 mmol/l DTT
0,25 % Igepal

Tailing-Mix:

4 mmol/l MgCl_2
0,1 mmol/l DTT
0,2 mmol/l dGTP
10 mmol/l KH_2PO_4

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

10 U TdT

Tyrodes-Puffer (10x):

NaCl (80 g)

NaHCO₃ (10,15 g)

KCl (1,85 g)

destilliertes Wasser ad 1 l

Tyrodes-Gebrauchslösung:

Tyrodes-Puffer 10x (20 ml)

Glucose (0,2 g)

BSA (0,2 g)

destilliertes Wasser ad 200 ml

mit HEPES auf pH 7,3 einstellen, 50 ml abnehmen, den Rest mit HCl auf pH 6,4 einstellen

Waschpuffer/Igepal (WP I):

50 mmol/l Tris-HCl (pH 8,3)

75 mmol/l KCl

3 mmol/l MgCl₂

10 mmol/l DTT

0,5 % Igepal

Waschpuffer Tween 20 (WP T):

50 mmol/l Tris-HCl (pH 8,3)

75 mmol/l KCl

3 mmol/l MgCl₂

10 mmol/l DTT

0,5 % Tween 20

Alle unten nicht gesondert aufgeführten Reagenzien stammen von Sigma-Aldrich, Roth, Merck oder Biomol. Zur Verdünnung wird destilliertes Wasser von Millipore verwendet.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

4.1.4 Lösungen, Medien, Reagenzien

Agarose (Sea Kem LE)	Cambrex Bio Science Rockland Inc., ME, USA
Albumin Fraktion V, Protease-frei	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aprotinin	Loxo GmbH, Dossenheim
Aqua ad iniectabilia	Delta Select GmbH, Pfullingen
Coomassie Brilliant Blue	Bio Rad Laboratories, CA, USA
CPDA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
D (+)-Glucose, wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt
D _c Protein Assay Reagent A+B	Bio Rad Laboratories, CA, USA
DEPC-Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
destilliertes Wasser	Millipore Corporation, Billerica, USA
Developing Buffer	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
dGTP	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DNA Leiter 50 Bp	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DNA-Polymerase-Mix (Pol-Mix)	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel
dNTP-Mix (5 mM)	Qiagen GmbH, Köln
Drying Solution	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dynabeads Oligo (dT) 25	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Endothelzellmedium (EGM-2) Basalmedium + Supplemente	Cambrex, Verviers, Belgien
Epon	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Expanded Long Template-Enzym-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

FCS (fetal calf serum)	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ficoll-Paque Plus	Amersham Bioscience, Freiburg
First Strand Puffer	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Formaldehyd (36,5-38 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
HEPES	AppliChem GmbH, Darmstadt
Hot Star Taq	Qiagen GmbH, Köln
Igepal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
IKK-Inhibitor	Merck KGaA, Darmstadt
Kollagen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
L-Asparagin	Life Technologies, Inc., Gaithersburg
Loading Dye Solution (6x)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
MEM-nicht-essentielle Aminosäuren	Life Technologies, Inc., Gaithersburg
MEM-Vitamine	Life Technologies, Inc., Gaithersburg
Natiumpyruvat	Life Technologies, Inc., Gaithersburg
Novex Tris-Glycin SDS Sample Buffer (2x)	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Omniscript RT	Qiagen GmbH, Köln
Osmiumtetroxid	Polysciences Europe, Eppelheim
PCR Buffer (10x)	Qiagen GmbH, Köln
PCR-Öl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Percoll	Biochrom AG, Berlin
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Ponceau S

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
München

Primer

Metabion GmbH, Martinsried

	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
EMMPRIN	GGCCGTGAAGTCGTCAGAAC	GCCACGATGCCCAGGAA
β-Aktin	CACTCTTCCAGCCTTCCTTCC	CGGACTCGTCATACTCCTGCTT
CFL5c	59-(CCC)5 GTC TAG A (NNN)2-39	
CP2	59-TCA GAA TTC ATG (CCC)5-39	

Tabelle 2 verwendete Primer

Propylenoxid

Serva, Electrophoresis GmbH,
Heidelberg

Q-Solution (5x)

Qiagen GmbH, Köln

Random Hexamers

Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Renaturation Buffer

Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe

RNAiFect-Transfektionsreagenz

Qiagen GmbH, Köln

RNase freies Wasser

Qiagen GmbH, Köln

RT Reaktionspuffer (10x)

Qiagen GmbH, Köln

Salzsäure 2 mol/l – 2 N Lösung

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

SCF

CellSystems Biotechnologie Vertrieb
GmbH, St. Katharinen

See Blue Plus 2

Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe

siRNA

Qiagen GmbH, Köln

Targetname	Targetsequenz	Sense	Antisense
EMMPRIN 1	CCG GTC AGA GCT ACA CAT TGA	r(GGU CAG AGC UAC ACA UUG A)dTdT	r(UCA AUG UGU AGC UCU GAC C)dGdG
EMMPRIN 2	GAC GGC CAT GCT GGT CTG CAA	r(CGG CCA UGC UGG UCU GCA A)dTdT	r(UUG CAG ACC AGC AUG GCC G)dTdC

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Kontrolle	AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT	r(UUC UCC GAA CGU GUC ACG U)dTdT	r(ACG UGA CAC GUU CGG AGA A)dTdT
-----------	--------------------------------	--	--

Tabelle 3 small interfering RNAs

Slim fast (Vanille)	Slim Fast Deutschland GmbH, Wiesbaden
Sodium Cacodylat Puffer	Electron Microscopy Sciences, Hatfield
Superscript II	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TaqMan Primer	Applied Biosystems, Foster City, USA

Assays-on-Demand	Bestellnummer
EMMPRIN	Hs 00174305_m1; Lot: 262049
GAPD	Hs 99999905_m1; Lot: 273655

Tabelle 4 Assays-on-Demand (TaqMan Primer)

TBE-Puffer (10x)	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TdT	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Thrombin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
TPO	CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen
Transferrin (Eisen-gesättigt)	Life Technologies, Inc., Gaithersburg
Tris-Glycin SDS Sample Buffer	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TrisGly Transfer Buffer (25x)	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin/EDTA	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
VLE RPMI 1640-Medium	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

4.1.5 rekombinante Proteine

EMMPRIN-Fc	Trigen, Martinsried
Fc-Fragment	Trigen, Martinsried

4.1.6 Zelllinien

murine Thrombozyten (gfp-/EMMPRIN-transfiziert)	Trigen, Martinsried
murine Thrombozyten	C57BL/6-Mäuse, Charles River, Sulzfeld
humane Nierenzellen HEK 293 (human embryonic kidney cells)	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
humane Thrombozyten	gesunde humane Spender
humane Monozyten	gesunde humane Spender
humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene, HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)	PromoCell GmbH, Heidelberg

4.1.7 Antikörper

Erstantikörper gegen humane Zellen:

Unkonjugierter mAk (Maus Ig) gg. β -Aktin (Clone: AC-15)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Unkonjugierter mAk (Maus IgG1) gg. humanes CD41 (Clone: SZ22)	Beckman Coulter GmbH, München
Unkonjugierter mAk (Maus IgG1) gg. humanes CD147 (Clone: Him6)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Unkonjugierter mAk (Maus IgG1) gg. humanes CD40L (Clone: TRAP-1)	Beckman Coulter GmbH, München
Unkonjugierter mAk (Maus IgG1) gg. humanes CD62p (Clone: CLB-Thromb/6)	Beckman Coulter GmbH, München

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Unkonjugierter mAk (Kaninchen IgG) gg. humanes I κ B α (Clone: 44D4)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers
FITC-konjugierter mAk (Maus IgG1) gg. humanes CD147 (Clone: HIM6)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
R-PE-konjugierter mAk (Maus IgG1) gg. humanes CD41 (Clone: P2)	Beckman Coulter GmbH, München
Magnetpartikel-konjugierter mAk (Maus IgG1) gg. humanes CD34 (Clone: QBEND/10)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Erstantikörper gegen murine Zellen:

Unkonjugierter mAk (Ratte IgG1) gg. murines CD41 (Clone: MWReg30)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FITC-konjugierter mAk (Ratte IgG1) gg. murines CD62 p (Clone: RB40.34)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FITC-konjugierter mAk (Ratte IgG1) gg. murines CD41 (Clone: MWReg30)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
PE-konjugierter mAk (Ratte IgG2a) gg. murines CD147 (Clone: RL 73)	eBioscience, San Diego, CA, USA
R-PE-konjugierter mAk (Hamster IgG3) gg. murines CD40L (Clone: MR1)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Zweitantikörper:

R-PE-konj. F(ab) ₂ -Fragment vom Kaninchen anti-Maus-Ig	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
5nm Gold-konjugiert Ak, AuroProbe EM-Labelled Ziege anti-Maus-IgG (Fc)	Amersham Bioscience, Freiburg
Cy5 konjugiert Ak, AffiniPure Ziege anti-Maus-IgG (H+L)	Jackson Immuno Research, Cambridgeshire, UK

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Cy5 konjugiert Ak, Ziege anti-Ratte-IgG (H+L)	Jackson Immuno Research, Cambridgeshire, UK
HRP-konjugierter Ak, Ziege anti-Maus-IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg
HRP-konjugierter Ak, Ziege anti-Kaninchen-IgG (H+L)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers

4.2 *Methoden*

Die Zellkulturen werden bei einer Temperatur von 37°C in einem Inkubator mit 5 % CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre gehalten. Alle Lösungen und Medien zur Verwendung in der Zellkultur werden steril filtriert durch einen Filter mit einer Porenweite von 0,2 µm. Die Kulturgefäße und Verbrauchsmaterialien aus Kunststoff sind vom Hersteller bereits sterilisiert.

Alle Reagenzien und Proben, die zur Aufbewahrung bei -20°C oder bei -80°C lagern, werden vor Verwendung langsam auf Eis aufgetaut und unmittelbar nach Einsatz wieder eingefroren.

4.2.1 Gewinnung und Stimulation humaner Thrombozyten

Die Blutentnahme von gesunden humanen Probanden erfolgt aus der V. mediana cubiti in 20 ml Spritzen, die vorher mit 4 ml ACD gefüllt werden.

Es werden je 10 ml des Blutes in 15 ml Falcon-Röhrchen vorsichtig überführt und bei 1000 rpm (Umdrehungen/min) für 20 min ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zentrifugation trennt die Blutbestandteile aufgrund ihrer Größe auf, die kernhaltigen Zellen sedimentieren. In der oberen Phase (PRP=platelet rich plasma) befinden sich vorwiegend Thrombozyten. Diese Phase wird vorsichtig mit einer sterilen Einmalplastikpipette abgenommen und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Das Thrombozyten-reiche Plasma aus je zwei 15 ml Falcon-Röhrchen wird gemischt und mit frisch hergestelltem Tyrodes-Gebrauchspuffer pH 6,4 auf 35 ml aufgefüllt. Anschließend werden die Zellen erneut zentrifugiert, bei 2100 rpm für 10 min mit Bremse bei Raumtemperatur. Der Überstand wird mit Hilfe einer Vakuumpumpe mit Glaspipettenaufsatz abgesaugt und das entstandene Zellpaket in 500 µl Tyrodes pH 7,3 sowie 500 µl Tyrodes pH 6,4 resuspendiert und mit einem automatischen Zellzählgerät (Sysmex) gezählt.

Die isolierten Thrombozyten werden in einer Konzentration von 2×10^8 Zellen/ml Medium (Tyrodes pH 6,4 und VLE RPMI 1640 mit 10 % FCS im Verhältnis 1:1) ausgelegt. Die Stimulation erfolgt mit Thrombin in einer Konzentration von 0,1 U/ml sowie 1 U/ml für eine Stunde im Inkubator.

4.2.2 Durchflusszytometrie

Die FACS-Messung („fluorescence activated cell sorter“) macht sich die Eigenschaft eines Lasers zunutze, der Licht in einer bestimmten, konstanten Wellenlänge (monochromatisches Licht) aussendet. Der Laser („light amplification by stimulated emission of radiation“) sorgt für eine Lichtverstärkung durch angeregte Emission von Strahlung.

Bei der Messung werden die Zellen in Suspension in einem laminaren Probenfluss durch eine feine Kapillare angesaugt und passieren einzeln den Laserstrahl. Die Zelle emittiert Streulicht, das durch Zellgröße, die Struktur der Zellmembran sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst wird.

Das optische System mit verschiedenen Filtern, Spiegeln, Linsen und Detektoren kann durch das Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter, FSC) eine Aussage über die Größe der Zellen treffen und durch das Seitwärtsstreulicht (Sidescatter, SSC) über die Granularität (Größe und Struktur der Zellorganellen) jeder einzelnen Zelle. Die Zellen können damit sortiert und gezählt werden.

Um weitere Eigenschaften der Zellen zu prüfen, können sie mit Antikörpern inkubiert werden, die einen fluoreszierenden Farbstoff tragen. Es werden Antikörper verwendet, die an Oberflächenstrukturen binden. Das von dem Laser ausgestrahlte Licht regt die Fluoreszenzfarbstoffe an und wird in deren spezifischen Wellenlänge emittiert.

Weist eine Zelle eine hohe Anzahl dieser Struktur auf, können entsprechend viele Antikörper binden und die Fluoreszenz nimmt proportional zu.

4.2.2.1 Durchführung

Die Inkubationen der Antikörper erfolgen für 30 min bei Raumtemperatur, die Zellsuspension wird jeweils bei 1200 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert.

Die Thrombozytensuspensionen werden in Rundbodenröhrchen gegeben und zentrifugiert. Die Überstände werden abgesaugt und die Zellen in 47,5 µl PBS aufgenommen. Die ersten Thrombozyten-spezifischen Antikörper CD41 (gegen GPIIb/IIIa) und CD147 (gegen EMMPRIN) Maus-Anti-Human werden in einer Konzentration von 1:200 eingesetzt. Nach der Inkubation wird der überschüssige

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Antikörper mit 3 ml PBS heruntergewaschen und die Zellen abzentrifugiert. Der zweite Antikörper Kaninchen-Anti-Maus F(ab)₂ ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff (R-PE) konjugiert und bindet an den ersten Antikörper, um diesen sichtbar zu machen. Dieser wird in einer Konzentration von 1:100 eingesetzt und im Dunkeln inkubiert. Der Waschschrift wird wiederholt und die Thrombozyten werden in 200 µl PBS aufgenommen für die Messung im FACSScalibur.

Um eine Eigenfluoreszenz auszuschließen werden ungefärbte Zellen als Negativkontrolle verwendet. Zusätzlich werden Zellen nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert, um eine spezifische Bindung des zweiten an den ersten Antikörper nachzuweisen.

4.2.3 Konfokale Laser-Rastermikroskopie

Hierbei werden die gleichen Fluorochrom-gekoppelten Antikörper verwendet wie in der Durchflusszytometrie.

Das Prinzip beruht wiederum auf der Anregung der Fluorochrome mittels Laser und ermöglicht über die FACS-Analyse hinaus eine Aussage über die räumliche Anordnung der spezifisch gebundenen Antigene.

Das Konfokalmikroskop fokussiert als Besonderheit das Anregungslicht in die Probe hinein. Der Focus der Detektion liegt genau darunter, und so wird nur die Information dieser einen Ebene weitergeleitet. Bei dem speziellen Laser-Rastermikroskop (confocal laser scanning microscope) fährt der Laser zeilenweise eine Objektebene ab. Das Licht wird an eine Lochblende abgegeben und erst später wird rechnergesteuert ein Bild erzeugt.

4.2.3.1 Durchführung

Zur besseren Adhäsion der Zellen an die Objektträger wird deren Oberfläche mit Poly-L-Lysin in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in PBS beschichtet. Sowohl die stimulierten als auch die ruhenden Thrombozyten werden nach einer Stunde abgenommen und auf eine Konzentration von 10⁶/ml verdünnt. Je 100 µl der Zellsuspension werden auf einen Objektträger in die Mitte eines mit Dako-Pen

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

gezeichneten Kreises gegeben. Zur Adhäsion der Zellen an das Poly-L-Lysin werden die Objektträger für 30 min in einer feuchten Kammer in den Brutschrank gelegt.

Nachdem im Mikroskop die Haftung der Zellen am Objektträger überprüft wurde, werden die restlichen Zellen mit PBS vorsichtig abgespült. Zur Fixation der Zellen wird 3,7 %iges Formalin auf die Objektträger für 20 min in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur gegeben. Das Formalin wird danach vorsichtig durch zweimaliges Spülen mit PBS heruntergewaschen. Um die Zellmembran zu permeabilisieren, wird Triton-X-100 in einer Konzentration von 0,25 % in PBS für weitere 5 min bei Raumtemperatur dazugegeben. Nach vorsichtigem Spülen mit PBS wird 3 %iges BSA in PBS zugegeben, um die unspezifischen Bindungsstellen abzublocken. Dies erfolgt erneut im Inkubator in der feuchten Kammer.

Für die Doppelfärbung der Immunzytochemie wird der erste Antikörper direkt auf den Objektträger gegeben. Der Antikörper wird in einer Verdünnung von 1:10 mit 3 % BSA in PBS eingesetzt. Die Inkubation erfolgt lichtgeschützt, in der feuchten Kammer über Nacht bei 4°C im Kühlschrank. Eine Inkubation bei 4°C ergibt bei diesem Antikörper ein Maximum an spezifischer Bindung. Der erste Antikörper wird durch Spülen mit PBS entfernt und es folgt eine einstündige Inkubation mit einer 1:10 Verdünnung mit 3 % BSA in PBS des zweiten Antikörpers im Brutschrank in der feuchten Kammer, ebenfalls lichtgeschützt. Der Antikörper Maus-Anti-Human CD41 ist direkt konjugiert mit dem Farbstoff Phycoerythrin (PE) und bindet in dieser Zeit/Temperatur-Kombination am besten.

Anschließend wird auch der zweite Antikörper mit PBS heruntergewaschen und die Objektträger durch Zugabe eines Tropfens Mounting-Medium auf ein Deckglas eingedeckelt.

4.2.4 Transmissible Elektronenmikroskopie

Bei der Elektronenmikroskopie können deutlich höhere Auflösungen (etwa 0,1 nm) erreicht werden, da die Lichtwellenlänge hierbei nicht wie bei der optischen Mikroskopie einen limitierenden Faktor darstellt.

In einer Elektronenkanone werden Elektronen erzeugt und ringförmig um die Anode beschleunigt. Die abgegebenen Elektronen bewegen sich sehr schnell durch ein

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Vakuum Richtung Kathode und durchstrahlen dabei die Probe. Das Vakuum verhindert eine Kollision der Elektronen mit Luftmolekülen. Die Elektronen haben eine sehr geringe Wellenlänge und werden nach Durchgang durch die Probe gemessen, dabei wird nur ein kleiner Streuwinkel erfasst. Die Schichtdicke der Proben sollte im Nanometerbereich liegen. Je nach Ordnungszahl der Atome, aus denen die Probe hauptsächlich besteht, der gewünschten Auflösung und der Beschleunigungsspannung sind auch einige Mikrometer möglich.

