

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

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. med. Dr. med. habil. F. Sinowatz

Angefertigt in der
Medizinischen Universitätsklinik der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Department für Innere Medizin
Abteilung Innere Medizin III Kardiologie und Kreislaufkrankungen

**Therapeutische Inhibition von CD147 und Cyclophilin A bei der
Neointimabildung nach Denudation der A. carotis communis der Maus**

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

von Maria Pfeifer

aus Schwedt

München, 2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

Für Johanna

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Schrifttum	3
<i>2.1. Atherosklerose</i>	<i>3</i>
2.1.1. Ursachen der Atherosklerose.....	3
2.1.2. Pathogenese der Atherosklerose.....	6
<i>2.2. Die ApoE^{-/-}-Maus als Modelltier für die Atheroskleroseforschung</i>	<i>10</i>
2.2.1. Apolipoprotein E (ApoE).....	10
2.2.2. Die ApoE ^{-/-} -Maus.....	11
<i>2.3. Matrixmetalloproteinasen (MMPs)</i>	<i>14</i>
2.3.1. Einteilung.....	14
2.3.2. Aufbau.....	17
2.3.3. Regulierung.....	19
2.3.4. Funktionen.....	22
<i>2.4. Plaqueruptur</i>	<i>23</i>
2.4.1. Aufbau einer Plaque.....	25
2.4.2. Bedeutung der MMPs bei der Plaqueruptur.....	26
<i>2.5. Restenose</i>	<i>28</i>
2.5.1. Phasen der Neointimabildung.....	31
2.5.2. Bedeutung der MMPs bei der Restenose.....	34
2.5.3. Verletzungsmodelle zur Untersuchung der Restenose.....	35
<i>2.6. Das Immunglobulin CD147 (Syn: EMMPRIN, Basigin)</i>	<i>38</i>
2.6.1. Allgemeines.....	38
2.6.2. Aufbau.....	39
2.6.3. Funktionen.....	42
<i>2.7. Liganden von CD147</i>	<i>46</i>

<u>2.8. Cyclophilin A</u>	48
2.8.1. Allgemeines.....	48
2.8.2. Funktionen.....	49
3. Eigene Untersuchungen	52
<u>3.1. Zielsetzung</u>	52
<u>3.2. Materialien und Methoden</u>	54
3.2.1. Versuchsplan.....	54
3.2.2. NIM811.....	56
3.2.3. Der anti-CD147-Antikörper RL 73.2.....	59
3.2.4. Versuchstiere.....	60
3.2.5. Drahtdenudation der A. carotis communis.....	62
3.2.6. Aufarbeitung der Aa. carotides.....	73
3.2.7. Aufarbeitung der Herzen.....	78
3.2.8. Aufarbeitung der Aortenbögen.....	79
3.2.9. Immunhistochemie.....	81
3.2.10. Statistik.....	90
<u>3.3. Ergebnisse</u>	91
3.3.1. Verabreichung von NIM811 bzw. der Lösungsmittelkontrolle an C57BL/6J-Mäuse nach Drahtdenudation.....	92
3.3.2. Verabreichung von anti-CD147-Antikörper bzw. der Isotyp-Kontrolle an C57BL/6J-Mäuse nach Drahtdenudation.....	97
3.3.3. Verabreichung von anti-CD147-Antikörper bzw. der Isotyp-Kontrolle an ApoE ^{-/-} -Mäuse nach Drahtdenudation.....	101
3.3.4. Überlebensrate und aufgetretene Komplikationen nach Drahtdenudation der A. carotis communis.....	117
4. Diskussion	119
<u>4.1. Diskussion der Versuchsdurchführung</u>	119
4.1.1. Die Maus als Versuchstier in der Atheroskleroseforschung.....	119
4.1.2. Verletzungsmodelle.....	120
<u>4.2. Aufgetretene Probleme in der Versuchsdurchführung</u>	122
<u>4.3. Erwartungen</u>	123

<i>4.4. Diskussion der Ergebnisse</i>	<i>124</i>
4.4.1. Verabreichung von NIM811 an C57BL/6J-Mäuse.....	125
4.4.2. Verabreichung von anti-CD147-Antikörper an C57BL/6J-Mäuse.....	126
4.4.3. Verabreichung von anti-CD147-Antikörper an ApoE ^{-/-} -Mäuse.....	126
<i>4.5. Schlussfolgerungen</i>	<i>131</i>
5. Zusammenfassung	134
6. Summary	136
7. Auflistung der Einzelwerte	138
8. Literaturverzeichnis	146
9. Tabellenverzeichnis	176
10. Abbildungsverzeichnis	178
11. Abkürzungsverzeichnis	184
12. Danksagung	187

1. Einleitung

Die Herzkreislauferkrankungen sind ein zunehmendes Gesundheitsproblem der Industrieländer. Die Statistik der Todesursachen verdeutlicht die Notwendigkeit einer intensiven Forschung nach neuen Methoden zur Behandlung der atherosklerotischen Gefäßerkrankung. In den USA, Europa und Teilen Asiens stirbt fast jeder Zweite an deren Folgen (Statistisches Bundesamt; R Ross et al. 1995). Die Herzkreislauferkrankungen stellen nicht nur ein Gesundheitsrisiko dar, sie verursachen zudem enorme Kosten im Gesundheitssystem. Laut statistischem Bundesamt betragen im Jahr 2006 die Krankheitskostenrechnung insgesamt 236 Mrd. €. Von diesem Betrag fiel ein Kostenvolumen von 35,2 Mrd. € auf die Behandlung der Herzkreislauferkrankungen (Bundeszentrale für politische Bildung).

Die WHO definiert die Atherosklerose als eine “[...] Veränderung der Intima, bestehend aus herdförmiger Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlehydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienwand“ (DG Meurer et al. 2006). Umgangssprachlich wird oft von einer Arterienverkalkung gesprochen. Sie ist eine der häufigsten Erkrankung der Arterien und geht mit Verhärtung, Verdickung, Elastizitätsverlust und Lumeneinengung einher (Pscyrembel 2002). Mögliche Folgen sind Herzinfarkt, Schlaganfall und periphere Durchblutungsstörungen (R Ross et al. 1995).

Die zur Wiederherstellung einer ausreichenden Durchblutung durchgeführte Angioplastie führt häufig zu einem nicht dauerhaften Behandlungserfolg (M Ferrell et al. 1992). In den Koronargefäßen beträgt die Restenoserate sechs Monate nach einer Ballondilatation 30-40%. Unbeschichtete Stents führen bei 20-30% der Patienten zur Restenose (DL Fischman et al. 1994; PW Serruys et al. 1994). Die Entwicklung von medikamentenfreisetzenden Stents hat die Angioplastie revolutioniert. Nun ist es möglich, Therapeutika, die eine Restenose verhindern sollen, direkt am Wirkungsort zu platzieren. Studien konnten belegen, dass Sirolimus-freisetzende Stents und Paclitaxel-freisetzende Stents klinisch und angiographisch, im Vergleich zu den unbeschichteten Stents, zu einer geringeren Restenose führen. Die Restenoserate Paclitaxel-freisetzender Stents beträgt, im Vergleich zu 25% bei den unbeschichteten Stents, nach neun Monaten 5-10% (GW Stone et al. 2004). Trotz dieses enormen Fortschrittes weisen auch diese Stents noch Defizite auf, die eine weitere Forschung

nach möglichen neuen Wirkstoffen notwendig macht, um die Langzeitprognose der Patienten zu verbessern. Studien ergaben, dass die Reendothelisierung bei den medikamentenfreisetzenden Stents geringer ist als bei den unbeschichteten Stents. Dies führt zu einem erhöhten Thromboserisiko. In Langzeitstudien wurde nachgewiesen, dass die Phase der Neointimabildung bei medikamentenfreisetzenden Stents im Vergleich zu unbeschichteten Stents wesentlich länger anhält (T Inoue et al. 2009; JE Sousa et al. 2003; JW Moses et al. 2003; C Spaulding et al. 2007; AT Ong et al. 2005; GW Stone et al. 2004).

Es gibt bereits Vorarbeiten, die darauf hinweisen, dass CD147 und CyPA an der Pathophysiologie der Restenose involviert sind. Der Zelloberflächenrezeptor CD147 ist ein Bindungspartner von Cyclophilin A (CyPA) (J Sun et al. 2001; V Yurchenko et al. 2002). Die CD147 induzierte Bildung und Sekretion der MMPs (S Caudroy et al. 2002; V Yurchenko et al. 2006) begünstigt Plaqueruptur (ZS Galis et al. 2002) und Restenose (N Zempo et al. 1994; M Aoyagi et al. 1998). Die MMPs spalten die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix (ECM). Das wiederum erleichtert eine Migration der glatten Muskelzellen (SMC) aus der Media in die Intima der Arterienwand (N Zempo et al. 1994; M Aoyagi et al. 1998).