4.2.4.1 Durchführung

Thrombozytenmarkierung

Bei der Färbung der Thrombozyten wird nach dem Protokoll der Durchflusszytometrie vorgegangen. Der Primärantikörper ist ungefärbt und wird für 30 min bei Raumtemperatur zu den Zellen gegeben. Der Sekundärantikörper ist mit 5 nm großen Goldpartikeln konjugiert und wird für 2 std bei Raumtemperatur im Dunkeln mit den Zellen inkubiert.

Nach dem anschließenden Waschschrift werden die Zellpakete in kleinen Plastikgefäße (BEEM-Kapseln) mit Glutaraldehyd überschichtet und bei 4°C gelagert.

Einbettung der Zellen in Epon

Auf jeden Waschschrift folgt eine Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min bei Raumtemperatur. Die Zellen werden dreimal für je 10 min mit Cacodylatpuffer gewaschen, es folgt eine Inkubation mit Osmiumtetroxid für eine Stunde bei Raumtemperatur und drei Waschschriffe mit destilliertem Wasser, bis die gelbe Farbe des Osmiums nicht mehr sichtbar ist. Anschließend erfolgt die Entwässerung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 30, 50, 70, 90, 96 und 100 % Ethanol. Die Zellen werden zweimal für 30 min in Propylenoxid inkubiert und anschließend wird das zähflüssige Epon in gleicher Menge mit Propylenoxid vermischt und auf die Zellpakete gegeben. Mit geöffnetem Deckel bleiben die Proben eine Stunde stehen. Danach wird das Gemisch durch frisches, reines Epon ersetzt und über Nacht belassen. Am nächsten Tag wird das Epon erneuert und für 24 std bei 60°C polymerisiert. Nach trimmen der polymerisierten Blöcke fertigt man mit dem Ultramikrotom Ultradünnschnitte an.

4.2.5 Reverse Transkription (RT)

Die Transkription ist der erste Schritt der Proteinbiosynthese. Die Exonsequenzen der genomischen DNA werden kopiert und als so genannte mRNA (messenger RNA, Boten-RNA) aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert und dienen dort als Matrize für die Proteinbiosynthese. Hierbei löst das Enzym RNA-Polymerase die Bindung der DNA-Doppelhelix in einem kurzen Stück auf, so dass sich komplementäre Basen in Form von Ribonukleotiden an einen DNA-Einzelstrang anlagern können. Die Nukleotide verbinden sich schließlich zu einem Strang, werden abgespalten und bilden die mRNA. Zusätzlich wird ein Poly-A-Schwanz (mehrere Adeninbasen) angehängt, der ein vorzeitiges Abbauen der mRNA im Zytosol verhindert.

Bei der Reversen Transkription erfolgt die Umschreibung einer RNA Sequenz, meist mRNA in eine cDNA (complementary DNA, komplementäre DNA), die dann in einer PCR amplifiziert werden kann. Für die Synthese wird ein Enzym (RNA-abhängige DNA-Polymerase) benötigt und ein Primer (ein kurzer komplementärer DNA-Abschnitt), der sich an die RNA anlagert und den Startpunkt bildet. Hierfür wird meist ein Oligo-dT-Abschnitt (10-15 Thyminbasen) verwendet, der an den Poly-A-Schwanz bindet oder Random Hexamers (6 zufällige Basenpaare). Wie bei der Transkription lagern sich auch hier komplementäre Basen an und bilden nach Abspaltung schließlich die einzelsträngige cDNA.

4.2.5.1 Durchführung

Isolation der mRNA aus Thrombozyten mit Dynal-Oligo dT-Beads und cDNA-Synthese

Zu Beginn werden pro Ansatz 50 µl der magnetischen Beads mit der gleichen Menge LiDS-Waschpuffer gespült und zum Absaugen des Waschpuffers in eine magnetische Halterung gespannt. Diese hält die Beads an der Wand der Eppendorfgefäße, und der Überstand kann abgesaugt werden. Es erfolgt ein zweiter Waschschriff mit 50 µl LiDS-Puffer pro Ansatz, nach Verwerfen des Überstandes werden die Beads in 55 µl Lysispuffer pro Ansatz aufgenommen und je 50 µl auf

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Eppendorfgefäße verteilt. Diese können bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert werden.

Die frisch präparierten Thrombozyten werden abzentrifugiert, zu den Beads gegeben und für 30 min bei 4°C auf den Roller gelegt. Es folgt ein kurzes Abzentrifugieren bei 3000-5000 rpm und der Lysepuffer wird erst durch 100 µl Waschpuffer/Igepal (WP I) ersetzt, anschließend durch 100 µl Waschpuffer/Tween 20 (WP T) und erneut durch 100 µl WP I.

Nach Verwerfen des Überstandes resuspendiert man die Beads in 10 µl L1-Mix und lässt diese für 5 min bei Raumtemperatur stehen. Die Gefäße werden nach Zugabe von 10 µl L2-Mix für 45 min bei 44°C langsam im Thermoblock geschüttelt.

Nach erneutem kurzen Abzentrifugieren werden die Beads in PCR-Gefäße überführt, mit 100 µl Tailing-Waschpuffer (TWP) gespült und in 10 µl Tailing-Mix resuspendiert. Überschichtet mit 40 µl PCR-Öl werden die Ansätze für 4 min bei 94°C im Thermocycler inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Unter Zugabe von 10 U TdT kommen die Proben erneut in den auf 37°C abgekühlten Thermocycler. Nach Zugabe von 35 µl PCR M1-Mix wird der Cycler auf 78°C geheizt. Als letztes wird in jeden Ansatz 0,75 µl Pol-Mix und 4 µl PCR M2-Mix pipettiert und die cDNA wird in 20 Zyklen amplifiziert.

Die drei Schritte des Zyklus erfolgen für 15 sek bei 94°C, 30 sek bei 65°C und 2 min bei 68°C. Die abschließende finale Extension wird bei 68°C für 7 min durchgeführt.

Die cDNA kann bei -20°C gelagert werden.

4.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

4.2.6.1 *Klassische, konventionelle Polymerase-Kettenreaktion*

Bei der PCR kann die eingesetzte DNA vermehrt werden. Durch Erhitzen wird zunächst die doppelsträngige Ausgangs-DNA (Template) denaturiert. Anschließend können sich zwei passenden Oligonukleotidprimern an einen DNA-Einzelstrang anlagern und werden mit neuen Nukleotiden durch eine thermostabile DNA-Polymerase zum komplementären Strang verlängert. Dies erfolgt anfänglich in sehr geringer Geschwindigkeit auf Grund der kleinen eingesetzten Menge an Ausgangs-

DNA und erreicht nach exponentiellem Wachstum wieder eine lineare Vermehrung bis hin zur Stagnation.

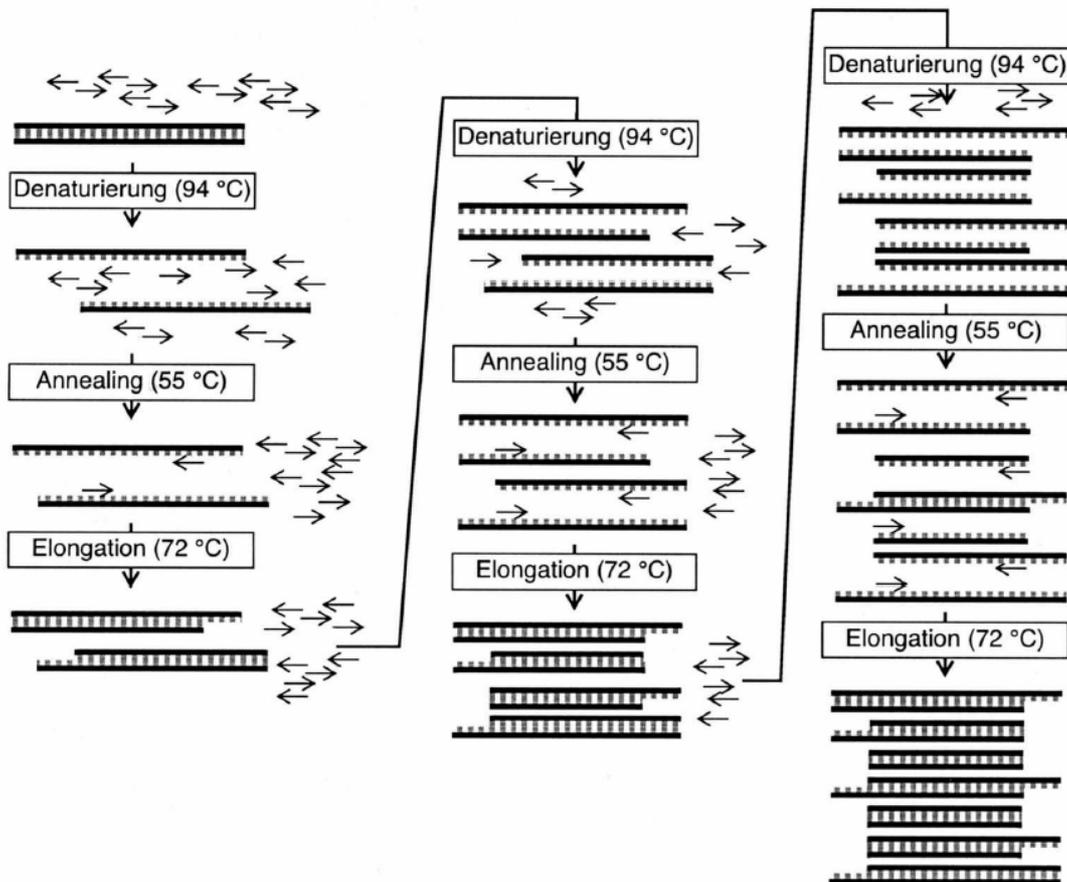


Abbildung 9 Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion: Im ersten Schritt wird durch Erhitzen eine Denaturierung erzielt und die beiden Stränge trennen sich. Im folgenden Schritt (Annealing) kann der Primer bei gesenkter Temperatur an die DNA hybridisieren. Im jeweils letzten Schritt eines Zyklus (Elongation) stellt man die Temperatur auf das Arbeitsoptimum der Polymerase ein, um eine bestmögliche Zweitstrangsynthese zu erzielen (Mühlhardt, 2003).

4.2.6.2 Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Zur Messung der Genexpression wird der Gehalt an spezifischer mRNA aus Zellen bestimmt. Hierbei wird zunächst eine Reverse Transkription durchgeführt, die so gewonnene cDNA wird durch Verwendung genspezifischer Primer weiter amplifiziert. Dabei ergibt sich die Schwierigkeit, dass die Effizienz zwischen 5-90 % schwankt und am Ende nur eine Aussage über die Menge an cDNA im Ansatz getroffen werden kann, nicht aber über den Gehalt an mRNA in den Zellen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Um dem Problem vorzubeugen wird als externer Standard ein so genanntes Haushaltsgen (housekeeping gene) verwendet, das in den Proben konstant exprimiert wird. Anschließend kann die Menge an spezifischem Produkt auf dieses Haushaltsgen bezogen werden. Hierzu wird meist β -Aktin oder die Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) verwendet.

Pro 25 μ l Ansatz:

10x PCR-Puffer	2,50 μ l
5x Q-Solution	5,00 μ l
dNTPs	0,50 μ l
5' Primer	0,50 μ l
3' Primer	0,50 μ l
DEPC-H ₂ O	14,90 μ l
HotStarTaq	0,13 μ l
cDNA	1,00 μ l

verwendete Primer

Produkt	Sinn (5'-3')	Gegensinn (5'-3')
EMMPRIN	GGCCGTGAAGTCGTCAGAAC	GCCACGATGCCCAGGAA
β -Aktin	CACTCTTCCAGCCTTCTTCC	CGGACTCGTCATACTCCTGCTT

Die Proben werden in einem PCR-Cycler mit beheizbarem Deckel unter folgenden Bedingungen eingesetzt:

1. Start der Reaktion/Aktivierung der Taq-Polymerase: 15 min bei 95°C
2. Denaturieren: 30 sek bei 94°C
3. Annealing: 15 sek bei 55°C
4. Extension: 30 sek bei 72°C
5. Finale Extension: 10 min bei 72°C
6. Abbruch der Reaktion: unbegrenzt bei 4°C.

40 Zyklen der Schritte 2-4

Zur Kontrolle und Auswertung werden die Proben in ein 2 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromidzusatz (10 μ l, 10 mg/ml) gegeben und mittels Gelelektrophorese (120 V, 40 min) aufgetrennt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Proben werden vorher mit einem Farbstoff gefärbt und beschwert (6x Loading Dye), zur anschließenden Größenkontrolle der Fragmente lässt man einen DNA-Leiter mitlaufen.

4.2.6.3 Amplifizierung der cDNA mit Assays-on-Demand

Pro 20 µl-Ansatz:

2x PCR-Puffer	10,0 µl
Assay on Demand	1,0 µl
DEPC-H ₂ O	7,5 µl
cDNA	1,5 µl

Die Proben werden jeweils als Doppelansatz für EMMPRIN und das Haushaltsgen GAPDH in spezielle 96-Lochplatten gegeben und anschließend mit einer Folie abgeklebt. Als Negativkontrollen dienen Ansätze ohne cDNA für den jeweiligen Primer. Die Proben werden im AbiPrism unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

1. Start der Reaktion: 15 min bei 95°C
 2. Denaturieren: 10 min bei 95°C
 3. Melting: 15 sek bei 58°C
 4. Annealing/Extension: 1 min bei 60°C
 5. Abbruch der Reaktion: unbegrenzt bei 4°C
- 40 Zyklen der Schritte 3+4

Um die amplifizierte cDNA sichtbar zu machen werden die Proben wie unter Punkt 4.2.6.2 beschrieben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proben werden in die Taschen eines TBE-Gels (6 %) gegeben.

4.2.7 Proteinnachweis mittels Western-Analyse

Diese Methode dient der Detektion und Quantifizierung von Proteinen. Zunächst wird das Proteingemisch mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der Molekularmasse nach aufgetrennt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Das im Laufpuffer vorhandene Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) hebt die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb des Proteins auf, was zum Verlust der Proteinstruktur führt und so das Protein in eine linearisierte Form überführt.

Durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld werden die Proteine auf eine Membran transferiert (blotting) und dort durch hydrophobe Wechselwirkungen gehalten. Durch mehrfaches Waschen der Membran wird das SDS von den Proteinen entfernt, was die erneute Ausbildung der Sekundär- und Tertiärstruktur erlaubt.

Mit bestimmten Farbstoffen wie dem Ponceau S können alle Proteine unspezifisch gefärbt und so der erfolgreiche Transfer der Proteine auf die Membran bestätigt werden. Nach Abblocken der freien, unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein kann der Nachweis der relevanten Proteine mittels Immunodetektion vorgenommen werden.

Die Membran wird zuerst mit einem antigenspezifischen, unmarkierten Primärantikörper und anschließend mit einem Zweitantikörper, der an den konstanten Teil des Primärantikörpers bindet, inkubiert. An den Sekundärantikörper ist ein Enzym gekoppelt, die Meerrettich-Peroxidase (HRP), die die Umsetzung von Luminol katalysiert. Die dabei abgegebene Lumineszenz kann auf einem Röntgenfilm festgehalten werden.

4.2.7.1 Durchführung

Lyse der Zellen zur Proteinbestimmung

Die Zellpakete werden in 200 µl Ripa-Gebrauchslösung aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert, dieser Puffer löst die Proteine auch zum größten Teil aus Membranbestandteilen heraus. Die Inkubation auf Eis verhindert die Degeneration der Proteine. Anschließend wird die Suspension bei 4°C für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die Totallysate in neue Eppendorf-Gefäße überführt.

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung werden je 5 µl der Proben in zwei Vertiefungen einer 96-Loch-Platte zur Doppelbestimmung gegeben. Als Standardlösung wird Bovines Serum Albumin (BSA) in absteigender Konzentration eingesetzt. Nach Zugabe von Bio Rad Probenreagenz A 25 µl und Reagenz B 200 µl in die Vertiefungen werden die Proben bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15 min

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

inkubiert. Anschließend werden die Konzentrationen photometrisch anhand des BSA-Standards bestimmt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Gesamtvolumen von 25 µl pro Tasche enthält 1/3 3x Lämmli und 2/3 Probe-PBS-Gemisch je nach Proteingehalt der Probe. Die Lösungen werden für 7 min bei 95°C denaturiert und anschließend in die Taschen eines 4-20 % Tris-Glycin-Gels gegeben. Als Leiter für die Angabe der Kilodalton dient der Größenmarker See Blue Plus 2. Die Kammer um die Gele wird mit Laufpuffer (SDS-Puffer) gefüllt und mit einer Spannung von 120 V für 120 min bei Raumtemperatur an einen Power-Supply angeschlossen.

Western-Blot

Die Plastikaussenschale wird aufgebrochen und das Gel für den Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran herausgelöst. Bei dem Transfer ist die Innenkammer mit einem Transferpuffer gefüllt und wird erneut für 120 min bei 30 V und Raumtemperatur an den Power-Supply angeschlossen. Um den Transfer zu überprüfen, wird die Membran mit Ponceau S gefärbt. Mit PBS wird anschließend der rote Farbstoff entfernt. Die Membran wird für 30 min in 5 % Trockenmilch in TBS-T geschwenkt um die unspezifischen Bindungsstellen zu sättigen.

Immunodetektion

Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgt bei 4°C über Nacht. Hierfür wird die Membran vorsichtig in einem 50 ml Falcon-Röhrchen zusammen mit dem verdünnten Antikörper gerollt. Der Antikörper wird durch dreimaliges Waschen in TBS-T für je 10 min auf dem Schüttler entfernt. Für die Inkubation des zweiten Antikörpers wird die Membran erneut in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben und bei Raumtemperatur eine Stunde gerollt. Es folgen drei Waschschritte unter gleichen Bedingungen und anschließend zweimaliges kurzes Waschen mit TBS.

Um das Protein sichtbar zu machen, wird auf die Membran etwa 2 ml eines Luminolreagenz gegeben und eine Minute darauf belassen. Bevor die Membran in die Röntgenkassette gelegt wird, entfernt man die Flüssigkeit und bedeckt die Membran mit zwei bis drei Röntgenfilmen. Je nach Intensität des Antikörpers werden

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

nun die Filme zwischen 5 min bis mehrere Stunden in der Kassette belassen und anschließend entwickelt.

4.2.8 Inkubation der Thrombozyten mit rekombinantem EMMPRIN-Fc

Die frisch isolierten Thrombozyten werden in einer Konzentration von 2×10^8 Zellen/ml Medium ausgelegt und für zwei Stunden mit rekombinantem EMMPRIN-Fc in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ inkubiert. Hierbei handelt es sich um ein durch gentechnisch veränderte Organismen hergestelltes EMMPRIN, das an ein Fc-Fragment gekoppelt wird. Als Negativkontrolle erfolgt eine Inkubation mit 5 $\mu\text{g/ml}$ des reinen Fc-Fragments, dem konstanten Teil eines Antikörpers. Anschließend werden die Zellen abgenommen und für eine durchflusszytometrische Analyse mit den murinen monoklonalen Antikörpern gegen humanes CD40L und CD62p (P-Selektin) in einer Konzentration von 1:200 für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

4.2.9 Gewinnung der cDNA von CD34 positiven Zellen

Für die Isolierung der CD34 positiven Zellen nutzt man erneut spezifische Antikörper, die an kleine magnetische Partikel (Beads) gekoppelt sind. Nach Inkubation mit den Antikörpern gegen CD34 positive Zellen werden die Plastikgefäße mit der Zellsuspension in eine magnetische Halterung gespannt und so die gesuchten Zellen an der Wand gehalten. Nach Absaugen des Überstandes können die Gefäße aus der Halterung entnommen und die Zellen in Medium aufgenommen werden.

Für die Isolierung der RNA wird ein gebrauchsfertiger Kit der Firma Qiagen verwendet. Das Vorgehen erfolgt nach Angaben des Herstellers.

Die RNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt, anschließend erfolgt eine Denaturierung der RNA für 5 min bei 65°C . Es wird 1 μg der RNA eingesetzt und mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 14 μl ergänzt. Hinzukommen 6 μl Mastermix bestehend aus 2 μl 10x Reaktionspuffer, 2 μl dNTPs, 1 μl Random

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Hexamers und 1 µl Omniscript RT. Der Ansatz wird gut durchgemischt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Die gewonnene cDNA wird bei -20°C gelagert.

4.2.10 Isolierung von humanen Monozyten aus dem Blut

Für die Gewinnung von Monozyten wird einem gesunden humanen Spender Blut in CDPA-Monovetten mit je 8,5 ml Volumen abgenommen.

Für die Trennung der Zellen nutzt man den Ficoll-dichtegradienten. Das Blut wird in ein 50 ml Falcon-Röhrchen vorsichtig über Ficoll geschichtet, um ein Zwei-Phasen-Gemisch zu erhalten. Es erfolgt eine Auftrennung bei 17-minütiger Zentrifugation mit 2100 rpm ohne Bremse. Der Intermediärring enthält vor allem mononukleäre Zellen (Monozyten und Granulozyten) und wird in ein frisches Gefäß überführt und mit PBS zweimal gewaschen. Das Zellpaket wird in 20 ml Medium (VLE RPMI 1640) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) aufgenommen und in eine große Petrischale gegeben. Die Monozyten adhärieren über Nacht an die Plastikoberfläche, die Lymphozyten verbleiben in Suspension und können vorsichtig heruntergewaschen werden. Die Petrischalen mit den adhärenen Monozyten werden zunächst mit 10 ml 0,1 % EDTA in PBS für 15 min auf Eis gestellt und anschließend mit PBS durch Resuspendieren vom Boden gelöst. Nach einem Waschschrift mit PBS können die Monozyten gezählt und in gewünschter Konzentration im Medium aufgenommen werden. Die Zellen sollten vor weiterer Verwendung mindestens 4 std ruhen, da sie durch die Waschschrift aktiviert werden.

4.2.11 Verringerung der Genprodukte (gene silencing)

Der Vorgang der RNA-Interferenz (RNAi) kann in zwei Hauptphasen eingeteilt werden. In der ersten Phase werden längere, doppelsträngige RNA-Abschnitte von dem so genannten Dicer (RNase III Enzym) erkannt und in kleinere 21-24 Nukleotide lange RNA-Stücke geteilt (siRNA, small interfering). In der zweiten Phase werden die siRNAs in einen Proteinkomplex eingeschleust, der, induziert durch RNA, die

Verringerung bestimmter Genprodukte bewirkt (RISC, RNA-induced silencing complex). Eine Helikase in dem RISC trennt die Stränge der RNA-Abschnitte voneinander und die einzelsträngigen Teile können mit hoher Spezifität an mRNAs binden. Eine bisher nicht näher identifizierte RNase (Slicer) und der RISC tragen zum Abbau der nicht gebundenen mRNA-Stücke bei.

Durch die Degradierung der mRNAs verringert sich die Konzentration der entstandenen Genprodukte. Um die Expression von spezifischen Zielgenen durch RNA-Interferenz zu verringern, werden synthetische siRNAs verwendet (Stevenson, 2004).

4.2.11.1 Durchführung

Frisch isolierte Monozyten werden in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in T25-Kulturflaschen mit VLE RPMI 1640 Medium + 10 % FCS (Monozytenmedium) inkubiert und 4 std im Inkubator ruhend belassen. Anschließend werden die Monozyten mit einer spezifischen siRNA gegen humanes EMMPRIN für 16 std vorbehandelt. Hierbei wird nach Anweisung des Herstellers verfahren. Als Kontrolle dient eine unspezifische siRNA, die keinen Einfluss auf die EMMPRIN-Expression nimmt. Eine 24-Loch-Platte wird für 2 std in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ mit Kollagen vorbeschichtet. Anschließend werden pro Vertiefung 10^5 frisch isolierte Thrombozyten ausgelegt und für 1 std vorstimuliert. Die Monozyten werden von der Kulturflasche gelöst und erneut gezählt. In jede Vertiefung werden 10^5 Monozyten in 200 μl Monozytenmedium zugegeben und für 8 und 24 std koinkubiert. Anschließend können die Zellkulturüberstände gewonnen werden für die Bestimmung des IL-6 mittels ELISA und für den Einsatz in der SDS-PAGE-Zymographie. Als weitere Kontrollen werden zusätzlich Monozyten und Thrombozyten sowohl mit als auch ohne Kollagen-Stimulation inkubiert.

4.2.12 Enzym linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Bei der Technik des so genannten Sandwich-ELISAs werden zwei spezifische Antikörper verwendet, die beide das zu bestimmende Antigen binden, aber an

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

unterschiedlichen Stellen. Das benötigte Material wird gebrauchsfertig mit allen benötigten Reagenzien als Paket (Kit) geliefert, die Anwendung erfolgt nach der mitgelieferten Anleitung.

Die zu verwendende 96-Loch-Mikrotiterplatte ist mit dem ersten Antikörper beschichtet. Die Proben werden in die Vertiefungen gegeben, das gesuchte Antigen spezifisch gebunden und der Überschuss anschließend heruntergespült. Mit Hilfe des zweiten Antikörpers entsteht erneut eine spezifische Bindung zu dem Antigen, diese Bindung kann gemessen werden, da der Antikörper mit Meerrettich-Peroxidase (HRP, Horseradish Peroxidase) oder Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Auch der überschüssige zweite Antikörper wird abgespült und die Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe mit einem Chromogen inkubiert. Die HRP oder AP aktivieren den Farbstoff und ermöglichen so die Messung der Farbintensität im Photometer, die direkt proportional zur Konzentration des Antigens ist.

4.2.13 Adhäsion von Monozyten an EMMPRIN-Fc, Inkubation mit einem NF- κ B-Inhibitor

Für die Adhäsion werden zwei Vertiefungen einer 6-Loch-Platte mit dem rekombinanten Protein EMMPRIN-Fc in einer Konzentration von 50 μ g/ml für 4 std vorbeschichtet. Als Kontrolle dient eine Vorbeschichtung mit dem reinen Fc-Fragment (5 μ g/ml). Anschließend werden Monozyten in einer Konzentration von 10^6 /ml VLE RPMI 1640 + 10 % FCS in die Vertiefungen gegeben und für 6 und 24 std inkubiert. Einem Ansatz Monozyten an EMMPRIN-Fc wird ein IKK-Inhibitor in einer Konzentration von 10 μ M/ml gegeben. Als Positivkontrolle werden mit LPS (1 μ g/ml) stimulierte Monozyten eingesetzt.

Nach der Inkubation werden die Zellsuspensionen zentrifugiert, die Überstände abgenommen und die Zellen lysiert. Die Zellpakete werden in NTE-Lysepuffer aufgenommen und bei 13000 rpm für 20 min zentrifugiert. Anschließend kann das Totallysat abgenommen und in frische Eppendorfgefäße gegeben werden. Die Lysate dienen der Durchführung einer Western-Analyse. Die Zellkulturüberstände werden in der SDS-PAGE-Zymographie eingesetzt sowie zur Durchführung eines IL-6-ELISA verwendet.

4.2.14 Retrovirale Infektion von HEK 293-Zellen

HEK 293-Zellen werden mit einem Retrovirus infiziert, das in den Zielzellen eine Überexpression von EMMPRIN hervorruft. Zur visuellen Kontrolle wird das EMMPRIN als Fusionsprotein mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff (gfp, green fluorescence protein) synthetisiert. Als Kontrollen dient ein Retrovirus, das lediglich die Information des gfp in die Zellen einschleust. Das Virus stammt von der Firma Trigen in Martinsried.

4.2.15 *In vitro* Generierung von murinen Thrombozyten aus Stammzellen

Die männlichen C57BL/6 Mäuse mit einem Alter zwischen 6 und 8 Wochen und einem Gewicht zwischen 20 und 25 g werden zu Beginn durch zervikale Dislokation getötet und kurz in 70 % Ethanol desinfiziert, die Hintergliedmaßen werden enthäutet und im Hüftgelenk abgetrennt. Tibia und Femur werden von Muskeln befreit und isoliert. Mit einer Skalpellklinge werden die proximalen und distalen Enden der Knochen abgetrennt, und das Knochenmark mit einer grauen Kanüle, aufgesetzt auf eine 10 ml Spritze mit MACS-Puffer herausgespült. Das Knochenmark mehrerer Mäuse wird in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt.

Zur Auftrennung der einzelnen Bestandteile bedient man sich des Dichtegradienten, indem 35 ml der Zellsuspension über 15 ml Percoll geschichtet werden und in der Zentrifuge bei 1800 rpm, 14 min ohne Bremse in drei Phasen getrennt werden. Die Interphase wird vorsichtig abgesaugt, in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit MACS-Puffer gewaschen. Die Zentrifugation erfolgt bei 1800 rpm für 8 min mit Bremse. Die Zellen werden in IMDM-Basalmedium aufgenommen und in 6-Lochplatten mit je 2 ml Zellsuspension pro Vertiefung ausgelegt und für 2 std im Brutschrank inkubiert. Die Zellen in Suspension werden erneut abzentrifugiert, in 9 ml modifiziertem IMDM-Medium pro Maus aufgenommen und erneut in 6-Lochplatte ausgelegt mit 1,5 ml pro Vertiefung.

Die Stammzellen werden in dem speziellen Medium inkubiert, um eine Differenzierung zu Megakaryozyten zu fördern. Nach weiteren 4-6 Wochen ist die größte Zahl an Thrombozyten generiert.

4.2.16 Infektion der murinen Megakaryozyten mit einem Retrovirus zur Überexpression von EMMPRIN

Es soll eine Überexpression von humanem EMMPRIN auf murinen Thrombozyten erzielt werden. Die murinen Megakaryozyten werden mit dem Retrovirus infiziert. Das Virus induziert die Amplifikation der eingeschleusten Genkassette, die die Sequenz von humanem EMMPRIN trägt, als Fusionsprotein mit gfp. Das Kontrollvirus enthält ausschließlich das gfp, so lässt sich visuell die erfolgreiche Infektion überprüfen. Die EMMPRIN-überexprimierenden murinen Megakaryozyten und Thrombozyten stammen von der Firma Trigen in Martinsried.

4.2.17 Durchflusszytometrie der rekombinanten Megakaryozyten

Die größeren Stammzellen werden nach etwa sechs Tagen in Kultur abgenommen und für die Messung vorbereitet. Hierbei dient das gfp als Kontrolle der infizierten Zellen und zum Setzen des Rasters um die positiven Zellen. Die Zellen werden mit den Primärantikörpern CD41 anti Maus und dem CD147 anti Human inkubiert. Als Sekundärantikörper wird ein Cy5 gekoppelter Antikörper eingesetzt, in einer Konzentration von 1:80, der in der vierten Fluoreszenz gemessen wird. Als Kontrolle dienen ungefärbte Zellen und Zellen, die nur mit dem Zweitantikörper inkubiert werden.

4.2.18 Konfokale Rasterscanmikroskopie der rekombinanten Megakaryozyten

Zur weiteren Überprüfung der erfolgreichen Infektion und Expression werden die EMMPRIN-gfp und gfp infizierten Megakaryozyten mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Auch die Lokalisation lässt sich hierbei bestimmen.

Die Megakaryozyten adhärieren an Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern, werden für 20 min bei Raumtemperatur mit Formaldehyd (3,7 %) fixiert, anschließend mit PBS gespült und ohne weitere Behandlung mit Mounting Medium eingedeckelt.

4.2.19 Durchflusszytometrie der rekombinanten Thrombozyten

Die Plättchen werden hierfür nach 4-6 Wochen abgenommen und zum Teil mit Kollagen stimuliert in den Konzentrationen 5 und 15 µg/ml. Es werden direkt konjugierte Primärantikörper verwendet in einer Konzentration von 1:20. Zur Detektion der Aktivierungsmarker wird CD62p-FITC anti Maus und CD40L-PE anti Maus eingesetzt. Als Negativkontrolle dienen ungefärbte Plättchen.

4.2.20 Koinkubation rekombinanter, muriner Thrombozyten mit humanen Monozyten

Für die Kokultivierung werden die EMMPRIN-gfp und gfp-überexprimierenden, murinen Thrombozyten unstimuliert oder nach Vorstimulation mit 10 µg/ml Kollagen für 15 min eingesetzt. In eine 96-Loch-Platte werden 10^4 Monozyten ausgelegt sowie 10^4 Thrombozyten. Zur Kontrolle werden sowohl Monozyten als auch die Plättchen alleine inkubiert. Anschließend wird das Volumen auf 100 µl mit VLE RPMI 1640 + 10 % FCS aufgefüllt. Der äußere Ring der Platte wird mit PBS aufgefüllt um ein Austrocknen der geringen Probenflüssigkeit zu verhindern. Der Ansatz wird sowohl in

unbeschichteten Platten durchgeführt als auch in über Nacht mit Kollagen beschichtete Platten. Die Überstände werden nach 24 und 48 stündiger Inkubation im Brutschrank abgenommen, bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert und in frische Eppendorfgefäße überführt.

4.2.21 Zymographie

Zymogen ist die Bezeichnung für eine inaktive Enzymvorstufe, die erst durch Proteasen, das Enzym selbst oder chemische Verbindungen in die aktive Form umgewandelt wird. Bei der SDS-PAGE-Zymographie werden, wie bei der Western-Analyse, die Proteine denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Dem Gel ist das Substrat Gelatine für bestimmte Matrix Metalloproteinasen zugesetzt. Nach Auftrennung werden die Proteine renaturiert und bei 37°C inkubiert. Aufgrund der Substratspezifität degradieren die Gelatinasen MMP-2 und -9 die Gelatine. Die abschließende Färbung mit Coomassie Blue Lösung macht den Gelatineabbau sichtbar. Der Lysehof bleibt ungefärbt und die Größe lässt daher Rückschlüsse auf die Enzymaktivität zu.

4.2.21.1 Durchführung

Vor dem Einsetzen in das Gel werden die Proben 10 min bei Raumtemperatur mit denaturierendem Puffer in gleichen Teilen inkubiert. Anschließend wird die Kammer mit gekühltem SDS-Puffer befüllt und je 10 µl Probengemisch in die Taschen gegeben, als Leiter dient erneut See Blue Plus 2. Das Gel wird im Kühlschrank bei 4°C an den Power-Supply bei 125 V für 120 min angeschlossen. Die Gele werden nach Aufbrechen der Kammer entnommen und für 30 min bei Raumtemperatur in 100 ml Renaturierungspuffer inkubiert. Anschließend wird der Puffer ausgetauscht gegen 100 ml Entwicklungspuffer und bei 37°C für 24 std geschwenkt. Die Gele werden für 30 min in verdünnter Coomassie Blue Lösung zum Färben gelegt und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Nun können die Gele zwischen zwei Cellophan Folien unter Zugabe von Drying Solution getrocknet werden.

5 ERGEBNISSE

In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte eine verstärkte Expression von EMMPRIN- und MT1-MMP auf Monozyten während eines akuten Myokardinfarktes nachgewiesen werden. Bei zellulären Interaktionen induziert EMMPRIN eine gesteigerte Sekretion und Aktivität der MMP-9 in Monozyten sowie der MMP-2 in glatten Muskelzellen. Dies lässt auf eine mögliche Schlüsselrolle von EMMPRIN bei der MMP-Aktivierung im Rahmen kardiovaskulären Erkrankungen schließen (Schmidt, 2006).

EMMPRIN gilt als Ligand für sich selber, durch die Formation von Homo-Oligomeren zweier Proteine kommt es zur zellulären Interaktion. In unseren Untersuchungen haben wir die Beteiligung dieser Signalübermittlung bei der Monozyten-Thrombozyten-Interaktion untersucht. Der erste Schritt gilt dem Nachweis des Rezeptors auf Blutplättchen, der vorher nicht erbracht war.

5.1 Nachweis von EMMPRIN auf Thrombozyten

5.1.1 Nachweis von EMMPRIN auf Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie, Aufregulation durch Stimulation mit Thrombin

Die frisch isolierten humanen Thrombozyten werden mit und ohne Stimulation in der Durchflusszytometrie eingesetzt. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen Thrombozyten werden nur intakte Zellen ausgewertet und der Gehalt an EMMPRIN an der Zelloberfläche durch Verwendung eines Zweitantikörpers gemessen.

Ruhende Thrombozyten weisen EMMPRIN in geringer Konzentration an der Zelloberfläche auf. Der Gehalt lässt sich durch Zellstimulation aufregulieren und ist im Vergleich zu ruhenden Plättchen signifikant höher.