CyPA stimuliert die Proliferation und Migration von SMCs und unterstützt die Einwanderung von Entzündungszellen in die Intima (K Satoh et al. 2008). Als CyPA-Rezeptor ist CD147 an der CyPA-vermittelten Chemotaxis von Entzündungszellen beteiligt (V Yurchenko et al. 2002; Yurchenko et al. 2006). Untersuchungen haben gezeigt, dass inflammatorische Prozesse eine Restenose (P Golino et al. 1997; AM Miller et al. 2001) und eine Plaqueruptur fördern (YW Yoon et al. 2005, P Libby 2008).

Zielsetzung dieser Arbeit ist, durch eine antikörpervermittelte Blockade von CD147 und durch eine Verabreichung von NIM811, einem CyPA-Inhibitor, nach der Drahtdenudation der A. carotis communis der Maus, eine verminderte Neointimabildung zu bewirken. In dieser Studie sollen neue Kenntnisse über den Einfluss von CD147 und CyPA auf die Neointimabildung gewonnen werden.

2. Schrifttum

2.1. Atherosklerose

Aufbau einer Arterienwand

Das Kreislaufsystem setzt sich aus Herz und Blutgefäßen zusammen. Dabei dient das Herz als Drucksaugpumpe und hält den Blutfluss aufrecht. In den Arterien des Körperkreislaufes fließt das sauerstoffreiche Blut vom Herzen weg. Die Arterien gehen über in Arteriolen, Kapillaren und schließlich in Venolen. In den Venen fließt das sauerstoffarme Blut zum Herzen zurück. Im Lungenkreislauf sind die Sauerstoffverhältnisse entgegengesetzt zum Körperkreislauf. Die großen Gefäße haben einen typischen dreischichtigen Aufbau, bestehend aus der *Tunica intima*, *Tunica media* und der *Tunica adventitia*. Die *Tunica intima* setzt sich aus einer einschichtigen Endothelzellschicht und einer subendothelialen kollagenfaserreichen Bindegewebsschicht zusammen. Die auf einer Basalmembran aufliegenden Endothelzellen sind abgeflacht und haben eine sehr glatte Oberfläche. Die *Tunica media* enthält glatte Muskelzellen, kollagenes Bindegewebe und elastische Fasern. Es wird unterschieden zwischen herznahen Arterien vom elastischen Typ, die durch ihre zahlreichen elastischen Fasern mit Hilfe der „Windkesselfunktion“ für einen gleichmäßigen Blutfluss sorgen und Arterien vom muskulären Typ. Beim zuletzt genannten Arterientypus besteht die *Media* aus vielen spiralig angeordneten glatten Muskelzellen. Zwischen der *Tunica media* und der *Tunica interna* liegt die *Lamina elastica interna*. Kollagene Fasern bilden die äußere Gefäßschicht, die *Adventitia*. Sie enthält die *Vasa vasora*. Sie versorgen die Gefäßwand mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die *Lamina elastica externa* bildet die Grenze zwischen *Media* und *Adventitia* bei Arterien vom muskulären Typ (FV Salomon et al. 2005; Baumhoer 2003).

2.1.1. Ursachen der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung mit großer Bedeutung in der westlichen Gesellschaft. Sie verursacht 50% der Todesfälle (AJ Lusis 2000). Das wird auch in der Statistik der Todesursachen für die Bundesrepublik Deutschland ersichtlich. Im Jahr 2008 war die Erkrankung des Herzkreislaufsystems, wozu auch der Herzinfarkt gehört, mit einem Anteil von 42% die Todesursache Nummer eins, gefolgt von tumorösen Erkrankungen (Statistisches Bundesamt). Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung der großen Arterien (R Ross 1999). Als deren Folge tritt eine

Lumeneinengung auf, das bewirkt eine Minderdurchblutung der nachfolgenden Organe mit sauerstoffreichem Blut (R Ross 1995). Die Bildung von atherosklerotischen Plaques kann zu einer Behinderung des Blutflusses führen, aber häufiger treten Plaquerupturen mit anschließender Thrombusbildung auf und führen zu einem plötzlichen Gefäßverschluss (AJ Lusis 2000; W Insull 2009). Die klinischen Folgen sind Herzinfarkt, Schlaganfall oder Gangrän von peripheren Geweben mit deren Funktionsverlust (R Ross 1995).

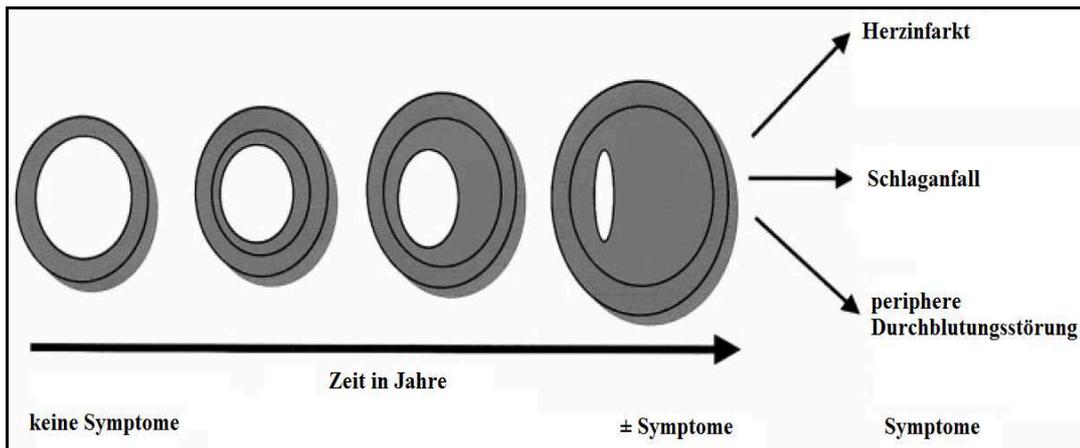


Abb.1: Folgen der Atherosklerose.
(modifiziert nach P Libby 2000)

Die Atherosklerose beginnt bereits im frühen Jugendalter und kann sich über einen Zeitraum von mehr als 50 Jahren hin entwickeln (W Insull 2009). Klinisch macht sich die Atherosklerose meist erst im mittleren bis hohen Alter bemerkbar (YM Hong 2010).

Die sogenannten Risikofaktoren führen zu einer Beeinträchtigung des Endothels und erhöhen das Risiko, an Atherosklerose zu erkranken (R Ross 1995). Dazu gehören ein erhöhter „low density lipoprotein“-Wert (LDL) im Blut, Rauchen, Hypertension, Diabetes mellitus, Vererbung, aber auch Infektionen mit Herpesviren und Chlamydia pneumoniae stehen im Verdacht. Der LDL-Wert wird als einer der wichtigsten Risikofaktoren angesehen (R Ross 1999). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass koronare Herzerkrankungen die Folge von ungesunder Lebensweise, Vererbung und einer hohen Lebenserwartung sind (AJ Lusis et al. 2000).

Bei der Entwicklung dieser Gefäßerkrankung kommt dem Endothel eine zentrale Bedeutung zu. Schon im Jahr 1856 beschrieb Virchow einen Zusammenhang zwischen endothelialer Degeneration und der Entwicklung von Atheromen (R

Virchow aus R Ross et al. 1973). Ross und Glomset entwickelten 1973 die „*response to injury*“-Hypothese. Sie erkannten, dass eine Schädigung des Endothels eine Entwicklung von atherosklerotischen Plaques nach sich zieht (R Ross 1973). Die „*response to injury*“-Hypothese wurde seitdem weiterentwickelt. Heute wird eher von einer endothelialen Dysfunktion gesprochen, einhergehend mit einer Veränderung der Permeabilität und der Adhäsionseigenschaften. Das hat wiederum eine vermehrte Transmigration von Entzündungszellen zur Folge (R Ross 1995). Nach der Schädigung des Endothels, zum Beispiel durch oxLDL, nimmt die Adhäsion von Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten an der Gefäßwand zu. Es folgt eine Migration der Entzündungszellen in das Subendothel. Durch Phagozytose differenzieren sich die Makrophagen zu fettreichen Schaumzellen. Die Ansammlung von T-Lymphozyten, Schaumzellen und glatten Muskelzellen wird als „*fatty streaks*“ bezeichnet (aus Ross et al. 1993).