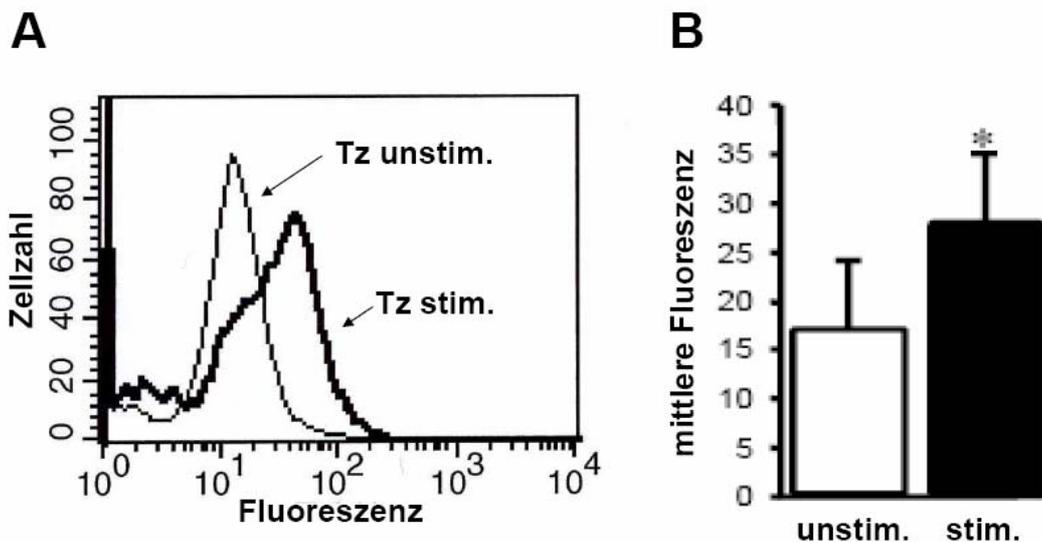


Abbildung 10 Nachweis von EMMPRIN auf Thrombozyten und Regulation von EMMPRIN auf Thrombozyten durch Stimulation mit Thrombin: A) Repräsentative Histogramme und B) statistische Auswertung der Oberflächenexpression (Durchflusszytometrie, n=8, *p<0,05) von EMMPRIN auf Thrombin-stimulierten (0,1 U/ml Thrombin für 1 std) Thrombozyten im Vergleich zu nicht aktivierten Thrombozyten.

5.1.2 EMMPRIN-Nachweis mittels konfokaler Laserscanmikroskopie

In den durchflusszytometrischen Untersuchungen konnte erstmals das Vorkommen von EMMPRIN auf Thrombozyten und die vermehrte EMMPRIN-Oberflächenexpression nach Stimulation der Thrombozyten nachgewiesen werden. Dadurch stellt sich die Frage, ob das EMMPRIN in den Thrombozyten während der Stimulation durch den Rest der megakaryozytären oder mitochondrialen mRNA neu synthetisiert, oder der bereits synthetisierte Rezeptor durch Stimulation vermehrt an die Oberfläche exprimiert wird.

Dazu werden die stimulierten und ruhenden Thrombozyten für die konfokale Laserscanmikroskopie präpariert. Es soll zunächst die Spezifität der Zellen dargestellt werden und dann die EMMPRIN-Expression.

Das Färbemuster deutet darauf hin, dass das EMMPRIN im Zellinneren gespeichert wird und nach Stimulation vermehrt an die Zelloberfläche exprimiert wird. Das Verteilungsmuster von EMMPRIN ist vergleichbar mit der Lokalisation des GP IIb/IIIa. Von dem Glykoprotein IIb/IIIa ist bekannt, dass es in den α -Granula gespeichert wird und nach Stimulation der Thrombozyten durch Degranulation vermehrt an der Oberfläche exprimiert wird (Gawaz, 2001).

ERGEBNISSE

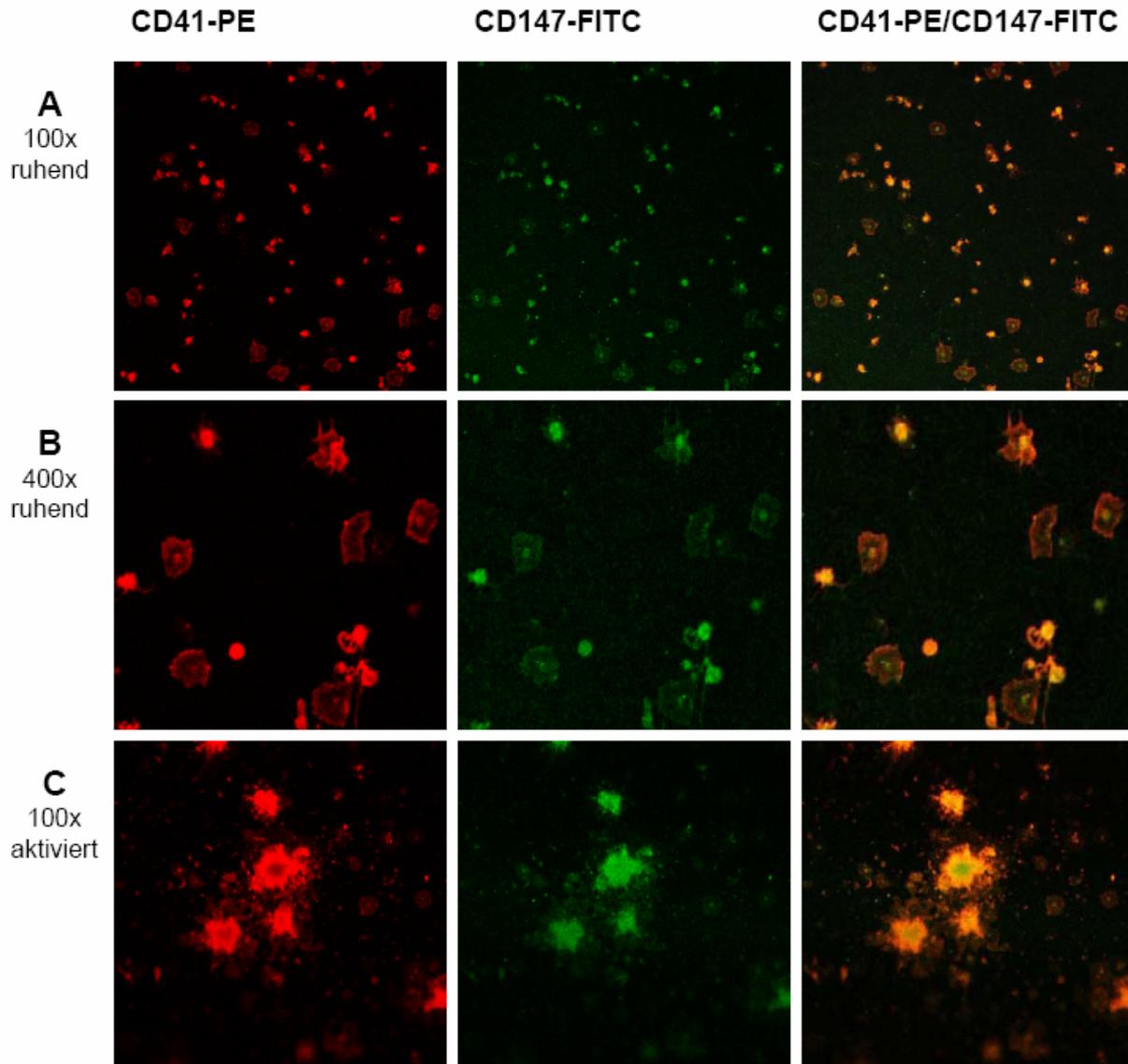


Abbildung 11 Nachweis von EMMPRIN in/auf Thrombozyten mittels konfokaler Laserscanmikroskopie: Die Bilder zeigen den Nachweis des zellspezifischen Glykoproteins IIb/IIIa der Thrombozyten (CD41-PE) und von EMMPRIN (CD147-FITC) in Einzelbetrachtung der Fluoreszenzkanäle (Spalte 1 und 2). In Spalte 3 erfolgt die Betrachtung beider Kanäle übereinander gelagert. CD41 und EMMPRIN lässt sich im Zellinneren der ruhenden Thrombozyten nachweisen. (A: 100fache Vergrößerung, B 400fache Vergrößerung) C) In den Abbildungen der letzten Zeile ist das Vorkommen der Antikörper auf der Zelloberfläche der stimulierten Thrombozytenaggregate (0,1 U/ml Thrombin für 1 std) in 100facher Vergrößerung sichtbar.

5.1.3 Ultrastruktureller Nachweis von EMMPRIN mittels Elektronenmikroskopie

In den Thrombozyten befinden sich mehrere Granula, die durch Stimulation ihre Inhalte an die Oberfläche abgeben können. Um die Lokalisation von EMMPRIN genau bestimmen zu können, werden die Zellen identisch der Vorbereitung für die Durchflusszytometrie präpariert. Das EMMPRIN wird mit Goldpartikeln markierten Antikörpern dargestellt.

Hierbei zeigt sich die Lokalisation von EMMPRIN im offenen kanalikulären System der ruhenden Thrombozyten. Durch Stimulation der Zellen werden die bis weit ins Zellinnere ragenden Gänge des offenen kanalikulären Systems ausgestülpt und bilden die so genannten Pseudopodien. Es kommt zu einer Translokation des Proteins an die Zelloberfläche.

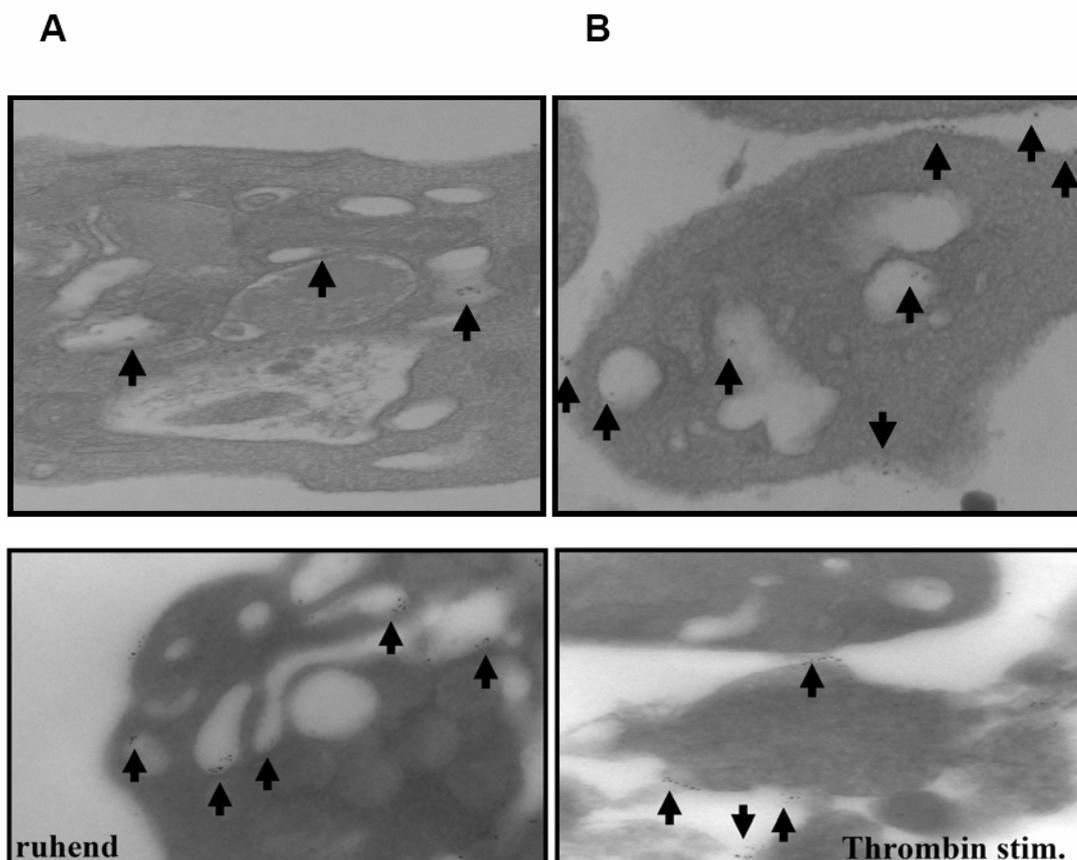


Abbildung 12 EMMPRIN-Nachweis in/auf Thrombozyten mittels Gold-Markierung (Elektronenmikroskopie): A) Nachweis von EMMPRIN im offenen kanalikulären System bei ruhenden Thrombozyten. B) Eine Thrombinstimulierung (0,1 U/ml für 1 std) induziert die Translokation von EMMPRIN an die Thrombozytenoberfläche.

ERGEBNISSE

5.1.4 Nachweis der EMMPRIN-mRNA in Megakaryozyten und Thrombozyten mittels PCR

Da es sich im Rahmen der Dissertation um den erstmaligen Nachweis von EMMPRIN auf Blutplättchen handelt, wurde auch das Vorhandensein der EMMPRIN codierenden mRNA in Megakaryozyten und Thrombozyten mittels RT-PCR nachgewiesen.

Hierfür wurde RNA humaner Megakaryozyten in der konventionellen PCR eingesetzt, als Positivkontrolle für die Methode wurde neben dem EMMPRIN ebenfalls das Strukturprotein β -Aktin amplifiziert. Dabei zeigt sich deutlich das Vorkommen von EMMPRIN cDNA in Megakaryozyten.

Dieses Ergebnis konnte bei Durchführung einer Real-Time PCR bestätigt werden. Auch in Thrombozyten konnte EMMPRIN cDNA mittels Real-Time PCR nachgewiesen werden. Bei der Real-Time PCR wurde neben dem EMMPRIN als Standard das GAPDH der jeweiligen Zellen amplifiziert, zur Visualisierung wurden die PCR-Produkte in einem 6 % TBE-Gel aufgetragen.

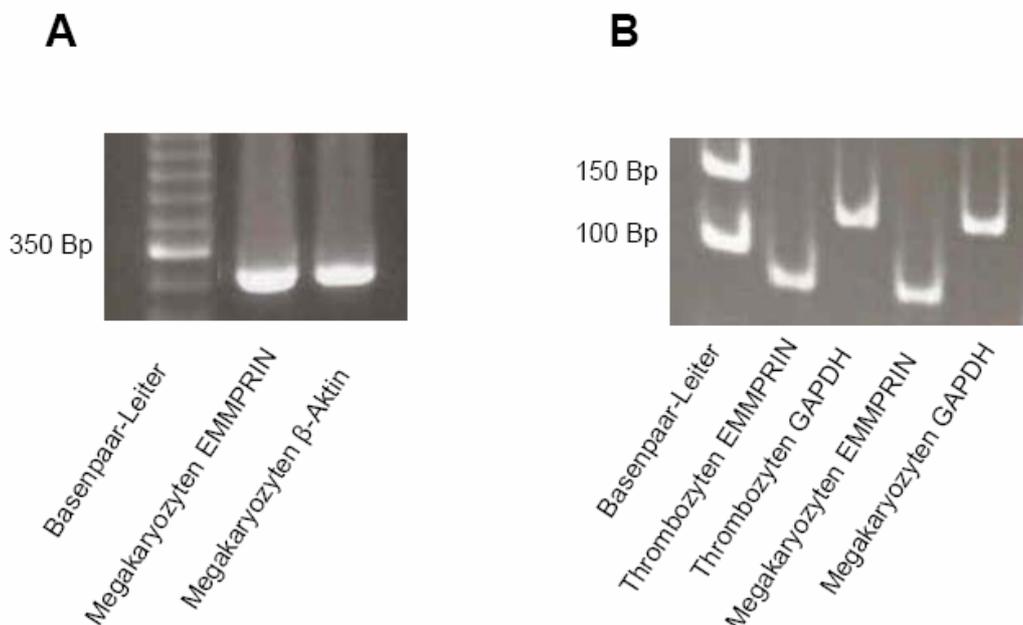


Abbildung 13 Nachweis von EMMPRIN-mRNA der Thrombozyten und Megakaryozyten: A) mittels RT-PCR der cDNA aus Megakaryozyten wurde das EMMPRIN und zur Kontrolle das β -Aktin amplifiziert. B) Visualisierung der spezifischen Real-Time-PCR-Endprodukte von Thrombozyten und Megakaryozyten mit GAPDH als Kontrolle in 6 %-TBE-Gel.

ERGEBNISSE

5.1.5 Nachweis der EMMPRIN-Expression auf Proteinebene mittels Western-Analyse

In einem weiteren Schritt wurde EMMPRIN in humanen Thrombozyten auf Proteinebene im Western-Blot nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde wiederum das Strukturprotein β -Aktin bestimmt.

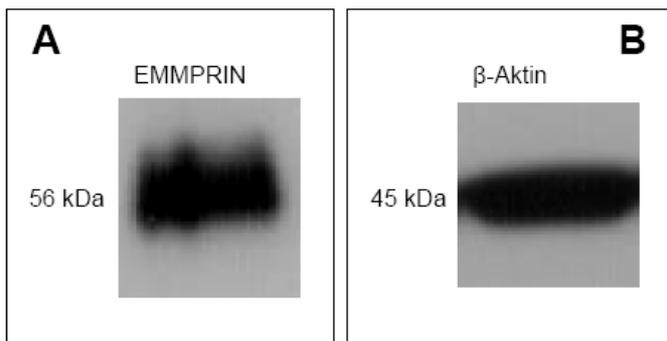


Abbildung 14 Nachweis von thrombozytärem EMMPRIN-Protein mittels Western-Analyse: A) EMMPRIN wurde in Zelllysaten von humanen Thrombozyten nachgewiesen. B) Nachweis des Strukturproteins β -Aktin zur Kontrolle. (kDa: Kilodalton)

5.2 Aktivierung von Thrombozyten durch Inkubation mit rekombinantem EMMPRIN-Fc

Es konnte somit der Nachweis einer aktivierungsabhängigen EMMPRIN-Expression auf Thrombozyten erbracht werden, ergänzt durch ultrastrukturelle Untersuchungen und den Nachweis der EMMPRIN codierenden mRNA in Thrombozyten. Daher wurde in den folgenden Untersuchungen die pathophysiologische Relevanz der thrombozytären EMMPRIN-Expression näher charakterisiert.

Die Bindung frisch isolierter Thrombozyten an rekombinantes EMMPRIN-Fc führt zu einer Zellaktivierung mit Aufregulation der Aktivierungsmarker CD40-Ligand und P-Selektin. Als Negativkontrolle wurden Thrombozyten mit dem reinen Fc-Fragment unter gleichen Bedingungen stimuliert. Dies deutet auf eine direkte aktivierende Wirkung von EMMPRIN auf Thrombozyten hin.

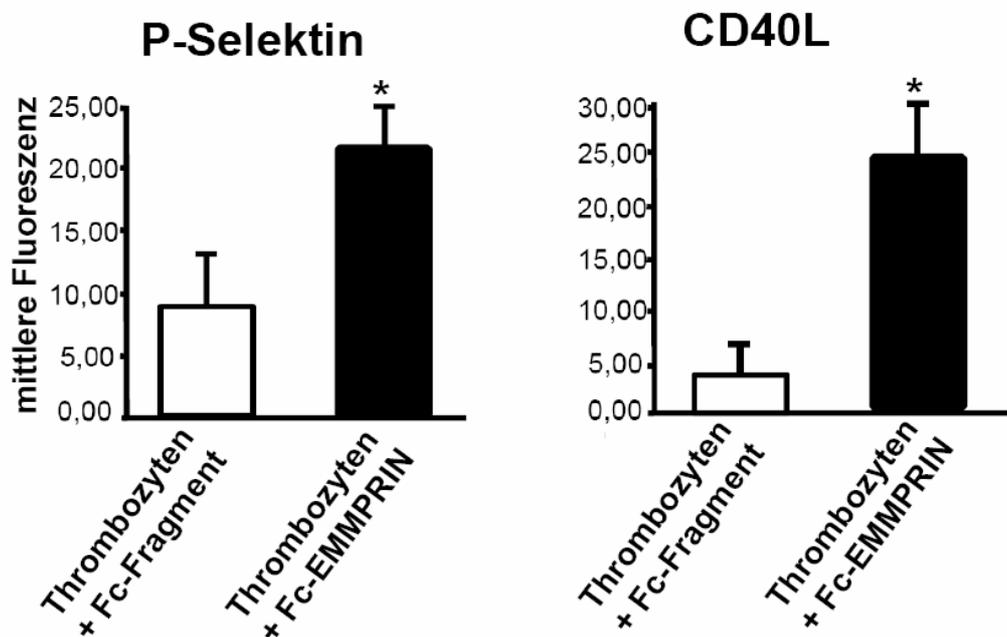


Abbildung 15 Aufregulierung von P-Selektin und CD40L auf Thrombozyten nach Inkubation mit rekombinantem EMMPRIN-Fc: Statistische Auswertung der thrombozytären Oberflächenexpression von P-Selektin und CD 40L als Marker der Thrombozytenaktivierung nach zweistündiger Inkubation mit löslichem rekombinantem EMMPRIN-Fc (50 µg/ml) und dem reinen Fc-Fragment (5 µg/ml) als Negativkontrolle (n=8, *<0.05).

5.3 Auswirkung der thrombozytären EMMPRIN-Expression im Rahmen zellulärer Wechselwirkungen mit Monozyten

5.3.1 Beeinflussung der MMP-Aktivierung durch die EMMPRIN-EMMPRIN-Wechselwirkung zwischen Monozyten und Thrombozyten

Die ursprüngliche Funktion von EMMPRIN besteht in der Induktion von MMPs bei zellulären Wechselwirkungen. Daher wurde die Aktivität der monozytären MMP-9 bei Koinkubation mit Thrombozyten gemessen. Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der MMP-9-Aktivität durch Koinkubation mit Thrombozyten. Wurde der Rezeptor für das thrombozytäre EMMPRIN, das EMMPRIN auf Monozyten durch spezifische siRNA inhibiert, kam es wieder zu einer deutlichen Reduktion der MMP-Aktivität.

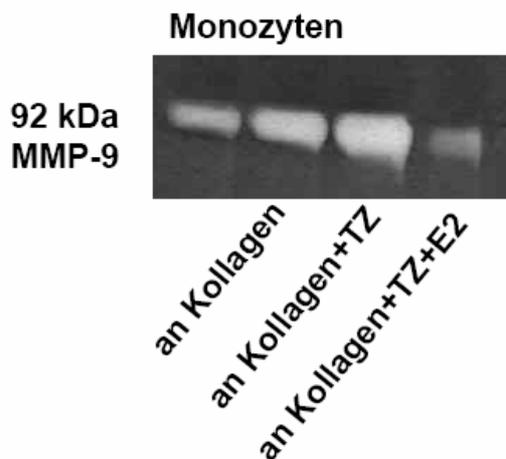


Abbildung 16 Erhöhte MMP-9-Aktivität nach Koinkubation von Monozyten mit Thrombozyten: Die Koinkubation Kollagen-vorstimulierter Thrombozyten mit Monozyten führt zu einer vermehrten MMP-9-Aktivität, Nachweis mittels SDS-PAGE-Zymographie. Die Vorbehandlung der Monozyten mit einer EMMPRIN-spezifischen siRNA führt zu einer Reduktion der Thrombozyten-induzierten MMP-Aktivität.

5.3.2 Beeinflussung der IL-6-Sezernierung von Monozyten durch die EMMPRIN-EMMPRIIN-Wechselwirkung zwischen Monozyten und Thrombozyten

Durch zelluläre Wechselwirkung zwischen Thrombozyten und Monozyten können proinflammatorische Signalwege induziert werden. Daher haben wir die Bedeutung der EMMPRIN-EMMPRIIN-Wechselwirkung während der Monozyten-Thrombozyten-Interaktion für die Zytokinsekretion näher untersucht. Es zeigt sich eine deutlich gesteigerte monozytäre Sekretion von Interleukin-6 nach Koinkubation mit Thrombozyten. Sehr deutlich ist der Unterschied, werden die Thrombozyten mit Kollagen vorstimuliert. Als Negativkontrolle dienen Monozyten in Monokultur, die ebenfalls mit Kollagen stimuliert werden, um auszuschließen, dass die stimulierende Wirkung auf die Monozyten von dem Kollagen ausgeht. Um die Relevanz von EMMPRIN an dieser Wechselwirkung zu überprüfen, werden Monozyten mit einer spezifischen siRNA vorbehandelt, die die EMMPRIN-Oberflächenexpression auf Monozyten stark hemmt. Ruhende Monozyten sezernieren keine nachweisbaren Mengen an IL-6. Die Koinkubation mit Kollagen-stimulierten und somit vermehrt EMMPRIN-exprimierenden Thrombozyten führt zu einer deutlich gesteigerten IL-6-Sekretion von Monozyten. Die vermehrte IL-6-Sekretion geht nach monozytärer EMMPRIN-Inhibition wieder deutlich zurück. Diese Untersuchungen zeigen, dass die Wechselwirkung von EMMPRIN auf Thrombozyten mit EMMPRIN auf Monozyten eine IL-6-Sekretion der Monozyten induziert.

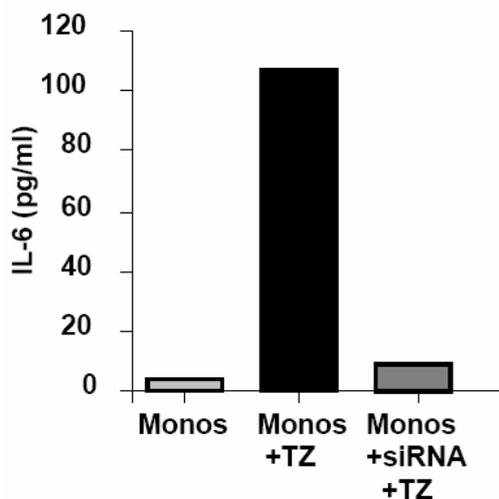


Abbildung 17 Aufregulation des IL-6 durch Koinkubation von Monozyten mit Thrombozyten: Die Sekretion des monozytären IL-6 wird gesteigert durch die Koinkubation mit Kollagen vorstimulierten Thrombozyten, gemessen mittels ELISA. Durch EMMPRIN-Inhibition der Monozyten mit einer spezifischen siRNA sinkt der Gehalt an sezerniertem IL-6 deutlich ab. Dies zeigt, dass die Sekretion von IL-6 EMMPRIN vermittelt stattfindet. (TZ: Thrombozyten, Monos: Monozyten)

5.4 *Retrovirale Infektion zur Überexpression von EMMPRIN in den Zielzellen*

5.4.1 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis des Fusionsproteins auf der Oberfläche von HEK-293-Zellen

Um die Rolle von EMMPRIN auf Thrombozyten während zellulärer Interaktionen näher zu charakterisieren, wurden rekombinante EMMPRIN-überexprimierende Thrombozyten generiert. Das EMMPRIN-gfp-kodierende Virus und das gfp-kodierende Kontrollvirus wurden uns freundlicherweise von der Trigen GmbH zur Verfügung gestellt. Zunächst wurde kontrolliert, ob das EMMPRIN-gfp-Fusionsprotein in die Zellmembran eingebaut wird. Dazu wurde die HEK-293-Zelllinie mit dem EMMPRIN-gfp- und gfp-Virus infiziert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die kontrollinfizierten Zellen speichern das gfp verteilt im Zellinneren, während die Zellen infiziert mit dem Fusionsprotein das EMMPRIN-gfp an der Zelloberfläche exprimieren.

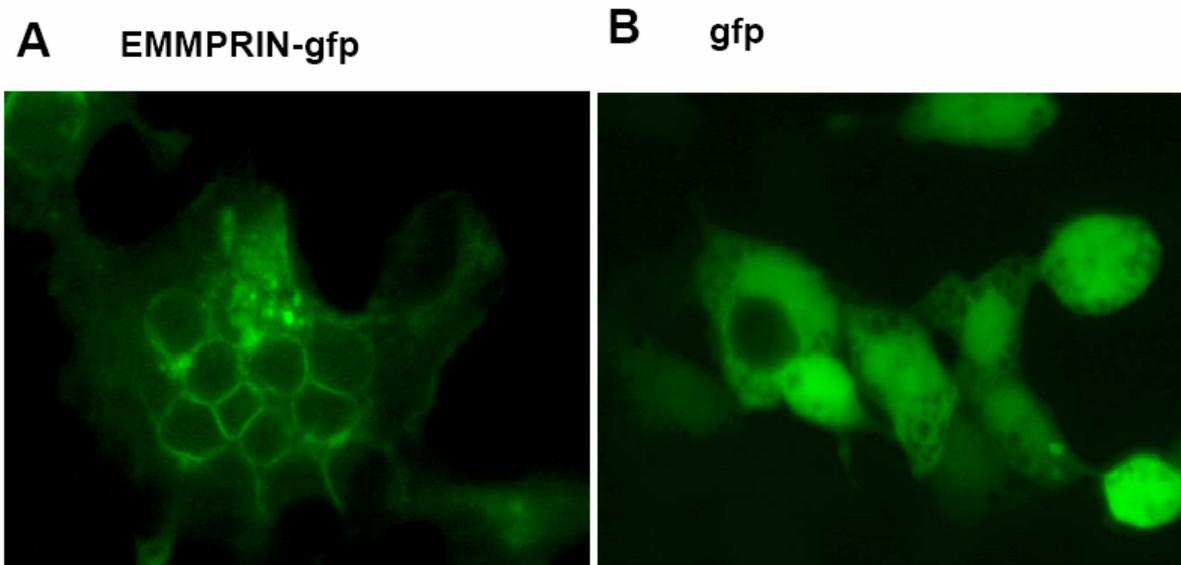


Abbildung 18 Kontrolle des EMMPRIN-gfp-Retrovirus: HEK-293-Zellen wurden mit dem EMMPRIN-gfp-Retrovirus (A) und mit einem gfp-Retrovirus (B) infiziert. Die EMMPRIN-Lokalisation und -Expression wurde fluoreszenzmikroskopisch überprüft. A) zeigt die EMMPRIN-gfp-Expression in der Zellmembran. B) zeigt die Kontrollinfektion der Zellen. Das gfp wird im Zellinneren gespeichert.

5.4.2 Überexpression von EMMPRIN auf murinen Megakaryozyten und Thrombozyten

Hierfür wurden zunächst murine Megakaryozyten aus CD34 positiven Knochenmarkstammzellen generiert und mit dem Retrovirus infiziert. Die rekombinanten Thrombozyten werden *in vitro* über vier bis sechs Wochen aus den transfizierten Megakaryozyten gebildet. Die Kontrollzellen wurden mit dem Kontroll-gfp-Virus infiziert.

5.4.2.1 Durchflusszytometrie rekombinanter Megakaryozyten

Die EMMPRIN-gfp-überexprimierenden Megakaryozyten sowie die gfp-Kontrollzellen werden zunächst in der Durchflusszytometrie eingesetzt, um die Expression von EMMPRIN an der Oberfläche der Zellen zu verifizieren. Für die Auswertung werden die Zellen bestimmt, die deutlich gfp positiv sind, und somit sicher mit dem Retrovirus infiziert wurden.

Die statistischen Daten belegen eine signifikant erhöhte Fluoreszenz der EMMPRIN-gfp-Megakaryozyten bei Detektion des Antikörpers gegen humanes CD147.

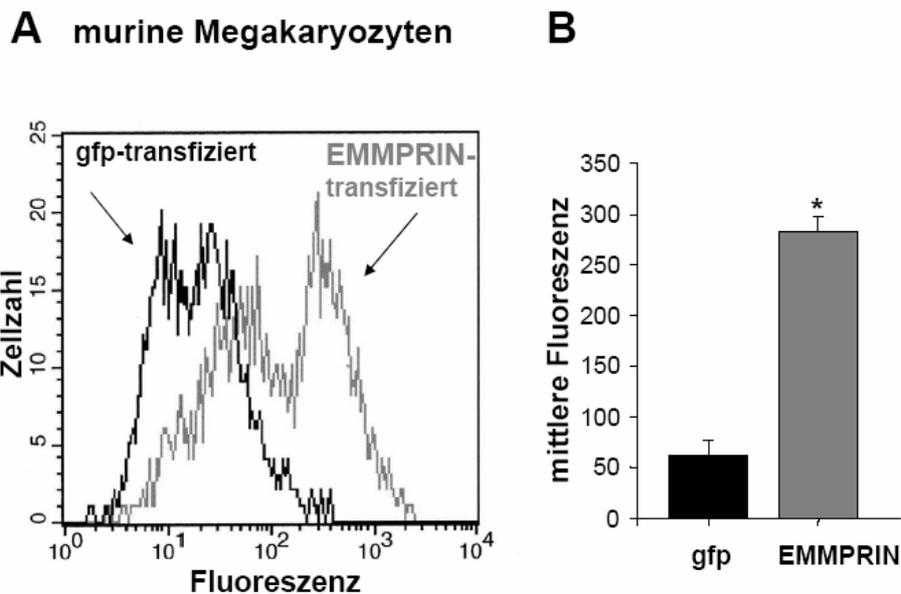


Abbildung 19 Nachweis von humanem EMMPRIN auf rekombinanten murinen Megakaryozyten: A) Repräsentative Histogramme und B) statistische Auswertung der Oberflächenexpression (Durchflusszytometrie, n=3, *p<0,05) von EMMPRIN auf retroviral infizierten EMMPRIN-gfp-Megakaryozyten im Vergleich zu gfp-Kontrollzellen.

5.4.2.2 Lokalisation des *gfp* an der Membran der Megakaryozyten

Der grüne Fluoreszenzfarbstoff *gfp* lässt sich in der konfokalen Laserscanmikroskopie ohne weitere Inkubation mit Fluorochromen nachweisen. Die EMMPRIN retroviral infizierten Megakaryozyten integrieren das EMMPRIN-*gfp*-Fusionsprotein in der Zellmembran.

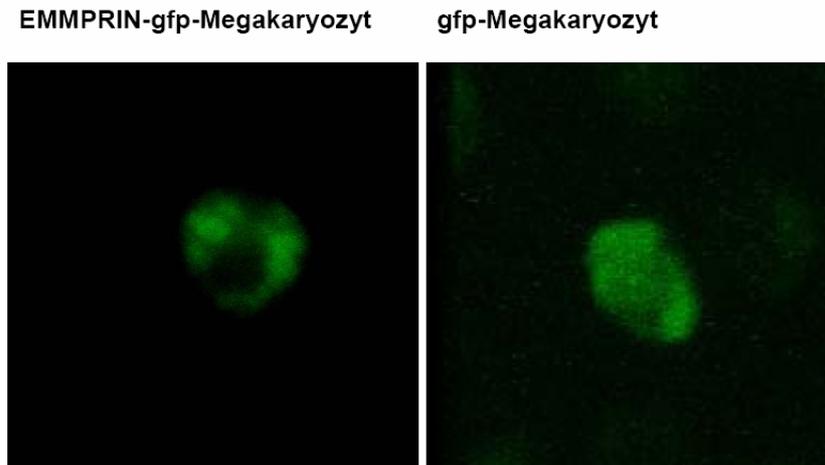


Abbildung 20 Lokalisation des *gfp* an der Zellmembran der murinen Megakaryozyten, Bestimmung in der konfokalen Laserscanmikroskopie: Murine Megakaryozyten infiziert mit EMMPRIN-*gfp*-Retrovirus oder dem *gfp*-Kontrollretrovirus werden nach Adhäsion an einen Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger mit Formalin fixiert. In der konfokalen Laserscanmikroskopie lässt sich die Lokalisation des Farbstoffes (*gfp*) ohne zusätzliche Anfärbung nachweisen. Es zeigt sich deutlich die Verteilung von EMMPRIN über die Zellmembran mit Ausparung der Strukturen im Zellinneren. Die *gfp*-Kontrollzellen weisen eher eine diffuse Verteilung des *gfp* auf.

ERGEBNISSE

5.4.2.3 Nachweis von vermehrtem EMMPRIN-Gehalt nach Infektion der Zellen in den Lysaten mittels Western-Analyse

Durch Lyse der retroviral transfizierten Megakaryozyten, sowie der *in vitro* generierten transfizierten Thrombozyten lässt sich das Fusionsprotein in den EMMPRIN-gfp transfizierten Zellen mittels Western-Analyse nachweisen. Sowohl die EMMPRIN-überexprimierenden Zellen als auch die Kontrollzellen zeigen einen geringen Gehalt an reinem EMMPRIN. Dies lässt darauf schließen, dass der Antikörper gegen humanes EMMPRIN auch teilweise murines EMMPRIN binden kann.

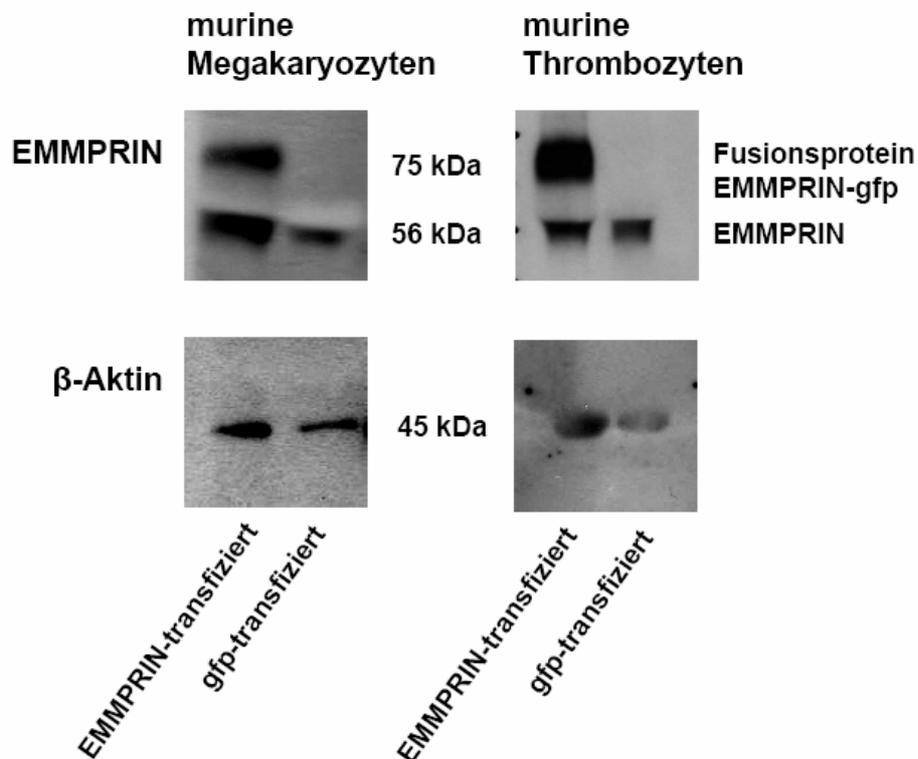


Abbildung 21 Western-Blot retroviral EMMPRIN-gfp und gfp infizierter murinen Megakaryozyten und der *in vitro* generierten Thrombozyten: Nachweis des Fusionsproteins (75 kDa) in Lysaten der EMMPRIN-gfp transfizierten murinen Megakaryozyten und Thrombozyten und ein geringer Gehalt an murinem EMMPRIN. Auch in gfp-Kontrollzellen lässt sich EMMPRIN aufgrund der Kreuzreaktivität des EMMPRIN-Antikörpers in kleiner Konzentration nachweisen.