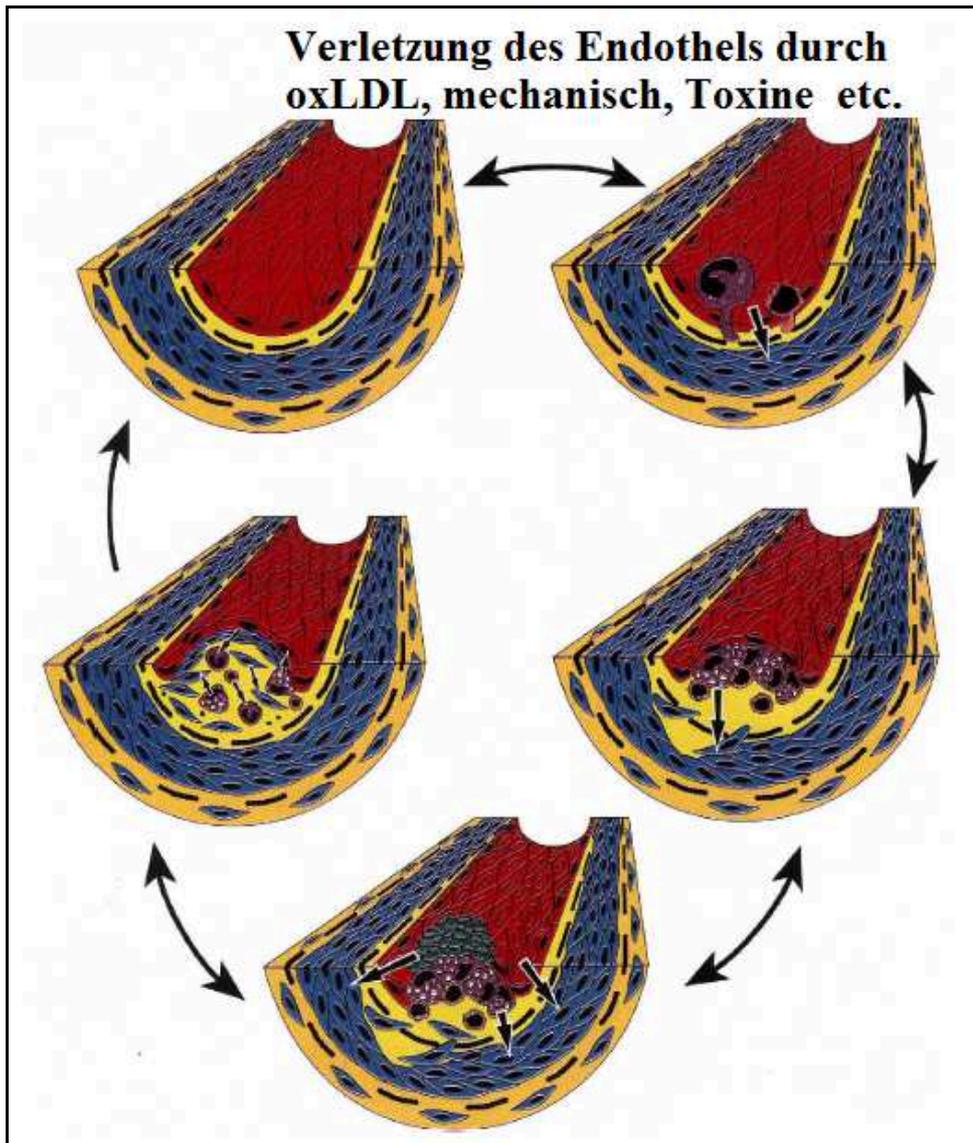


Abb.2: Schematische Darstellung der „response to injury“-Hypothese.

Eine Schädigung des Endothels führt zur Migration von Monozyten aus dem Blutstrom in die Intima. Die Monozyten phagozytieren Lipide und differenzieren zu Schaumzellen. Muskelzellen migrieren und proliferieren aus der Media in die Intima. Die Plaque engt immer mehr das Gefäßlumen ein.

(modifiziert nach R Ross et al. 1993)

2.1.2. Pathogenese der Atherosklerose

Bei der Entwicklung der Atherosklerose sind besonders die Monozyten/Makrophagen, T-Lymphozyten, Thrombozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen involviert (R Ross 1995).

Die Stadien der Gefäßerkrankung können in „fatty streak“, „fibrofatty lesion“ und „fibrous plaque“ unterteilt werden (R Ross 1995).

Die „*fatty streaks*“ setzen sich aus Monozyten und einigen T-Lymphozyten zusammen. In den Läsionen wurden CD⁴⁺- und CD⁸⁺T-Zellen gefunden. Monozyten migrieren in die Intima und phagozytieren Lipide. Sie differenzieren anschließend zu Makrophagen. Die fettgefüllten Zellen werden auch als Schaumzellen bezeichnet. Die Schaumzellen verleihen der Gefäßwand ein gelbliches Aussehen (R Ross 1995). Die Makrophagen proliferieren in der Intima und unterstützen die Entzündung durch die Abgabe von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, MMPs und Gewebefaktoren (P Libby et al. 2009). Die ersten Läsionen entwickeln sich an Stellen mit besonders starker hämodynamischer Belastung für das Endothel wie Kurven, Aufzweigungen und Bifurkationen (R Ross 1995). Diese ersten Veränderungen an der Arterienwand sind klinisch noch unauffällig (AJ Lusis 2000).

Die „*fibrofatty lesions*“ haben einen geschichteten Aufbau, bestehend aus Schaumzellen, Makrophagen, glatten Muskelzellen und Bindegewebe (R Ross 1995).

Aus den „*fibrofatty lesions*“ entwickeln sich mit Fortschreiten der Erkrankung „*fibrous plaques*“ (R Ross 1995), die durch eine zunehmende Einengung des Gefäßlumens zu einer Ischämie des zu versorgenden Gewebes führen können (W Insull 2009).

Die Strömungseigenschaft des Blutes beeinflusst die Anordnung und die Form der Endothelzellen. Verläuft der Blutstrom gleichmäßig konstant in einer Richtung, sind die Endothelzellen ellipsoid und in Richtung des Blutstromes ausgerichtet. An Stellen mit turbulenten Fließeigenschaften sind die Zellen polygonal geformt und haben keine einheitliche Anordnung. An diesen Lokalisationen ist die Permeabilität erhöht, deshalb treten dort die ersten Läsionen auf (AJ Lusis 2000). Bei einer Verletzung des Endothels kann der Defekt nur durch Teilung der Zellen aus dem Wundrand verschlossen werden. Durch eine sich wiederholende starke Beanspruchung des Endothels wird die Teilungsfähigkeit der Endothelzellen erschöpft, so dass ein effizienter Austausch nachlässt (R Ross 1995). Eine Schädigung des Endothels führt zu einer erleichterten Durchlässigkeit für Lipide und Entzündungszellen (M Schachter 1997). Monozyten bleiben am Endothel von atherosklerotischen Läsionen haften (P Libby 2003). Die Adhäsion der Leukozyten wird über endotheliale Oberflächenmoleküle wie Selektine und VCAM-1 vermittelt (P Libby 2000).

Auch Plättchen adhären und geben Zytokine und Wachstumsfaktoren ab. Das fördert die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen und Monozyten (R

Ross 1999). In gesunden Gefäßwänden sind glatte Muskelzellen nur in der mittleren Gefäßwandschicht, der Media, lokalisiert. In den atherosklerotischen Läsionen kommt es nun zur Proliferation der glatten Muskelzellen und deren Synthese von extrazellulärer Matrix (M Schachter 1997). Vermittelt durch eine Chemotaxis migrieren Leukozyten und glatte Muskelzellen in die Intima. „Colony stimulating factor“ (CSFs), „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1), „oxidative low density lipoprotein“ (oxLDL) und „transforming growth factor β “ (TGF- β) besitzen einen chemotaktischen Effekt auf Monozyten. „Platelet derived growth factor“ (PDGF) und „insulin-like growth factor 1“ (IGF-1) wirken chemotaktisch auf glatte Muskelzellen (R Ross 1993).

LDL diffundiert passiv durch das Endothel und sammelt sich in der subendothelialen Matrix an. Bei einem erhöhten Plasmaspiegel wird entsprechend vermehrt Fett abgelagert (AJ Lusis 2000). Untersuchungen ergaben, dass natives LDL keine Schaumzellbildung verursacht, weil es nicht schnell genug aufgenommen wird. Erst eine Modifikation der LDLs durch Oxidation, Lipolyse, Proteolyse und Aggregation fördert Entzündungsprozesse und die phagozytierenden Makrophagen differenzieren zu Schaumzellen (AJ Lusis 2000). Die Oxidation erfolgt durch reaktive Sauerstoffspezies, diese werden von Endothelzellen und Makrophagen gebildet. Aber auch Enzyme sind an diesem Prozess beteiligt. Dazu gehören Myeloperoxidase, Sphingomyelinase und die sekretorische Phospholipase (AJ Lusis 2000). Das in der Wand gebildete oxLDL wirkt zytotoxisch auf Endothelzellen, Makrophagen und glatte Muskelzellen (M Schachter 1997). Es löst eine Entzündungsreaktion im Endothel aus und damit dessen Aktivierung (W Insull 2009). OxLDL fördert die Bildung von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen. (P Libby 2000). Die Aufnahme von oxLDL wird von mehreren Rezeptoren vermittelt. Dazu gehören die „Scavenger“-Rezeptoren SR-A, CD36, CD68 (AJ Lusis 2000). Der M-CSF wird vom Endothel und glatten Muskelzellen gebildet (P Libby 2003). Dieser Mediator kann die Bildung von „Scavenger“-Rezeptoren und die Umwandlung von Monozyten in Makrophagen fördern (P Libby 2009). Einen wichtigen Schutz vor der Atherosklerose liefert „high density lipoprotein“ (HDL). Es ist der Gegenspieler vom LDL, entfernt überschüssiges Cholesterin aus dem Gewebe und hemmt die Oxidation von LDL (AJ Lusis 2000).