ERGEBNISSE

5.4.3 Aufregulation der Aktivierungsmarker CD40L und CD62p nach Stimulation der rekombinanten Thrombozyten

Um die funktionelle Integrität der rekombinanten Thrombozyten zu untersuchen, wurden die transfizierten Thrombozyten zunächst mit ansteigender Konzentration von Kollagen stimuliert und die Zellaktivierung anhand der P-Selektin- und der CD40L-Oberflächenexpression gemessen.

Durchflusszytometrische Messungen ergaben eine dosisabhängige Aufregulation des CD40-Ligand und des P-Selektins nach Stimulation der Thrombozyten mit Kollagen.

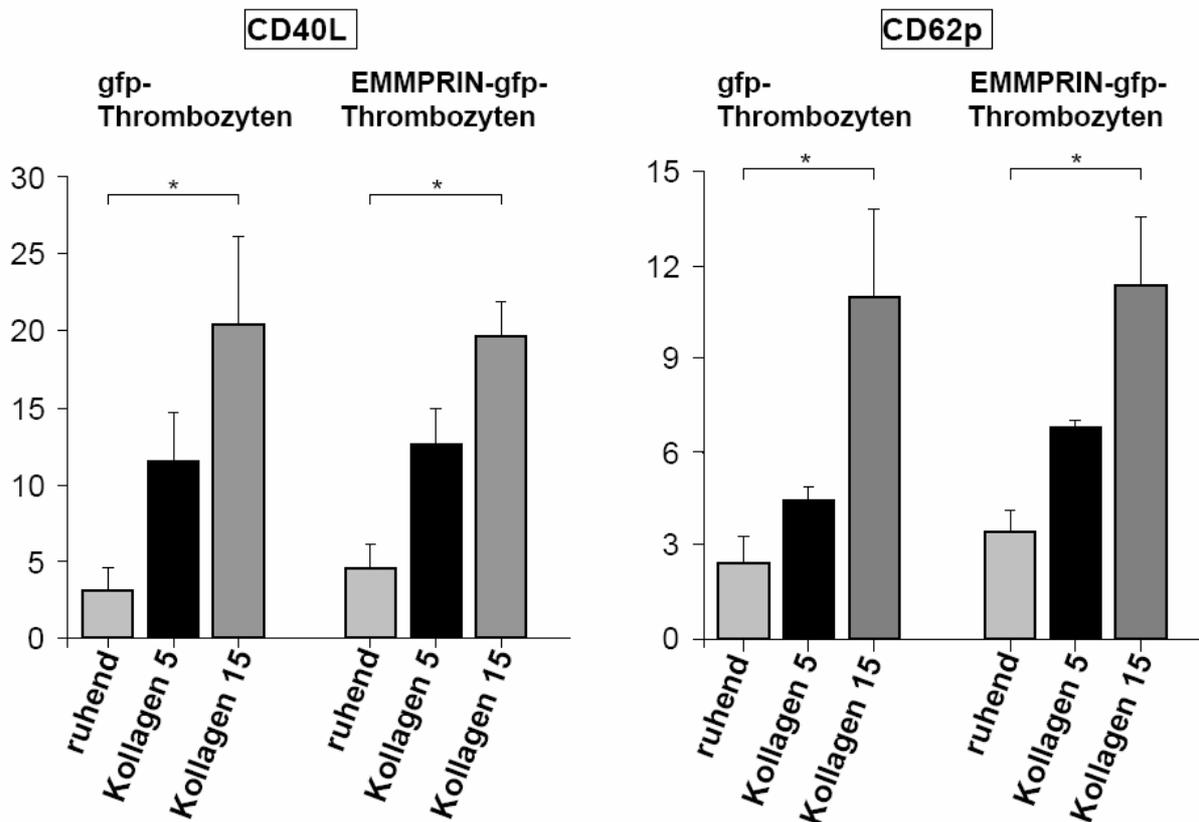


Abbildung 22 Durchflusszytometrischer Nachweis der Aktivierbarkeit *in vitro* generierter Mausplättchen: Nach Stimulation der Zellen mit Kollagen in zwei Konzentrationen zeigt sich eine deutliche Aufregulation der Aktivierungsmarker CD40L und CD62p auf den Thrombozyten. (n=3, *p<0,05) (Kollagen 5, 15 µg/ml)

5.4.4 Vermehrte MMP-9 Aktivität nach Kokultivierung humaner Monozyten mit EMMPRIN-überexprimierenden Thrombozyten

Für die Koinkubation wurden rekombinante murine Thrombozyten verwendet, die EMMPRIN überexprimieren. Kontrollen bilden gfp-Thrombozyten sowie allein kultivierte Monozyten. Die Aktivität der MMP-9 steigt nach 24 und 48 stündiger Koinkubation deutlich an im Vergleich zu den Zellkulturüberständen der Koinkubation mit gfp-Kontrollthrombozyten und den Monozyten in Monokultur.

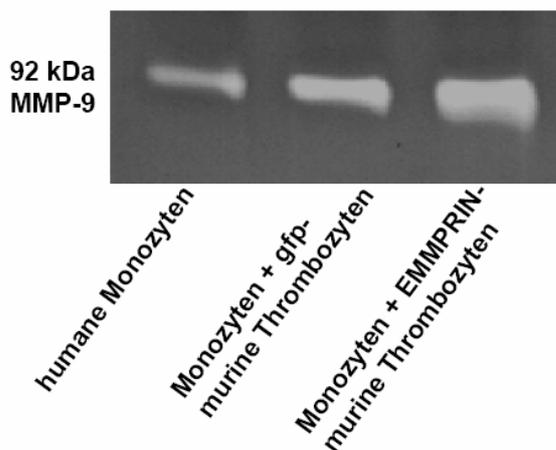


Abbildung 23 EMMPRIN auf Thrombozyten induziert die MMP-9 Aktivität in Monozyten: rekombinante, EMMPRIN-überexprimierende Thrombozyten (10^4) und rekombinante, gfp-exprimierende Thrombozyten (10^4) als Negativkontrolle wurden für 24 Stunden mit isolierten humanen Monozyten (10^4) koinkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände gewonnen und die MMP-9 Aktivität in der SDS-PAGE-Zymographie bestimmt.

5.5 ***Adhäsion der Monozyten an rekombinantes EMMPRIN-Fc, Inkubation mit einem NF- κ B-Inhibitor***

Vorarbeiten zeigen, dass es im Rahmen zellulärer Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Monozyten zu einer gegenseitigen Aktivierung kommen kann.

Wir konnten in Koinkubationsversuchen von Monozyten mit Thrombozyten nachweisen, dass es EMMPRIN-vermittelt zu einer IL-6 Sekretion kommt (Abbildung 17). IL-6 wird in Monozyten durch den Transkriptionsfaktors NF- κ B induziert (de Winther, 2005). Daher untersuchten wir, in wieweit eine EMMPRIN-EMMPRIN-Wechselwirkung zur Aktivierung von IL-6 über NF- κ B führt. Zunächst wurde die IL-6-Sekretion von Monozyten in Stimulationsversuchen mit rekombinantem EMMPRIN-Fc und Fc als Negativkontrolle gemessen. Ein Teil der Zellen wurde mit einem NF- κ B-Inhibitor vorbehandelt.

5.5.1 EMMPRIN-Regulation des IL-6 über NF- κ B

Eine Stimulation der Monozyten mit rekombinantem EMMPRIN-Fc führt zu einer vermehrten Sekretion von IL-6 in den Zellkulturüberstand. Die Bindung an das reine Fc-Fragment löst keine Stimulation der Zellen aus. Die gleichzeitige Inkubation der Monozyten mit einem IKK-Inhibitor während der Adhäsion an das EMMPRIN-Fc blockiert die EMMPRIN-vermittelte IL-6-Sekretion. Dies lässt darauf schließen, dass die EMMPRIN-induzierte Aufregulation des proinflammatorischen Signals IL-6 über den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt wird.

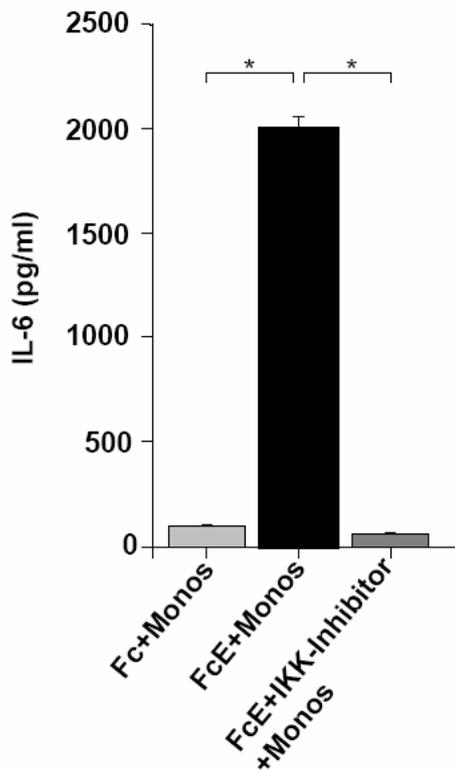


Abbildung 24 EMMPRIN-vermittelte Aufregulation des IL-6 der Monozyten: Die Inkubation der Monozyten mit EMMPRIN-Fc zeigt eine deutlich vermehrte IL-6-Sekretion im Vergleich zu der Inkubation mit der Negativkontrolle, dem Fc-Fragment. Nach Inhibition des I κ B-Kinase-Komplexes ist die EMMPRIN-vermittelte IL-6-Sekretion nahezu blockiert. (ELISA, n=3, *p<0,05) (Fc: Fc-Fragment, FcE: EMMPRIN-Fc, Monos: Monozyten)

5.5.2 Bildung der monozytären MMP-9 über NF- κ B

Die neu identifizierte EMMPRIN-vermittelte NF- κ B-Aktivierung veranlasste uns zu untersuchen, inwieweit die EMMPRIN-vermittelte MMP-Aktivierung ebenfalls auf einer NF- κ B-Aktivierung beruht.

Dazu adhärirten Monozyten für 24 std an EMMPRIN-Fc und Fc als Negativkontrolle mit und ohne IKK-Inhibitor. Die anschließend gewonnenen Zellkulturüberstände zeigten eine deutliche EMMPRIN-vermittelte Zunahme der MMP-9-Aktivität. Durch Inhibition von NF- κ B wurde die MMP-9-Aktivierung wieder aufgehoben. Dies zeigt, dass eine EMMPRIN abhängige MMP-Induktion über eine Aktivierung von NF- κ B vermittelt wird. Als Positivkontrolle wurden die Monozyten mit dem bakteriellen Lipopolysaccharid (LPS), einem bekannten NF- κ B Aktivator stimuliert.

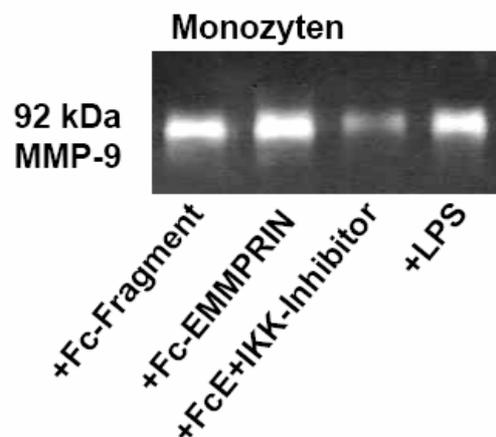


Abbildung 25 EMMPRIN vermittelt eine MMP-9-Induktion durch NF- κ B Aktivierung: Die Adhäsion der Monozyten an rekombinantes EMMPRIN-Fc stimuliert die MMP-9-Aktivität vergleichbar mit einer LPS-Stimulation. Die Inhibition von NF- κ B durch die Vorinkubation der Monozyten mit dem IKK-Inhibitor hebt die EMMPRIN-vermittelte MMP-9-Aktivierung wieder auf.

ERGEBNISSE

5.5.3 EMMPRIN-vermittelte Induktion des NF- κ B über den klassischen Aktivierungsweg

Die zuvor dargestellten Ergebnisse zeigen eine EMMPRIN-induzierte NF- κ B-Aktivierung mit vermehrter IL-6-Sekretion und einer verstärkten MMP-9-Aktivierung. Der NF- κ B-Komplex wird klassisch durch die Phosphorylierung des I κ B α aktiviert. Die Phosphorylierung des I κ B α führt zur Abspaltung des gebundenen NF- κ B, der schließlich in den Zellkern wandert und die Gentranskription aktiviert. Um zu untersuchen, ob NF- κ B über den klassischen oder den alternativen Weg aktiviert wird, führten wir Western-Blot-Untersuchungen gegen die nicht phosphorylierte Form von I κ B α durch.

Abbildung 19 zeigt die Abnahme des nicht phosphorylierten I κ B α nach Stimulation der Monozyten mit EMMPRIN-Fc. Als Positivkontrolle wurde bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) eingesetzt, das einen etablierten NF- κ B-Aktivator über den klassischen Weg darstellt.

Als Kontrolle für den eingesetzten Gesamtproteingehalt der jeweiligen Zellpopulation wurde das Strukturprotein β -Aktin nachgewiesen.

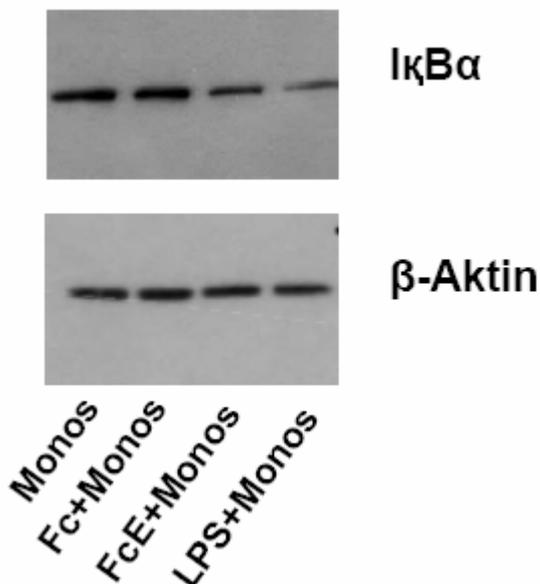


Abbildung 26 Western-Analyse des I κ B α in EMMPRIN-Fc-gebundenen Monozyten:

Durch die Adhäsion der Monozyten an rekombinantes EMMPRIN-Fc kommt es zur EMMPRIN-vermittelten Stimulation der Zellen. Bei Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B wird das I κ B α phosphoryliert und das native I κ B α nimmt entsprechend ab. Die Western-Analyse zeigt deutlich eine Abnahme des nicht phosphorylierten I κ B α nach Stimulation der Monozyten mit EMMPRIN. Als Positivkontrolle wurde LPS eingesetzt. Das reine Fc-Fragment nimmt keinen Einfluss auf die Phosphorylierung des I κ B α . (Monos: Monozyten, FcE: EMMPRIN-Fc)

6 DISKUSSION

Die Wechselwirkung von Thrombozyten sowohl mit Endothelzellen als auch mit Monozyten im Rahmen einer Gefäßläsion verstärkt einerseits die Rekrutierung von Monozyten in die entstehende Plaque bei der Arteriosklerose, andererseits fördert es die weitere Endothelaktivierung.

Essentiell sind die Thrombozyten an der Thrombusbildung nach der Ruptur der arteriosklerotischen Plaque beteiligt: im Rahmen der Proteolyse-vermittelten Ruptur der Plaque kommt es zur Freilegung von Thrombozyten-aktivierenden Faktoren, welche die weitere Thrombusbildung initiieren.

Für die Plaqueentstehung ist der Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix von großer Bedeutung. Er wird durch verschiedene von kardiovaskulären Zellen exprimierte und sezernierte Proteasen vermittelt. Hierbei kommt den Matrix Metalloproteinasen eine zentrale Rolle zu. Der Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) induziert über eine homophile Wechselwirkung eine vermehrte MMP-Aktivität in benachbarten Zellen. Eigene Vorarbeiten konnten nachweisen, dass EMMPRIN zum Zeitpunkt des akuten Myokardinfarktes vermehrt auf Monozyten exprimiert wird und die proteolytische Aktivität in glatten Muskelzellen induzieren kann (Schmidt, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine aktivierungsabhängige Expression von EMMPRIN auf Thrombozyten nachgewiesen. Eine Stimulation der ruhenden Thrombozyten mit Thrombin, Kollagen oder ADP führt zu einer vermehrten Oberflächenexpression von EMMPRIN. Ultrastrukturelle Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie ergaben, dass EMMPRIN im offenen kanalikulären System der Thrombozyten gespeichert und nach Aktivierung durch die Pseudopodienausbildung vermehrt an die Oberfläche gebracht wird. Ähnliche Aktivierungsmechanismen sind für weitere Oberflächenproteine der Thrombozyten, wie dem GPIIb/IIIa-Rezeptor beschrieben worden (Gawaz, 2001).

Zusätzlich führt eine Bindung von thrombozytärem EMMPRIN an EMMPRIN-Liganden auf benachbarten Thrombozyten zu einer fortgesetzten Thrombozytenaktivierung mit konsekutiv vermehrter Oberflächenexpression von P-Selektin und CD40L. Somit könnte durch Bindung von EMMPRIN an seinen thrombozytären Rezeptor ein Circulus vitiosus ausgelöst werden, bei dem zunächst

DISKUSSION

durch eine Thrombozytenaktivierung vermehrt EMMPRIN an der Zelloberfläche exprimiert wird und dies wiederum EMMPRIN-vermittelt weiter Thrombozyten aktiviert.

Erste Versuche weisen darauf hin, dass möglicherweise Thrombozyten EMMPRIN neu synthetisieren können. Um diese Frage abschließend zu klären, laufen derzeit Versuche mit dem Translationshemmer Puromycin.

In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnte die Aufregulation der MMP-9-Aktivität durch Koinkubation von Monozyten mit Kollagen-stimulierten Thrombozyten gezeigt werden (Galt, 2001). Weitere Untersuchungen belegten eine vermehrte Monozyten-Thrombozyten-Aggregation während eines akuten Myokardinfarktes (Michelson, 2001).