Thrombozyten sind am Pathomechanismus der Atheroskleroseentwicklung maßgeblich beteiligt. Die plättchenabhängige Thrombusbildung ist der Schlüsselmoment für den akuten Myokardinfarkt. Sie stellen ein Bindeglied zwischen der Pathogenese der Entzündung, Thrombusbildung und Atherogenese dar (M Gawaz et al. 2005). Die Plättchen adhären nicht an gesundem Endothel. Bei einer Beschädigung des Endothels kommt es zur Exposition von Proteinen der ECM, wie dem von Willebrand Faktor (vWF) und Kollagen. Das hat eine lose Anhaftung zwischen den Oberflächenrezeptoren GPIIb/IIIa und GPVI der Thrombozyten mit der ECM zur Folge. Die Thrombozytenaktivierung bewirkt ein „Aufklappen“ des Fibrinogen- und Kollagenrezeptors. Das stabilisiert die Bindung zwischen Thrombozyten und ECM. Die aktivierten Blutplättchen entleeren ihre Granula in den Extrazellularraum. Der Granulainhalt (z.B. Histamine, Serotonin, PDGF) wirkt unter anderem vasokonstriktorisch, mitogen und chemotaktisch auf Leukozyten und SMCs. Thrombozyten bilden anschließend über $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptoren Mikroaggregate. Die aktivierten Thrombozyten lösen eine Thrombinbildung aus. Im nächsten Schritt der Kaskade generiert Thrombin aus Fibrinogen Fibrin. Es entsteht ein stabiler Thrombus (M Gawaz et al. 2004). Für die Untersuchung des Einflusses der Thrombozyten auf die Atheroskleroseentwicklung inkubierten Daub et al. CD34⁺-Progenitorzellen mit Thrombozyten. Die Versuche ergaben, dass die Thrombozyten durch die Adhäsionsrezeptoren P-Selektin/PSGL-1 und die Integrine β_1 und β_2 die endothelialen CD34⁺-Progenitorzellen anziehen. Die Thrombozyten induzieren, je nach umgebendem Medium, eine Differenzierung der Progenitorzellen in reife Schaumzellen oder Endothelzellen. Die Schaumzellbildung ist ein Schlüsselmoment bei der Atheroskleroseentwicklung und wird durch oxLDL gefördert. Die Bindung mit oxLDL aktiviert die Thrombozyten. Diese LDL-gebundenen Thrombozyten werden von Makrophagen phagozytiert, die anschließend zu Schaumzellen differenzieren. Die an einer Endothelläsion adhären Thrombozyten tragen durch das „Homing“ von Progenitorzellen und deren Stimulation zur Schaumzellbildung der Plaquebildung bei (K Daub et al. 2007; K Daub et al. 2006).

2.2. Die ApoE^{-/-}-Maus als Modelltier für die Atheroskleroseforschung

2.2.1. Apolipoprotein E (ApoE)

Das ApoE ist ein Plasmaprotein mit einem Molekulargewicht von 34 kDa und wurde 1973 als ein Bestandteil des „very low density lipoprotein“ (VLDL) von Shore und Shore entdeckt. Seine Bildung erfolgt in den meisten Organen, wobei die Leber die Hauptquelle darstellt. Die Astrozyten des Gehirns produzieren den zweitgrößten Anteil. Die von den Blutmonozyten abgeleiteten humanen Makrophagen bilden ebenfalls eine große Menge (RW Mahley 1988). Der Mensch besitzt drei Isoformen: ApoE2, ApoE3 und ApoE4 (KE Kypreos et al. 2009; VI Zannis et al. 1980).

Das ApoE gehört zu den Lipoproteinen. Mit Hilfe der Lipoproteine werden die Fette im hydrophilen Blut gelöst, um transportfähig zu werden. Die zu transportierenden Fette bilden den lipophilen Kern, ummantelt von den hydrophilen Apoproteinen (F Horn et al. 2002).

Das ApoE ist ein Bestandteil der VLDLs, „high density lipoproteins“ (HDLs) und der intestinal gebildeten Chylomikronen. Als Ligand des LDL-Rezeptors besitzt das ApoE eine zentrale Stellung im Fettstoffwechsel. Die Bindung an den LDL-Rezeptor bewirkt die Aufnahme und den Abbau des ApoE-haltigen Lipoproteins durch die Zelle (RW Mahley 1988) und damit die Entfernung von atherogenen Lipoproteinen aus dem Blutkreislauf (KE Kypreos et al. 2009). Nach der Bindung an den LDL-Rezeptor erfolgt eine Endozytose des LDL-Rezeptorkomplexes. Im Anschluss an den Abbau des Komplexes in Lysosomen wandert der LDL-Rezeptor wieder zur Zelloberfläche (F Horn et al. 2002). Die endokrine Funktion vom ApoE ist die Umverteilung der Fette zwischen den Zellen verschiedener Organe. Die Neuverteilung der Fette zwischen den Zellen innerhalb eines Organs stellt deren parakrine Funktion dar. ApoE ist beteiligt an Transportvorgängen von Cholesterol und anderen Fetten vom Ort der Bildung bzw. Aufnahme zum Ort der Ausscheidung bzw. des Bedarfs (RW Mahley 1988) und sorgt für die Aufrechterhaltung der Homöostase der Blutfette (KE Kypreos et al. 2009). Die Typ III Hyperlipidämie ist eine Erbkrankheit des Menschen und verdeutlicht die Bedeutung von ApoE für den menschlichen Fettstoffwechsel. Sie beruht auf einer Mutation des ApoE kodierenden Gens. Durch eine Beeinträchtigung der LDL-rezeptorvermittelten Aufnahme des Cholesterols und anderer Fette durch die Zelle leiden die Betroffenen unter einem erhöhten Plasmacholesterin- (RW Mahley

1988) und Triglyceridgehalt. Es kommt zu einem Anstieg von VLDL, besonders dem β -VLDL, cholesterinreichen Chylomikronenresten (K Greenow et al. 2005) und „Intermediate density lipoprotein“ (IDLs) (EJ Schaefer et al. 1986) im Blut. Als Folge treten frühzeitig Xanthome und Herz-Kreislaufkrankungen auf (K Greenow et al. 2005). Homozygot betroffene Personen haben eine sehr niedrige ApoE-Syntheserate. Die heterozygoten Menschen weisen bei einer ApoE-Syntheserate von 42% einen normalen Plasmalipidgehalt auf (EJ Schaefer et al. 1986).

Die antiatherogene Wirkung von ApoE wurde in zahlreichen Tierstudien bestätigt (S Bellosta et al. 1995; H Shimano et al. 1995; C Desurmont et al. 2000; AH Hasty et al. 1999; H Shimano et al. 1992; FE Thorngate et al. 2000; K Tsukamoto et al. 1999). Die antiatherogene Wirkung von ApoE zeigt sich auch unabhängig von der Regulation des Fettstoffwechsels, zum Beispiel durch Hemmung der Plättchenaggregation und der Endothelzellproliferation. Es reduziert ebenfalls die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen. Außerdem stimuliert es die Bildung von endotheliale NO und hemmt die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten (K Greenow et al. 2005).

Das ApoE ist nicht nur am Fettstoffwechsel beteiligt. Es beeinflusst Heilungsprozesse des Nervensystems, Zellwachstum, Zelldifferenzierung und die Regulation des Immunsystems (RW Mahley 1988).

2.2.2. Die ApoE^{-/-}-Maus

In der Atheroskleroseforschung wurden bis 1992 für die meisten Tierversuche überwiegend größere Tiere, wie Kaninchen, nichtmenschliche Primaten und Schweine verwendet. Die Forschung nutzte die Maus nur ungern, weil sie vom Lipidprofil des Menschen erheblich abweicht (J Jawiń et al. 2004) und die Wildtypmaus spontan keine Atherosklerose bildet. Als einziges Mausmodell für die Atheroskleroseforschung stand für lange Zeit die C57BL/6-Maus zur Verfügung, welche bei einer cholesterin- und fettreichen Fütterung über einen längeren Zeitraum atherosklerotische Läsionen entwickelt. Problematisch an diesen Versuchen war, dass viele Mäuse an der Diät starben und sich die Läsionen nicht zuverlässig ausbildeten (J Jawiń et al. 2004).