Dabei kommt es jedoch nicht zu einer Interaktion zwischen dem nach Aktivierung ausgeschütteten P-Selektin der Plättchen und dem entsprechenden Liganden PSGL-1 auf Monozyten. Da bei diesen Versuchen ein rascher Verlust des degranulierten Oberflächen-P-Selektins festgestellt wurde, bleibt die Frage nach alternativen Mechanismen für zelluläre Interaktionen zwischen Monozyten und Blutplättchen (Lindemann, 2005).

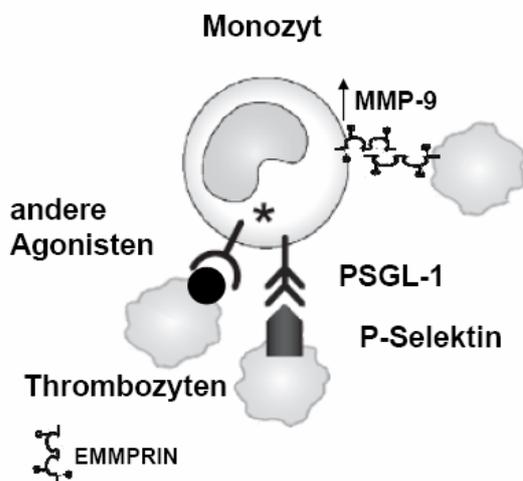


Abbildung 27 Zelluläre Interaktion zwischen Monozyten und Thrombozyten: An der Wechselwirkung sind neben dem monozytären PSGL-1 und dem thrombozytären P-Selektin weitere Agonisten beteiligt (Lindemann, 2005). Die EMMPRIN-EMMPRIIN-Wechselwirkung führt zu einer vermehrten MMP-9-Aktivität.

In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig die Relevanz von EMMPRIN an der zellulären Interaktion der Monozyten mit Thrombozyten gezeigt werden. Die vermehrte Aktivität des MMP-9 durch Koinkubation von EMMPRIN-überexprimierenden Thrombozyten mit Monozyten ließ sich durch die spezifische Inhibition der EMMPRIN-Synthese mittels siRNA-Technologie blockieren. Hemmt

DISKUSSION

man die Interaktion von monozytärem EMMPRIN mit dem EMMPRIN auf Thrombozyten wird dadurch die Aktivität der Matrix Metalloproteinase-9 deutlich herabgesetzt.

Die Wechselwirkungen von EMMPRIN umfassen nicht nur die induzierte Erhöhung der MMP-Aktivität sondern bewirken auch eine gesteigerte Freisetzung des proinflammatorischen Signals Interleukin-6. Die Inkubation von Monozyten mit Thrombozyten steigert signifikant die Sekretion des monozytären IL-6 im Vergleich zu Monokulturen der Monozyten. Auch hier lässt sich die Wirkung mittels Hemmung der EMMPRIN-Synthese in den Monozyten durch siRNA-Vorbehandlung stoppen; dies zeigt damit eindeutig die Relevanz von EMMPRIN bei der Induktion von IL-6.

Die interzellulären Aktivierungswege nach einer EMMPRIN Wechselwirkung sind bisher nur unzureichend beschrieben. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten die Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an der vermehrten Synthese des IL-6 (Gawaz, 2002).

Wir konnten durch Adhäsion der Monozyten an rekombinantes EMMPRIN-Fc eine Aufregulation der IL-6-Sekretion zeigen, die sich durch zusätzliche Inkubation mit einem IKK-Inhibitor (I κ B-Kinase-Komplex) wieder auf den Basalwert herunterregulieren lässt. Das I κ B α ist im Zytoplasma gebunden an NF- κ B. Durch Phosphorylierung des I κ B α wird die Bindung gelöst und der Transkriptionsfaktor kann in den Zellkern gelangen, dort reguliert er die Transkription der Zielgene (Gawaz, 2002). In unseren Western-Analysen konnten wir die Abnahme des nativen I κ B α durch Stimulierung der Monozyten zeigen, und damit die stimulierende Wirkung von EMMPRIN auf die Zellen und die Induktion proteolytischer und proinflammatorischer Gene durch NF- κ B. Wir konnten somit erstmals nachweisen, dass eine EMMPRIN-Wechselwirkung zu einer Aktivierung von NF- κ B über den klassischen Weg führt. Auch die EMMPRIN-abhängige Aktivierung der MMP-9 ist vermittelt über NF- κ B, wie wir in unsere Untersuchungen zeigen konnten.

Der Nachweis von EMMPRIN auf Thrombozyten erfolgte mit Methoden, die in unserer Arbeitsgruppe gut etabliert sind. Die Durchführung der Zellkultur und der Koinkubationen mit Anwendung der siRNA-Technologie oder dem Einsatz des rekombinanten EMMPRIN-Fc wird seit Jahren routinemäßig eingesetzt (Schmidt, 2006).

Die Isolierung der CD34 positiven Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen sowie die retrovirale Infektion der Megakaryozyten wurde bereits in anderen

DISKUSSION

Arbeitsgruppen etabliert und im Rahmen dieser Dissertation in unsere Arbeitsgruppe transferiert (Gillitzer, 2005, Ungerer, 2004).

Die Infektion der Stammzellen mit einem Retrovirus zur Überexpression von humanem EMMPRIN auf murinen Thrombozyten wurde erstmalig durchgeführt. Rekombinante Plättchen unterscheiden sich in ihrer Funktionalität deutlich von frisch isolierten oder nicht transfizierten Thrombozyten. Um die Stimulierbarkeit der rekombinanten Thrombozyten zu untersuchen, wurde die Aufregulation der Aktivierungsmarker CD40L und CD62p in der Durchflusszytometrie gemessen. Dabei ließ sich eine Aktivierbarkeit der Zellen nachweisen, die absoluten Werte der Aufregulation lagen aber unterhalb der bekannten Werte für nicht transfizierte Zellen. Dennoch konnte grundsätzlich eine Funktionalität der rekombinanten, vermehrt EMMPRIN-exprimierenden Thrombozyten nachgewiesen werden.

Durch die Verwendung der rekombinanten Thrombozyten bei Koinkubationsversuchen konnte erstmals die kausale Rolle von thrombozytärem EMMPRIN für die MMP-Induktion in Monozyten belegt werden. Um die Rolle von EMMPRIN bei der Plaqueprogression *in vivo* zu klären, sollen die rekombinanten Thrombozyten zukünftig über einen Zeitraum von zwölf Wochen wiederholt in ApoE-Knockout-Mäuse injiziert werden und anschließend histologisch das Ausmaß der Arteriosklerose bestimmt werden. Für die Durchführung ist jedoch eine hohe Anzahl an rekombinanten Plättchen nötig.

In der vorliegenden Arbeit wurde der „Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer“ (EMMPRIN) erstmals auf Thrombozyten beschrieben und seine mögliche Beteiligung an zellulären Interaktionen der Plättchen untereinander, aber auch in Wechselwirkung mit anderen Zellen, wie Monozyten oder Endothelzellen belegt.

Die genaue Kenntnis über die Proteolyseregulation während der Arteriosklerose könnte ein neuer therapeutischer Angriffspunkt sein, der den Proteinabbau hemmt und somit die Plaque stabilisiert. Als möglicher Angriffspunkt therapeutischer Mittel ist die unterschiedliche Lokalisation von EMMPRIN von entscheidendem Vorteil. Hierdurch ist es möglich, eine Wirkung nur bei aktivierten Thrombozyten zu erzielen, da ruhende Thrombozyten den Rezeptor im Wesentlichen im Zellinneren tragen. Dies würde weiterhin eine Aufrechterhaltung der lebensnotwendigen Funktionen der Plättchen für die Hämostase ermöglichen trotz Inhibition von EMMPRIN.

EMMPRIN könnte daher einen guten pharmakologischen Angriffspunkt darstellen für die Senkung der proteolytischen Aktivität bei kardiovaskulären Erkrankungen.

DISKUSSION

Zusätzlich kommt es EMMPRIN-vermittelt zu einer Aktivierung von NF- κ B und konsekutiv zu einer vermehrten Sekretion von IL-6. Somit könnte durch eine Inhibition von EMMPRIN über die Hemmung der proteolytischen Aktivität hinaus auch das Ausmaß der Entzündung innerhalb der arteriosklerotischen Plaque moduliert werden.

Schließlich könnte die Detektion von EMMPRIN und MMPs in veränderten Gefäßen mittels markierter Antikörper ein zukünftiges Diagnoseverfahren für rupturgefährdete Plaques darstellen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Der „Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer“ EMMPRIN ist bisher im Wesentlichen bekannt aus der Tumorpathologie; er induziert in umliegenden Fibroblasten eine Aktivierung der Matrix Metalloproteinasen (MMPs).

Die Beteiligung von EMMPRIN am arteriosklerotischen Geschehen konnte in früheren Untersuchungen durch den Nachweis der EMMPRIN-Expression in verschiedenen kardiovaskulären Zellen wie Monozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen in der arteriosklerotischen Plaque erbracht werden.

Diese Arbeit beschreibt erstmals das Vorkommen von EMMPRIN auf Thrombozyten. Der Rezeptor wird im offenen kanalikulären System von ruhenden Thrombozyten gespeichert und aktivierungsabhängig an der Zelloberfläche exprimiert.

Für die Untersuchungen zur funktionellen Relevanz von EMMPRIN auf den Thrombozyten und für weiterführende *in vivo*-Versuche beschreibt die vorliegende Arbeit die Generierung muriner Thrombozyten, welche mittels retroviralem Gentransfers eine Überexpression von EMMPRIN an der Zelloberfläche aufweisen. Die siRNA-Technologie wurde eingesetzt, um die EMMPRIN-Synthese der koinkubierten Monozyten zu hemmen.

Eine funktionelle Relevanz von EMMPRIN bei zellulären Interaktionen konnte nachgewiesen werden. So führt die Wechselwirkung der Thrombozyten untereinander EMMPRIN-vermittelt zu einer Aktivierung der Zellen mit weiterer Expression von Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin und CD40L. Die Interaktion der Thrombozyten mit Monozyten führt EMMPRIN-vermittelt zu einer vermehrten Aktivität der monozytären MMP-9.

Bei der Wechselwirkung zwischen Thrombozyten und Monozyten aktiviert EMMPRIN außerdem den Transkriptionsfaktor NF- κ B über den klassischen Weg und induziert dadurch eine vermehrte Sekretion des proinflammatorischen Interleukin 6.

EMMPRIN könnte somit ein neuer therapeutischer Angriffspunkt sein für die Identifikation rupturgefährdeter Plaques. Deren Progression könnte durch eine pharmakologische Hemmung von EMMPRIN möglicherweise reduziert werden.

8 SUMMARY

Characterization of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN/CD147) on platelets and investigation of the functional relevance in arteriosclerosis

The expression of “Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer” (EMMPRIN) was first shown on the surface of tumor cells. EMMPRIN is elevated in tumor cells and stimulates production of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in adjacent fibroblasts.

Recent studies demonstrated the expression of EMMPRIN in cardiovascular cells such as monocytes, endothelial cells and smooth muscle cells within the arteriosclerotic plaque. Therefore it is suggested to play a role in the development of arteriosclerosis.

This study characterized EMMPRIN expression on platelets for the first time. The receptor is stored in the open canalicular system of resting platelets and is transferred to the cell surface after platelet stimulation.

To study the functional relevance of EMMPRIN on platelets and for the use in following *in vivo* experiments recombinant EMMPRIN overexpressing platelets from retroviral transfected megakaryocytes were generated. The siRNA technology was used to inhibit the EMMPRIN synthesis in monocytes coincubated with platelets.

We showed the functional relevance of EMMPRIN in cellular interactions. EMMPRIN induces the activation of platelets as shown by enhanced expression of adhesion molecules such as P-selectin and CD40L during interaction between platelets. Coincubation of platelets with monocytes leads to an increased activity of monocytic MMP-9 induced by EMMPRIN.

The interaction of EMMPRIN in platelets and monocytes activates the classical transcription factor NF- κ B pathway and hence induces an increased secretion of proinflammatory Interleukin 6.

Thus, EMMPRIN may become a new therapeutical target to identify vulnerable plaques. The inhibition of EMMPRIN by new drugs may possibly retard plaque progression.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Badimon JJ, Meyer B, Feigen LP, Baron DA, Chesebro JH, Fuster V, Badimon L.** Thrombosis triggered by severe arterial lesions is inhibited by oral administration of a glycoprotein IIb/IIIa antagonist. *Eur J Clin Invest.* (1997);27:568-74.
- Benbow U, Schoenermark MP, Mitchell TI, Rutter JL, Shimokawa K, Nagase H, Brinckerhoff CE.** A novel host/tumor cell interaction activates matrix metalloproteinase 1 and mediates invasion through type I collagen. *J Biol Chem.* (1999);274:25371-8.
- Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, Reidy MA.** Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res.* (1994);75:539-45.
- Berger G, Hartwell DW, Wagner DD.** P-Selectin and platelet clearance. *Blood.* (1998);92:4446-52.
- Birkedal-Hansen H.** Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol.* (1995);7:728-35.
- Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, Nabeshima K.** The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res.* (1995);55:434-9.
- Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM.** 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), alpha5beta1 integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med.* (1998);187:329-39.
- Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H.** Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* (2000);1477:267-83.
- Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Loushin C, Isner JM.** Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation.* (1995);91:2125-31.
- Caudroy S, Polette M, Tournier JM, Burlet H, Toole B, Zucker S, Birembaut P.** Expression of the extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and

LITERATURVERZEICHNIS

- the matrix metalloproteinase-2 in bronchopulmonary and breast lesions. *J Histochem Cytochem.* (1999);47:1575-80.
- Davidson B, Goldberg I, Berner A, Kristensen GB, Reich R.** EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) is a novel marker of poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Clin Exp Metastasis.* (2003);20:161-9.
- Davies MJ, Thomas A.** Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med.* (1984);310:1137-40.
- de Winther MP, Kanters E, Kraal G, Hofker MH.** Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2005);25:904-14.
- DeCastro R, Zhang Y, Guo H, Kataoka H, Gordon MK, Toole B, Biswas G.** Human keratinocytes express EMMPRIN, an extracellular matrix metalloproteinase inducer. *J Invest Dermatol.* (1996);106:1260-5.
- Dollery CM, McEwan JR, Henney AM.** Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res.* (1995);77:863-8.
- Ellis SM, Nabeshima K, Biswas C.** Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor. *Cancer Res.* (1989);49:3385-91.
- Evangelista V, Manarini S, Sideri R, Rotondo S, Martelli N, Piccoli A, Totani L, Piccardoni P, Vestweber D, de Gaetano G, Cerletti C.** Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood.* (1999);93:876-85.
- Fadool JM, Linser PJ.** 5A11 antigen is a cell recognition molecule which is involved in neuronal-glia interactions in avian neural retina. *Dev Dyn.* (1993);196:252-62.
- Fisher C, Gilbertson-Beadling S, Powers EA, Petzold G, Poorman R, Mitchell MA.** Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. *Dev Biol.* (1994);162:499-510.
- Fossum S, Mallett S, Barclay AN.** The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence. *Eur J Immunol.* (1991);21:671-9.
- Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD.** Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1995);92:7450-4.

LITERATURVERZEICHNIS

- Gabison EE, Hoang-Xuan T, Mauviel A, Menashi S.** EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie.* (2005);87:361-8.
- Galis ZS, Khatri JJ.** Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* (2002);90:251-62.
- Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E, Libby P.** Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res.* (1994);75:181-9.
- Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R, Clark S, Libby P.** Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1995);92:402-6.
- Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P.** Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* (1994);94:2493-503.
- Galt SW, Lindemann S, Medd D, Allen LL, Kraiss LW, Harris ES, Prescott SM, McIntyre TM, Weyrich AS, Zimmerman GA.** Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 by monocytes adherent to collagen and platelets. *Circ Res.* (2001);89:509-16.
- Gawaz M.** Blood platelets - physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles, and therapy for atherothrombotic diseases. *Thieme. New York;* (2001).
- Gawaz M.** Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res.* (2004);61:498-511.
- Gawaz M, Langer H, May AE.** Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* (2005);115:3378-84.
- Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, Schomig A.** Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation.* (1997);96:1809-18.
- Gawaz M, Page S, Massberg S, Nothdurfter C, Weber M, Fisher C, Ungerer M, Brand K.** Transient platelet interaction induces MCP-1 production by endothelial cells via I kappa B kinase complex activation. *Thromb Haemost.* (2002);88:307-14.

- Gawaz MP, Loftus JC, Bajt ML, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH.** Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest.* (1991);88:1128-34.
- Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL, et al.** Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature.* (1994);370:555-7.
- Gillitzer A, Peluso M, Laugwitz KL, Munch G, Massberg S, Konrad I, Gawaz M, Ungerer M.** Retroviral infection and selection of culture-derived platelets allows study of the effect of transgenes on platelet physiology ex vivo and on thrombus formation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2005);25:1750-5.
- Gough PJ, Gomez IG, Wille PT, Raines EW.** Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest.* (2006);116:59-69.
- Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biswas C.** Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* (1997);272:24-7.
- Hanemaaijer R, Koolwijk P, le Clercq L, de Vree WJ, van Hinsbergh VW.** Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J.* (1993);296 (Pt 3):803-9.
- Haug C, Lenz C, Diaz F, Bachem MG.** Oxidized low-density lipoproteins stimulate extracellular matrix metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) release by coronary smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2004);24:1823-9.
- Hawiger J.** Mechanisms involved in platelet vessel wall interaction. *Thromb Haemost.* (1995);74:369-72.
- Heller R.** Platelets and their factors. *Springer Verlag. Berlin;* (1997).
- Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA.** CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* (1998);391:591-4.
- Holt JC, Niewiarowski S.** Biochemistry of alpha granule proteins. *Semin Hematol.* (1985);22:151-63.

- Huang Y, Mironova M, Lopes-Virella MF.** Oxidized LDL stimulates matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (1999);19:2640-7.
- Igakura T, Kadomatsu K, Kaname T, Muramatsu H, Fan QW, Miyauchi T, Toyama Y, Kuno N, Yuasa S, Takahashi M, Senda T, Taguchi O, Yamamura K, Arimura K, Muramatsu T.** A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis. *Dev Biol.* (1998);194:152-65.
- Johnson RC, Mayadas TN, Frenette PS, Mebius RE, Subramaniam M, Lacasce A, Hynes RO, Wagner DD.** Blood cell dynamics in P-selectin-deficient mice. *Blood.* (1995);86:1106-14.
- Kanekura T, Chen X, Kanzaki T.** Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int J Cancer.* (2002);99:520-8.
- Kasinrerk W, Fiebiger E, Stefanova I, Baumruker T, Knapp W, Stockinger H.** 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.* (1992);149:847-54.
- Kataoka H, DeCastro R, Zucker S, Biswas C.** Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Res.* (1993);53:3154-8.
- Laszik Z, Jansen PJ, Cummings RD, Tedder TF, McEver RP, Moore KL.** P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood.* (1996);88:3010-21.
- Li Z, Li L, Zielke HR, Cheng L, Xiao R, Crow MT, Stetler-Stevenson WG, Froehlich J, Lakatta EG.** Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* (1996);148:121-8.
- Libby P.** Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med.* (2000);247:349-58.
- Lim M, Martinez T, Jablons D, Cameron R, Guo H, Toole B, Li JD, Basbaum C.** Tumor-derived EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates collagenase transcription through MAPK p38. *FEBS Lett.* (1998);441:88-92.