1992 wurde die Atheroskleroseforschung revolutioniert. Zwei Forschungslabore entwickelten unabhängig voneinander die ApoE^{-/-}-Maus als neues Modelltier (AS

Plump et al. 1992; JA Piedrahita et al. 1992). Sie inaktivierten das ApoE-Gen durch „Gentargeting“ in embryonalen Stammzellen (JA Piedrahita et al. 1992). Bei Mensch und Maus stellt das ApoE-Gen eines der wichtigsten Gene für die Regulation des Plasmalipidlevels dar. Aus diesem Grund eignet sich die ApoE^{-/-}-Maus als Modelltier in der humanen Atheroskleroseforschung (MH Hofker et al. 1998).

Die Zahl der Tierversuche hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Einen Großteil nimmt davon die Maus ein (G Emilien et al. 2000). Die ApoE^{-/-}-Maus ist wohl das bekannteste (KS Meir et al. 2004) und am meisten verwendete (CA Readon et al. 2001) Mausmodell in der Atheroskleroseforschung. Im Gegensatz zu dem diätinduzierten Mausmodell entwickelt die Knock-out-Maus (KO-Maus) auch bei normaler Fütterung spontan atherosklerotische Läsionen, mit denen die komplexen Läsionen des Menschen simuliert werden können (KS Meir et al. 2004; CA Readon 2001).

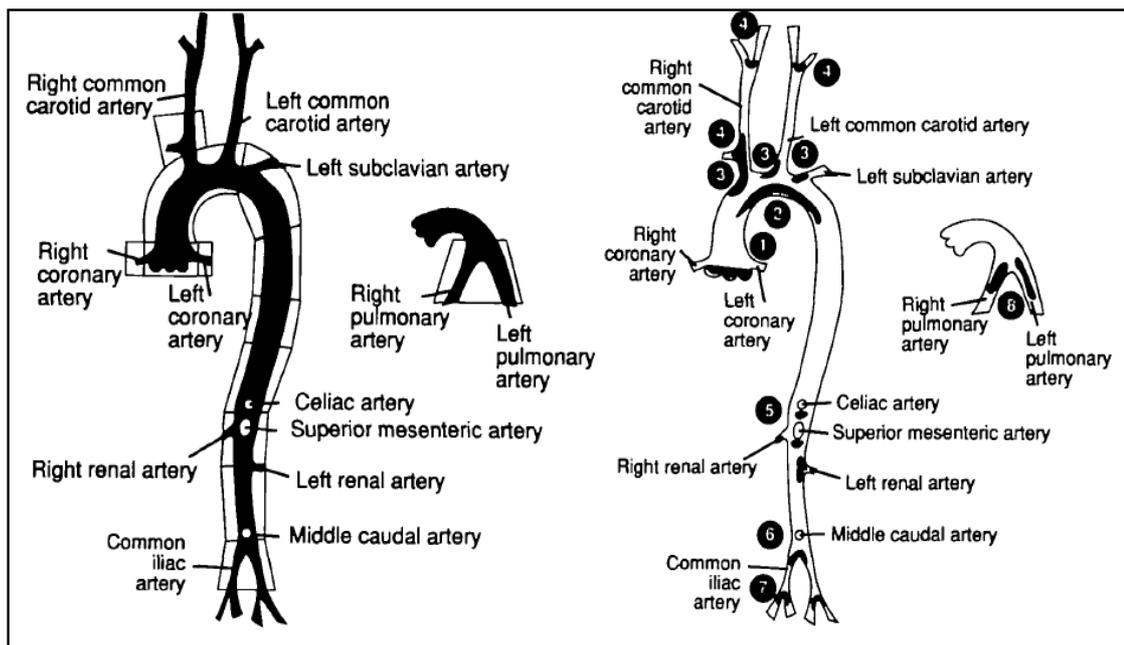


Abb.3: Gefäßsystem der ApoE^{-/-}-Maus.

Links: Übersicht der Aorta und deren Gefäßabgänge; Rechts: die Prädispositionsstellen für die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen sind schwarz markiert; (1) Aortenwurzel, (2) kleine Krümmung des Aortenbogens, (3) Hauptäste der Aorta thoracalis, (4) Arteria carotis, (5) Hauptäste der Aorta abdominalis, (6) Aortenbifurkation, (7) Arteria iliaca, (8) Arteria pulmonalis dextra und sinistra (aus Y Nakashima et al. 1994)

Die ApoE^{-/-}-Maus hat als Folge des Fehlens des ApoE-Gens schon bei einer cholesterin- und fettarmen Fütterung einen erhöhten Plasmacholesterolspiegel von 494

mg/dl. Die Kontrolltiere (ApoE^{+/+}) entwickeln im Gegensatz einen Cholesterolspiegel von nur 60 mg/dl. Bei der Fütterung einer fettreichen Western-Type-Diät erhöht sich der Cholesterolspiegel der ApoE^{-/-}-Mäuse auf 1821 mg/dl und der Kontrollgruppe auf 132 mg/dl (AS Plump et al. 1992). Die Höhe des Plasmacholesterols ist unabhängig vom Alter und Geschlecht. Das Fettprofil zeigt eine Verlagerung von den HDLs zu einem Anstieg der VLDLs und Chylomikronenreste (J Jawiń et al. 2004). Junge Tiere entwickeln bei einer normalen Fütterung besonders im Aortensinus Läsionen (RL Reddick et al. 1994). Mit 10 Wochen sind lichtmikroskopisch Schaumzellansammlungen sichtbar. Ab der 12. Lebenswoche zeigen die Mäuse „fatty streaks“ in der proximalen Aorta. In einem Alter von 15 Wochen sind die Läsionen mittelgroß und bestehen aus Schaumzellen und glatten Muskelzellen. Nach etwa 20 Wochen sind fibrotische Plaques nachweisbar (KS Meir et al. 2004). Mit fünf Monaten bestehen die Läsionen aus Schaumzellen, Cholesteroldropfeln und glatten Muskelzellen. Bei den älteren Mäusen zwischen acht und neun Monaten haben sich Plaques in den Arterien entwickelt, die sich aus Schaumzellen, glatten Muskelzellen, Cholesteroldropfeln, Zelldebris und einer fibrotischen Kappe zusammensetzen.

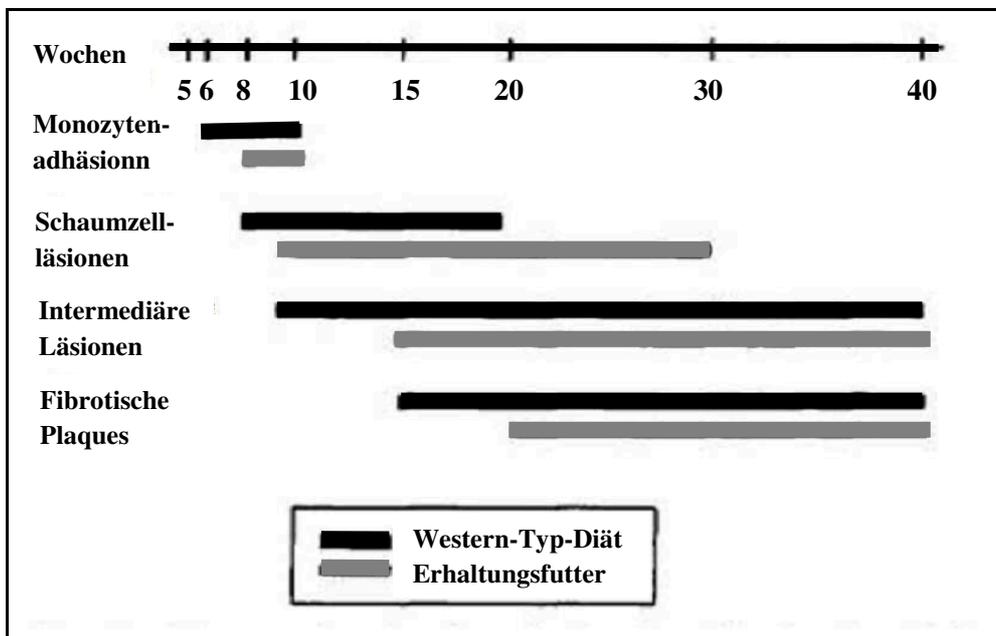


Abb.4: Alter der ApoE^{-/-}-Mäuse in Wochen beim Auftreten der Läsionen im Vergleich zwischen Western-Typ-Diät und Erhaltungsfutter.
(modifiziert nach Y Nakashima et al. 1994)