- Lindemann SW, Weyrich AS, Zimmerman GA.** Signaling to translational control pathways: diversity in gene regulation in inflammatory and vascular cells. *Trends Cardiovasc Med.* (2005);15:9-17.
- Luttun A, Lutgens E, Manderveld A, Maris K, Collen D, Carmeliet P, Moons L.** Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. *Circulation.* (2004);109:1408-14.
- Major TC, Liang L, Lu X, Rosebury W, Bocan TM.** Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is induced upon monocyte differentiation and is expressed in human atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2002);22:1200-7.
- Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K.** Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood.* (1998);92:507-15.
- May AE, Kalsch T, Massberg S, Herouy Y, Schmidt R, Gawaz M.** Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha(IIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation.* (2002);106:2111-7.
- May AE, Kanse SM, Lund LR, Gisler RH, Imhof BA, Preissner KT.** Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via beta 2 integrins in vivo. *J Exp Med.* (1998);188:1029-37.
- May AE, Schmidt R, Kanse SM, Chavakis T, Stephens RW, Schomig A, Preissner KT, Neumann FJ.** Urokinase receptor surface expression regulates monocyte adhesion in acute myocardial infarction. *Blood.* (2002);100:3611-7.
- Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI.** Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation.* (2001);104:1533-7.
- Miyauchi T, Kanekura T, Yamaoka A, Ozawa M, Miyazawa S, Muramatsu T.** 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 (Tokyo).* (1990);107:316-23.

- Miyauchi T, Masuzawa Y, Muramatsu T.** The basigin group of the immunoglobulin superfamily: complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen. *J Biochem (Tokyo)*. (1991);110:770-4.
- Mühlhardt C.** Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. *Spektrum Verlag*: 4. Auflage; (2003).
- Muraoka K, Nabeshima K, Murayama T, Biswas C, Koono M.** Enhanced expression of a tumor-cell-derived collagenase-stimulatory factor in urothelial carcinoma: its usefulness as a tumor marker for bladder cancers. *Int J Cancer*. (1993);55:19-26.
- Murata K, Motayama T, Kotake C.** Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis*. (1986);60:251-62.
- Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W.** Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. (1997);100:2680-90.
- Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meinl C, May A, Schomig A.** Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation*. (1997);95:2387-94.
- Nieswandt B, Watson SP.** Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. (2003);102:449-61.
- Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE, Clowes AW.** Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation*. (1995);92:1393-8.
- Noguchi Y, Sato T, Hirata M, Hara T, Ohama K, Ito A.** Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human endometrium during the menstrual cycle in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. (2003);88:6063-72.
- Plow EF, Byzova T.** The biology of glycoprotein IIb-IIIa. *Coron Artery Dis*. (1999);10:547-51.
- Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein RL, Hajjar DP, Cohen PA, Frazier WA, Hoff HF, Hazen SL.** Macrophage scavenger receptor CD36 is

LITERATURVERZEICHNIS

the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest.* (2000);105:1095-108.

Polette M, Gilles C, Marchand V, Lorenzato M, Toole B, Tournier JM, Zucker S, Birembaut P. Tumor collagenase stimulatory factor (TCSF) expression and localization in human lung and breast cancers. *J Histochem Cytochem.* (1997);45:703-9.

Rajavashisth TB, Xu XP, Jovinge S, Meisel S, Xu XO, Chai NN, Fishbein MC, Kaul S, Cercek B, Sharifi B, Shah PK. Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation.* (1999);99:3103-9.

Rao Y, Wu XF, Gariepy J, Rutishauser U, Siu CH. Identification of a peptide sequence involved in homophilic binding in the neural cell adhesion molecule NCAM. *J Cell Biol.* (1992);118:937-49.

Rao Y, Zhao X, Siu CH. Mechanism of homophilic binding mediated by the neural cell adhesion molecule NCAM. Evidence for isologous interaction. *J Biol Chem.* (1994);269:27540-8.

Romanic AM, Madri JA. The induction of 72-kD gelatinase in T cells upon adhesion to endothelial cells is VCAM-1 dependent. *J Cell Biol.* (1994);125:1165-78.

Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC, Lopez JA. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med.* (1999);190:803-14.

Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke.* (1998);29:2189-95.

Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* (1999);340:115-26.

Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* (1973);180:1332-9.

Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* (2002);8:1227-34.

Sameshima T, Nabeshima K, Toole BP, Yokogami K, Okada Y, Goya T, Kono M, Wakisaka S. Expression of emmprin (CD147), a cell surface inducer of matrix metalloproteinases, in normal human brain and gliomas. *Int J Cancer.* (2000);88:21-7.

- Santoso S, Sachs UJ, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, Chavakis T.** The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med.* (2002);196:679-91.
- Schlosshauer B, Herzog KH.** Neurothelin: an inducible cell surface glycoprotein of blood-brain barrier-specific endothelial cells and distinct neurons. *J Cell Biol.* (1990);110:1261-74.
- Schmidt R, Bultmann A, Ungerer M, Joghetaei N, Bulbul O, Thieme S, Chavakis T, Toole BP, Gawaz M, Schomig A, May AE.** Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction. *Circulation.* (2006);113:834-41.
- Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, Libby P.** Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res.* (1997);81:448-54.
- Schonbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P.** Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2000);97:7458-63.
- Schuster VL, Lu R, Kanai N, Bao Y, Rosenberg S, Prie D, Ronco P, Jennings ML.** Cloning of the rabbit homologue of mouse 'basigin' and rat 'OX-47': kidney cell type-specific expression, and regulation in collecting duct cells. *Biochim Biophys Acta.* (1996);1311:13-9.
- Seulberger H, Unger CM, Risau W.** HT7, Neurothelin, Basigin, gp42 and OX-47--many names for one developmentally regulated immuno-globulin-like surface glycoprotein on blood-brain barrier endothelium, epithelial tissue barriers and neurons. *Neurosci Lett.* (1992);140:93-7.
- Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G, Fallon JT, Regnstrom J, Fuster V.** Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation.* (1995);92:1565-9.
- Shi Y, Ouyang P, Sugrue SP.** Characterization of the gene encoding pinin/DRS/memA and evidence for its potential tumor suppressor function. *Oncogene.* (2000);19:289-97.

- Sidhu SS, Mengistab AT, Tauscher AN, LaVail J, Basbaum C.** The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions. *Oncogene*. (2004);23:956-63.
- Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J, McIntire LV, Ballantyne CM, Zhang L, Furman MI, Berndt MC, Lopez JA.** Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med*. (2000);192:193-204.
- Slupsky JR, Kalbas M, Willuweit A, Henn V, Kroczeck RA, Muller-Berghaus G.** Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb Haemost*. (1998);80:1008-14.
- Springer TA.** Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. (1994);76:301-14.
- Staffler G, Stockinger H.** Cd147. *J Biol Regul Homeost Agents*. (2000);14:327-30.
- Strydom CS, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW.** A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (1995);15:1512-31.
- Strydom CS, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW.** A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. (1994);89:2462-78.
- Stevens RL, Colombo M, Gonzales JJ, Hollander W, Schmid K.** The glycosaminoglycans of the human artery and their changes in atherosclerosis. *J Clin Invest*. (1976);58:470-81.
- Stevenson M.** Therapeutic potential of RNA interference. *N Engl J Med*. (2004);351:1772-7.
- Subramaniam M, Frenette PS, Saffaripour S, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD.** Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice. *Blood*. (1996);87:1238-42.
- Sun J, Hemler ME.** Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res*. (2001);61:2276-81.

LITERATURVERZEICHNIS

- Tang W, Chang SB, Hemler ME.** Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. *Mol Biol Cell.* (2004);15:4043-50.
- Tang W, Hemler ME.** Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering. *J Biol Chem.* (2004);279:11112-8.
- Taylor PM, Woodfield RJ, Hodgkin MN, Pettitt TR, Martin A, Kerr DJ, Wakelam MJ.** Breast cancer cell-derived EMMPRIN stimulates fibroblast MMP2 release through a phospholipase A(2) and 5-lipoxygenase catalyzed pathway. *Oncogene.* (2002);21:5765-72.
- Toole BP.** Emmprin (CD147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function. *Curr Top Dev Biol.* (2003);54:371-89.
- Ungerer M, Peluso M, Gillitzer A, Massberg S, Heinzmann U, Schulz C, Munch G, Gawaz M.** Generation of functional culture-derived platelets from CD34+ progenitor cells to study transgenes in the platelet environment. *Circ Res.* (2004);95:e36-44.
- Xu XP, Meisel SR, Ong JM, Kaul S, Cercek B, Rajavashisth TB, Sharifi B, Shah PK.** Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation.* (1999);99:993-8.
- Yang J, Furie BC, Furie B.** The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost.* (1999);81:1-7.
- Yoshida S, Shibata M, Yamamoto S, Hagihara M, Asai N, Takahashi M, Mizutani S, Muramatsu T, Kadomatsu K.** Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its N-terminal immunoglobulin domain. *Eur J Biochem.* (2000);267:4372-80.
- Yurchenko V, Zybarth G, O'Connor M, Dai WW, Franchin G, Hao T, Guo H, Hung HC, Toole B, Gallay P, Sherry B, Bukrinsky M.** Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J Biol Chem.* (2002);277:22959-65.

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Darstellung der verschiedenen Matrix Metalloproteinasen	14
Tabelle 2: verwendete Primer.....	30
Tabelle 3: small interfering RNAs	31
Tabelle 4: Assays-on-Demand (TaqMan Primer)	31

11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: aktivierter Thrombozyt.....	4
Abbildung 2: Adhäsion der Thrombozyten an das Endothel.....	6
Abbildung 3: Adhärente Thrombozyten aktivieren Endothelzellen	8
Abbildung 4: Adhärente Thrombozyten rekrutieren und aktivieren Monozyten	10
Abbildung 5: Abbau extrazellulärer Matrix durch Proteasen.....	12
Abbildung 6: Zelluläre Interaktionen in der arteriosklerotischen Plaque.....	13
Abbildung 7: Darstellung der Entstehung der Arteriosklerose	15
Abbildung 8: Schematische Darstellung des EMMPRIN	17
Abbildung 9: Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion.....	42
Abbildung 10: Nachweis von EMMPRIN auf Thrombozyten und Regulation von EMMPRIN auf Thrombozyten durch Stimulation mit Thrombin	56
Abbildung 11: Nachweis von EMMPRIN in/auf Thrombozyten mittels konfokaler Laserscanmikroskopie	58
Abbildung 12: EMMPRIN-Nachweis in/auf Thrombozyten mittels Gold-Markierung (Elektronenmikroskopie).....	59
Abbildung 13: Nachweis von EMMPRIN-mRNA der Thrombozyten und Megakaryozyten	60
Abbildung 14: Nachweis von EMMPRIN-Protein in Thrombozyten mittels Western-Blot.....	61
Abbildung 15: Aufregulierung von P-Selektin und CD40L auf Thrombozyten nach Inkubation mit rekombinantes EMMPRIN-Fc	62
Abbildung 16: Erhöhte MMP-9-Aktivität nach Koinkubation von Monozyten mit Thrombozyten.....	63
Abbildung 17: Aufregulation des IL-6 durch Koinkubation von Monozyten mit Thrombozyten.....	64
Abbildung 18: Kontrolle des EMMPRIN-gfp-Retrovirus	65
Abbildung 19: Nachweis von humanem EMMPRIN auf rekombinanten murinen Megakaryozyten	66
Abbildung 20: Lokalisation des gfp an der Zellmembran der murinen Megakaryozyten Bestimmung in der konfokale Laserscanmikroskopie.....	67

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 21: Western-Blot retroviral EMMPRIN-gfp und gfp infizierter murinen Megakaryozyten und der in vitro generierten Thrombozyten.....	68
Abbildung 22: Durchflusszytometrischer Nachweis der Aktivierbarkeit in vitro generierter Mausplättchen	69
Abbildung 23: EMMPRIN auf Thrombozyten induziert die MMP-9 Aktivität in Monozyten	70
Abbildung 24: EMMPRIN-vermittelte Aufregulation des IL-6 der Monozyten.....	71
Abbildung 25: EMMPRIN vermittelt eine MMP-9-Induktion durch NF- κ B Aktivierung	72
Abbildung 26: Hemmung des NF- κ B verringert die MMP-9-Bildung EMMPRIN-Fc aktivierter Monozyten.....	73
Abbildung 27: Zelluläre Interaktion zwischen Monozyten und Thrombozyten	75

12 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
%	Prozent
ACD	Acid-Citrate-Dextrose
ad	lateinisch: zu, auf etwas hin
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovines Serumalbumin</i>)
Ca ²⁺	Calcium
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CO ₂	Kohlendioxid
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DNA	Desoxyribunukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBM	Wachstumsmedium für Endothelzellen
EC	Endothelzelle (<i>endothelcell</i>)
ECM	extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked Immunosorbent Assay</i>
EMMPRIN	<i>Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer</i>
F(ab) ₂	Antikörperfragment
FACS	Fluoreszenz-aktiviertes Zellsortierungssystem (<i>fluorescence activated cell sorting system</i>)
Fc	konstanter Abschnitt eines Antikörpers
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein Isothiocyanate

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

FSC	Forwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
gfp	grün-fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
gg	gegen
GP	Glykoprotein
HCl	Salzsäure
HEK	humane Nierenzellen (<i>human embryonic kidney</i>)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
hTZ	humane Thrombozyten
HUVEC	humane Endothelzellen aus der Nabelschnur (<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>)
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül (<i>intercellular adhesion molecules</i>)
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Media
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Ligand
l	Liter
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (<i>low density lipoprotein</i>)
LiCl	Lithiumchlorid
LiDS	Lithium-Dodecyl-Sulfat
MAC-1	Makrophagenantigen-1 (<i>macrophage antigen-1</i>)
mAk	monoklonaler Antikörper
MCP-1	Protein für die Chemotaxis von Monozyten (<i>monocyte chemotactic protein-1</i>)
M-CSF	Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor (<i>macrophage-colony stimulation factor</i>)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MEM	Minimum Essential Medium, Eagle
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix Metalloproteinasen
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
mTZ	murine Thrombozyten
MT-MMP	membranständige MMPs (<i>membrane type-MMPs</i>)
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	Transkriptionsfaktor (<i>Nuclear Factor-κB</i>)
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
Oligo-dT	Oligodesoxythymidin
OT	Objektträger
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzsäure (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	Wachstumsfaktor von Thrombozyten abstammend (<i>platelet derived growth factor</i>)
PE	Phycoerythrin
pH	Kraft des Wasserstoffes (<i>potentia Hydrogenii</i>)
PIC	Phenylisocyanat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRP	Plättchenreiche Phase (<i>platelet rich plasma</i>)
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand 1
RIPA	Lysepuffer für Thrombozyten
RISC	RNA-induzierter hemmender Komplex (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
RNA	Ribonucleinsäure

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

RNAi	<i>RNA interference</i>
R-PE	R-Phycoerythrin
rpm	Umdrehungen/min (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkription
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
SDS	Natrium- Dodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMC	glatte Muskelzelle (<i>smooth muscle cell</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
std	Stunde
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzsäure (<i>Tris buffered saline</i>)
TdT	terminale Desoxynukleotidtransferase
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor-β</i>)
TIMP	Inhibitoren der MMPs des Gewebes (<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>)
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TPO	Thrombopoetin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TZ	Thrombozyten
U	Einheiten (<i>Units</i>)
uPAR	Urokinase Plasminogen-aktivierender Rezeptor (<i>urokinase plasminogen activator receptor</i>)
V	Volt
VCAM-1	Adhäsionsmolekül für vaskuläre Zellen (<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>)
VLE	sehr geringer Gehalt an Endotoxin (<i>very low endotoxin</i>)
vWF	von Willebrand Faktor
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

13 DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Schmahl aus dem Institut für Tierpathologie der Tiermedizinischen Fakultät an der Ludwig-Maximilians-Universität für die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schömig, dem ärztlichen Leiter des Deutschen Herzzentrum München für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Doktorarbeit in der dortigen Forschungseinrichtung.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Roland Schmidt bedanken, für die Ermöglichung der Arbeit, die unermüdlichen Hilfestellungen, konstruktiven Kritiken und aufbauenden Worte immer genau zum richtigen Zeitpunkt. Ohne ihn hätte ich das Projekt „Promotion“ für fast unmöglich gehalten und die zweifelsfrei schönen Seiten der Forschung nie kennen gelernt.

Für die zusätzliche Betreuung meiner Dissertation von Seiten der Tiermedizin danke ich Frau Dr. Julia Henke, sie konnte sämtliche Unklarheiten auch im Rahmen des Doktorandenseminars stets beseitigen.

Ein großes Dankeschön gilt allen Mitarbeitern unseres Kooperationspartners, der Firma Trigen in Martinsried unter der Leitung von Herrn PD Dr. Götz Münch. Alle Beteiligten haben mich sehr freundlich als Gastarbeiterin aufgenommen und sind mir nicht enden wollend mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Es mangelte nie an guten Ideen, wertvoller Kritik oder einfach nur den richtigen Worten zur Motivation. Vielen Dank an alle, die mir ihre Zeit geschenkt haben zur Bereitstellung und „Weiterverarbeitung“ der Zellen.

Dieser Dank gilt auch der Belegschaft der GSF um Herrn Prof. Dr. Walch im Bezug auf die Hilfe im Bereich der Mikroskopie.

Ein riesengroßer Dank an alle Kolleg(inn)en der Experimentellen Kardiologie. Ganz besonders Monika Hölderle, die mir alles im Labor beigebracht hat und bis zum

DANKSAGUNG

Schluss unermüdlich fröhlich und freundlich geblieben ist. Ohne die allgemein gute Zusammenarbeit in unserer Arbeitsgruppe wäre vieles nicht möglich gewesen oder hätte nicht so gut geklappt. Aber auch den Mitgliedern der anderen Arbeitsgruppen gilt mein Dank für ein ständig offenes Ohr, motivierende Hilfestellungen und die nicht zu unterschätzende gute Atmosphäre im Labor und auch außerhalb.

Zum Schluss bedanke ich mich bei all den Freunden, die alle Hochs und Tiefs überstanden haben (Katja) und unermüdlich zugehört haben (Jane), die für Ablenkung gesorgt haben (die Mädels) und zur gleichen Zeit die gleichen Erfahrungen gesammelt haben (Karina und Liese).

Der größte Dank gebührt meiner Familie und besonders meinen Eltern, die immer hinter mir stehen, immer zu mir halten und mir all das hier ermöglicht haben.

Ich muss zugeben, es ist schön zu sehen, wenn jemand stolz auf einen ist, so hat man das Gefühl, etwas zurückgeben zu können.