Mäuse im Alter zwischen neun und zehn Monaten weisen ebenfalls Plaques in den Karotiden, der Abdominalaorta, A. iliaca und Pulmonalarterie auf (RL Reddick et al. 1994). Anfällig für die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen sind auch die

Aortenwurzel, die kleine Krümmung des Aortenbogens und die großen Aufzweigungen der Aorta (Y Nakashima et al. 1994). Die glatte Muskulatur in den Plaques ist reich an rauem endoplasmatischem Retikulum (rER) und Lipideinschlüssen. Das deutet auf eine Veränderung des Phänotyps hin (RL Reddick et al. 1994). Bei Mäusen, die älter als 42 Wochen sind, kommt es gelegentlich auch zu Einblutungen in den Plaques (ME Rosenfeld et al. 2000). Die ApoE^{-/-}-Maus entwickelt nicht zuverlässig Plaquerupturen oder Erosionen (A Daugherty 2002). Die Fütterung einer cholesterin- und fettreichen Western-Typ-Diät beschleunigt das Auftreten einer Gefäßwandschädigung (KS Meir et al. 2004). Die Läsionen sind schwerwiegender und es können zusätzlich Verkalkungen auftreten. Bei einer normalen Fütterung sind die ersten Läsionen mit zehn Wochen als subendotheliale Ansammlung von Schaumzellen sichtbar. Durch die Fütterung der cholesterin- und fettreichen Western-Typ-Diät treten diese Läsionen schon nach acht Wochen auf (Y Nakashima et al. 1994).

2.3. Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

2.3.1. Einteilung

Inzwischen sind mehr als 60 MMPs beschrieben (C Busti et al. 2009). Beim Menschen sind bis heute mehr als 23 verschiedene MMPs entdeckt (MJ Hobeika et al. 2007). Von diesen kommen 14 auch in den Gefäßwänden vor (AC Newby et al. 2005).

Die Einteilung kann in „klassische“ MMPs und in „membrangebundene“ MMPs vorgenommen werden (CJ Malemud et al. 2006). Die Gruppierung Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, membrangebundene Matrix Metalloproteinase (MT-MMPs) und andere erfolgt nach deren Struktur und Substratabbau. (s. Tabelle 1) Die Kollagenasen (MMP-1, -8, -13) spalten den Kollagentyp I, II und III (JM Catania et al. 2007). MMP-1 wird von Fibroblasten gebildet. Nach Stimulation mit Zytokinen oder Wachstumsfaktoren wird sie ebenfalls von Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen und Chondrozyten synthetisiert. Die Bildung von MMP-8 erfolgt durch Leukozyten. MMP-13 wird von Tumorzellen synthetisiert (J-L Beaudoux et al. 2004). Gelatinasen (MMP-2, -9) sind in der Lage Gelatine, Laminin und einige Chemokine zu spalten (JM Catania et al. 2007). Sie können ebenfalls Typ IV Kollagen aus der Basalmembran abbauen (EEJM Creemers et al. 2001). MMP-2 spaltet Typ I, II und III Kollagen (R Visse et al. 2003). MMP-2 kann MMP-1 und MMP-9 aktivieren (JM Catania et al. 2007). Zahlreiche Zellen bilden MMP-2, dazu gehören Fibroblasten,

Keratinocyten, Chondrozyten, Endothelzellen, Monozyten und Osteoblasten. Eine Synthese von MMP-9 erfolgt durch Keratinocyten, Monozyten und Alveolarmakrophagen der Lunge (J-L Beaudoux et al. 2004). Erbkrankheiten des Menschen weisen darauf hin, dass MMP-2 Einfluss auf die Osteogenese ausübt (R Visse et al. 2003).

Zu den Stromelysinen gehören MMP-3, -10 und -11 (J-L Beaudoux et al. 2004). Sie spalten Kollagen, Fibronectin, Laminin, Gelatine, Kasein, einige MMPs (JM Catania et al. 2007), Proteoglykane und Vitronectin (EEJM Creemers et al. 2001). MMP-3 ist an der Aktivierung von zahlreichen pro-MMPs beteiligt (R Visse et al. 2003).

Matrilysine (MMP-7, -26) werden auch als Endometasen bezeichnet (R Visse et al. 2003). MMP-7 kann Oberflächenmoleküle wie E-Cadherin und pro- α -Defensin spalten. MMP-26 vermag MMP-9 zu aktivieren (JM Catania et al. 2007). Gebildet werden sie zum Beispiel von Tumor- und Epithelzellen (J-L Beaudoux et al. 2004). Zu den MT-MMPs gehören MT1-MMP bis MT6-MMP. Diese werden auch als MMP-14, -15, -16, -17, -24 und -25 deklariert (M Egeblad et al. 2002). MMP-14, -15, -16 und -24 gehören zu den Typ I Transmembran-Proteinen. Die übrigen zwei Vertreter, MMP-17 und -25, zählen zu den Glycosylphosphatidylinositolen (GPI) (R Visse et al. 2003).

MT-MMPs sind kovalent an die Zellmembran gebunden (M Egeblad et al. 2002). Ihr Aufbau ähnelt dem der anderen MMPs (JM Catania et al. 2007). Sie können andere MMPs aktivieren (EEJM Creemers et al. 2001). Wie auch die MMPs besitzen die MT-MMPs die Fähigkeit, die ECM zu spalten. MT1-MMP zersetzt zum Beispiel Typ I, II und III Kollagen. MT1-MMP ist an der Angiogenese beteiligt (R Visse et al. 2003). Es gibt einige MMPs, die nicht in die aufgeführten Gruppen zu integrieren sind. Sie werden als „andere MMPs“ betitelt (JM Catania et al. 2007). Zur Gruppe der anderen MMPs zählen zum Beispiel MMP-19, -20, -22, -23 und -28. MMP-12 wird von Makrophagen gebildet und gehört zur Gruppe der Makrophagen-Metalloelastasen (J-L Beaudoux et al. 2004).

2. Schrifttum

Enzym	MMP	Substrat
Kollagenasen	MMP-1	Kollagene Typ I, II, III, VII, VIII und X; Gelatine; Proteoglykane; MMP-2, -9
	MMP-8	Kollagene Typ I, II, III, V, VIII und X; Gelatine; Proteoglykane; Aggrekane
	MMP-13	Kollagene Typ I, II, III, IV, XI, X und XIV; Gelatine; Fibronektine; Osteonektine
Gelatinasen	MMP-2	Kollagene Typ I, II, III, IV, V, VII, X und XI; Gelatine; Elastin; Fibronektine; Proteoglykane; Aggrekane
	MMP-9	Kollagene Typ IV, V, VII, XI und XIV; Gelatine, Elastin; Vitronektine
Stromelysine	MMP-3	Kollagene Typ II, III, IV, IX, X und XI; Fibronektine; Laminin; MMP-7, -8, -13
	MMP-10	Kollagene Typ IV; Kasein; Laminin; Fibronektine; Transferrine
	MMP-11	Aggrekane; Fibronektine; Laminin
Matrilysine	MMP-7	Kollagene Typ IV und X; Gelatine; Aggrekane; MMP-1, -2, -9
	MMP-26	Kollagene Typ IV; Gelatine; Fibronektine
Membran- assoziierte MMPs	MMP-14 (MT-1)	Kollagene Typ I, II, III; MMP-2, -13
	MMP-15 (MT-2)	Kollagen Typ I; Fibronektine; Gelatine; MMP-2
	MMP-16 (MT-3)	Kollagen Typ I; MMP-2
	MMP-17 (MT-4)	Fibrin; Gelatine
	MMP-24 (MT-5)	Fibrin; Gelatine
	MMP-25 (MT-6)	Kollagen Typ IV; Gelatine; Fibronektine; Fibrin
Andere (Auswahl)	MMP-12	Kollagen Typ IV; Elastin; Fibronektine; Laminin
	MMP-19	Kollagen Typ IV; Fibronektine; Aggrekan, Laminin, Gelatine

Tab.1: Einteilung der MMPs
(modifiziert nach C Busti et al. 2009)

2.3.2. Aufbau

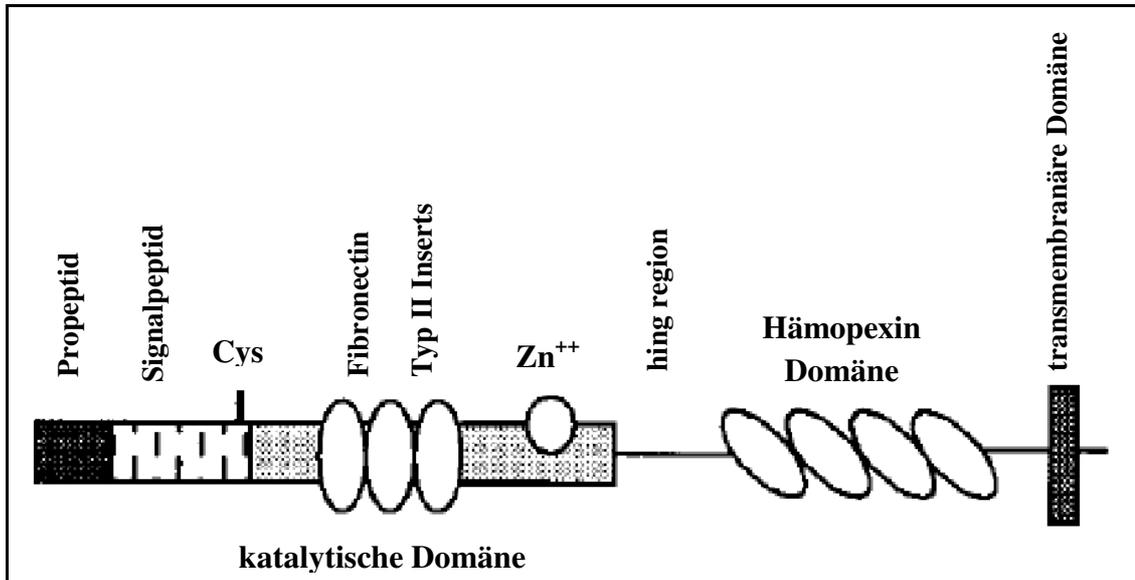


Abb.5: Schematischer Aufbau der humanen Matrixmetalloproteinasen. Die MMPs setzen sich aus einem Propeptid, einem Signalpeptid, einer katalytischen Domäne, einer „hinge“-Region und einer Hämopexin-ähnlichen Domäne zusammen. Die MT-MMPs besitzen für die Verankerung in der Zellmembran zusätzlich eine transmembranäre Domäne.
(modifiziert nach J Westermarck et al. 1999)

MMPs sind Endopeptidasen, bestehend aus einem Signalpeptid, einem Propeptid, einer zinkhaltigen katalytischen Domäne und einer „hinge“-Region, die die katalytische Domäne mit der Hämopexin-ähnlichen Domäne verbindet (J Westermarck et al. 1999).

Das am N-terminalen Ende befindliche Signalpeptid wird für die Sekretion in das endoplasmatische Retikulum und den Transport des Moleküls aus der Zelle heraus benötigt. Anschließend erfolgt die Abspaltung des Signalpeptids (AK Chow et al. 2007).

Die Propeptid-Domäne mit dem Cysteinrest und die katalytische Domäne sind bei allen MMPs enthalten (HE Van Wart et al. 1990). Die katalytische Domäne enthält ein Zinkion und mehrere Kalziumionen für die katalytische Aktivität und Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Molekülstruktur (HR Lijnen 2003/2004). Während des inaktiven Reaktionszustandes ist das Zinkion am Cystein gebunden (HE Van Wart et al. 1990). Das Zinkion wird von drei Histidinresten fixiert (J-L Beaudoux

et al. 2004). Bei den Gelatinasen besitzt die katalytische Domäne noch zusätzlich drei „Fibronectin-type II-like“ Domänen (AK Chow et al. 2007). Diese Domänen sind für die Bindung an Gelatine, Kollagen und Laminin bedeutend (R Visse et al. 2003).

Mit der am C-terminalen Ende befindlichen Hämapexin-Domäne können die MMPs mit anderen Proteinen eine Bindung eingehen (AK Chow et al. 2007; C Busti et al. 2009). Diese Domäne ist bei den Matrilysinen (MMP-7, -26) nicht vorhanden (J Westermarck et al. 1999; AK Chow et al. 2007). Bei den MT-MMPs ist zusätzlich für die Verankerung in der Zellmembran am C-terminalen Ende eine transmembranäre Domäne lokalisiert (J Westermarck et al. 1999). Die Hämapexin-Domäne wird für den Abbau der Tripelhelix des interstitiellen Kollagens durch die Kollagenasen und für die Aktivierung von pro-MMP-2 durch MT1-MMP benötigt (H Nagase et al. 1999).

2.3.3. Regulierung

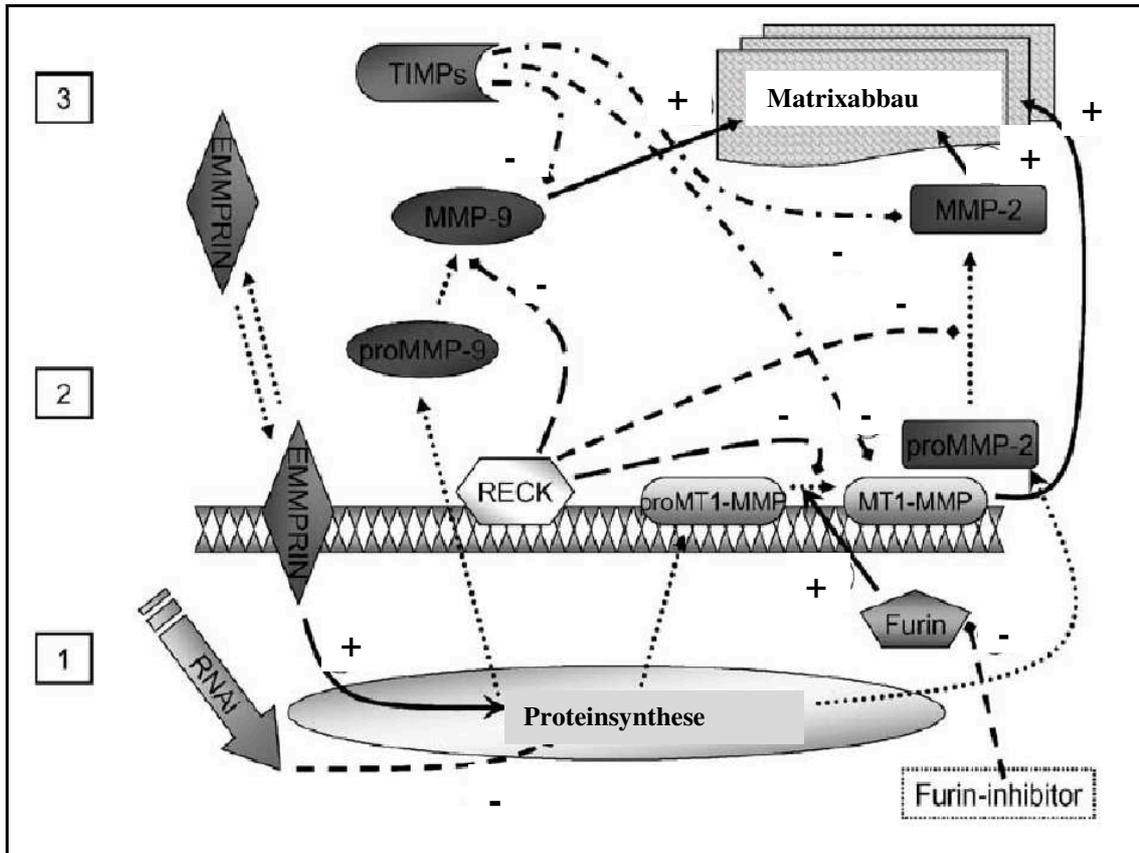


Abb.6: Schematische Darstellung der Regulation der MMP-Aktivität.

1) Hemmung der MMP-Expression und Proteinsynthese; 2) Hemmung der MMP-Aktivierung; 3) Hemmung der MMP-Aktivität. Das auf der Zellmembran lokalisierte „reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs“ (RECK) und die „tissue inhibitor of metalloproteinases“ (TIMPs) wirken hemmend auf die MMP-Aktivität.

(modifiziert nach JPG Sluijter et al. 2006).

Um einen unkontrollierten Abbau der ECM zu verhindern, muss eine strenge Regulation der Aktivität erfolgen. Der Organismus nimmt über mehrere Ebenen Einfluss auf die MMPs:

- 1) Kontrolle der Gen-Transkription
- 2) Synthese von inaktiven pro-MMPs
- 3) Bildung von endogenen Inhibitoren

(MJ Hobeika et al. 2007)

Die **Transkription** ist die wichtigste Regulationsstufe für die meisten MMPs mit Ausnahme von MMP-2. Bei dieser spielt besonders die post-transkriptionelle Regulation eine Rolle (C Busti et al. 2009). *In vitro* Versuche mit humanen

Endothelzellen zeigten, dass eine länger andauernde Hypoxie die MMP-2 mRNA Expression steigert (Y Ben-Yosef et al. 2002). Die Transkription wird beeinflusst durch Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine. Fördernd auf die Synthese wirken beispielsweise Interleukin-1 (Il-1), „platelet derived growth factor“ (PDGF), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (J-L Beaudoux et al. 2004), „epidermal growth factor“ (EGF), „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) und „cluster of differentiation 40“ (CD40). CD147 ist ein Zelloberflächenprotein, das ebenfalls die Expression stimuliert (EEJM Creemers et al. 2001). Auf die Bedeutung des CD147 wird im Kapitel 2.6. ausführlich eingegangen. Heparin, TGF- β und Steroide hemmen hingegen die MMP-Synthese (J-L Beaudoux et al. 2004). Die gleichen Faktoren können in ihrer Wirkung bei den verschiedenen MMPs variieren (EEJM Creemers et al. 2001).

Die MMPs werden als **pro-Enzyme** synthetisiert und überwiegend als inaktives Zymogen (pro-MMP) sekretiert (HR Lijen 2002/2003; H Nagase et al. 1999). Eine Aktivierung erfolgt durch Proteolyse im Extrazellularraum (MJ Hobeika et al. 2007). Es wird zwischen einer schrittweisen Aktivierung und der Aktivierung auf der Zelloberfläche unterschieden. Es gibt auch MMPs (MMP-11, -28 und MT-MMPs), die bereits intrazellulär eine Aktivierung erfahren (EEJM Creemers et al. 2001; J Westermarck et al. 1999). Die Mechanismen, die während der intrazellulären Aktivierung ablaufen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt (C Busti et al. 2009). An der schrittweisen extrazellulären Aktivierung sind Proteinasen wie Plasmin, Trypsin, Chymase, Elastase und Kallikrein beteiligt, wobei Plasmin den wichtigsten Aktivator darstellt (EEJM Creemers et al. 2001). Pro-MMPs werden zum überwiegenden Anteil durch Proteinasen aus dem Gewebe oder Plasma aktiviert. Als Besonderheit erfolgt bei pro-MMP-2 die Aktivierung auf der Zelloberfläche (K Brew et al. 2000). Der Angriff der Proteinase an die Propeptid-Domäne bewirkt eine Konformationsänderung des Propeptids. Nun kann das Propeptid durch eine weitere Proteinase, häufig eine MMP, abgespalten werden (EEJM Creemers et al. 2001). Beim Aktivierungsmechanismus wird die Cysteinyl-Sulfhydryl-Gruppe vom Zinkion der katalytischen Domäne abgespalten (C Busti et al. 2009; H Nagase et al. 1999). Unter Versuchsbedingungen gelang auch eine Aktivierung der MMPs mit Hilfe von chemischen Substanzen, reaktiven Sauerstoffspezies, niedrigen pH-Werten oder Hitze (R Visse et al. 2003).

In der Aktivierungskaskade vom MMP-2 sind MT1-MMP und TIMP-2 beteiligt. Es bildet sich ein MMP-2/TIMP-2/MT1-Komplex (AK Chow et al. 2007; EEJM

Creemers et al. 2001). Die N-terminale Domäne von TIMP-2 bindet an die aktive Seite von MT1-MMP. Die C-terminale Domäne von MT1-MMP geht anschließend eine Bindung mit der Hämopexin-Domäne des pro-MMP-2 ein. (K Brew et al. 2000). Ein weiteres MT1-MMP spaltet vom pro-MMP-2 des Komplexes das Propeptid ab. So entsteht aus der inaktiven pro-MMP-2 eine aktivierte MMP-2.

Die Aktivierung von einer MMP kann wiederum die Aktivierung einer anderen MMP auslösen. Es entsteht eine Aktivierungskaskade zwischen den verschiedenen MMPs (J-L Beaudoux et al. 2004).

Zu den **endogenen Inhibitoren** der MMPs gehören: α 2-Makroglobulin, Thrombospondin-2, kleine Moleküle mit TIMP-like-Domänen, RECK und TIMPs (M Egeblad et al. 2002).

α 2-Makroglobulin ist ein großes Protein (750kDa) (EEJM Creemers et al. 2001). Es kommt in Gewebeflüssigkeiten vor und bildet mit den MMPs einen Komplex. Der α 2-Makroglobulin-MMP-Komplex bindet an „Scavenger“-Rezeptoren und kann anschließend phagozytiert und abgebaut werden (M Egeblad et al. 2002). Das von der Leber synthetisierte α -Makroglobulin ist ein Inhibitor der vier Proteinasegruppen: Cysteine, Aspartyle, Serine und Metalloproteinasen (EEJM Creemers et al. 2001). Thrombospondin-2 hat einen ähnlichen Wirkungsmechanismus. Es bildet ebenfalls mit den MMPs Komplexe, die über die Bindung an „Scavenger“-Rezeptoren durch Endozytose aufgenommen und anschließend gespalten werden. RECKs („reversion-inducing-30 cysteine-rich proteins with kazal motifs“) sind membrangebundene Inhibitoren (M Egeblad et al. 2002). *In vitro* Versuche konnten deren Einfluss auf die MMP-2, -9 und MT1-MMP-Aktivität aufdecken. Untersuchungen mit Patienten ergaben bei verschiedenen Tumorerkrankungen eine positive Korrelation zwischen der RECK-Konzentration und der Überlebensrate. RECK ist ein wichtiger Zelloberflächeninhibitor der MMPs, deren Hemmung zu einer gesteigerten Malignität von Tumorerkrankungen führt (M Noda et al. 2003).

Zu den wichtigsten endogenen Hemmern gehören die TIMPs (EEJM Creemers et al. 2001). Das richtige Gleichgewicht zwischen der Aktivität der MMPs und der TIMP-Expression ist entscheidend für einen physiologischen Metabolismus der ECM (K Brew et al. 2000). TIMPs sind kleine, cysteinreiche Proteine (23 kDa) mit einer langen N-terminalen Domäne für die MMP-Hemmung und einer kurzen C-terminalen Domäne (AK Chow et al. 2007). Die Domänen werden jeweils durch drei

Disulfidbindungen stabilisiert (K Brew et al. 2000). Die TIMPs sind in den meisten Geweben und Körperflüssigkeiten nachweisbar. Es gibt vier Mitglieder: TIMP-1 bis TIMP-4. Diese Inhibitoren gehen mit den MMPs eine nicht kovalente Bindung ein (EEJM Creemers et al. 2001). Sie binden irreversibel an der katalytischen Domäne (C Busti et al. 2009). Die TIMPs zeigen eine geringe Spezifität für bestimmte MMPs. So ist TIMP-1, ein kleines, mannosereiches Glykoprotein und (J-L Beaudoux et al. 2004) Inhibitor für die meisten MMPs. MMP-2 und MT1-MMP werden jedoch nicht gehemmt (EEJM Creemers et al. 2001). TIMP-1 hemmt besonders die MT-MMPs (C Busti et al. 2009) und MMP-9 (AK Chow et al. 2007). TIMP-2 ist ebenfalls für die meisten MMPs ein Inhibitor, MMP-9 gehört nicht dazu (EEJM Creemers et al. 2001). Es bindet besonders an MMP-2 (AK Chow et al. 2007). MMP-1, -2, -3, -9, -13 werden durch TIMP-3 gehemmt (EEJM Creemers et al. 2001). Dieser Inhibitor ist mit der ECM assoziiert (C Busti et al. 2009). TIMP-4 ist ein Inhibitor für MMP-1, -3, -7 und -9 (EEJM Creemers et al. 2001). TIMP-4 bindet auch an die C-terminale Domäne der pro-MMP-2 (K Brew et al. 2000). Gebildet werden die TIMPs von verschiedenen Zelltypen, wie glatten Muskelzellen, Makrophagen und auch Thrombozyten (C Busti et al. 2009). Mehrere Faktoren, wie Phorbol Ester, IL-1, IL-6, TGF- β beeinflussen deren Transkription (EEJM Creemers et al. 2001).

2.3.4. Funktionen

Im gesunden Gewebe wurden nur geringe Konzentrationen der MMPs nachgewiesen. Beim extrazellulären Remodeling kommt es zu einer vermehrten Bildung der MMPs und TIMPs (J-L Beaudoux et al. 2004). Die MMPs sind Proteinasen, die Komponenten der ECM abbauen. Sie sind in zahlreichen physiologischen Umbauvorgängen involviert (MJ Hobeika et al. 2007; TH Vu et al. 2000), die zum Beispiel in der Schwangerschaft (HR Lijnen 2003/2004) und bei der Wundheilung (MJ Hobeika et al. 2007) auftreten. Es konnte außerdem eine Beteiligung an der Ovulation (EEJM Creemers et al. 2001) und Menstruation gezeigt werden (MJ Hobeika et al. 2007).

Ein Ungleichgewicht zwischen Matrixabbau und -aufbau tritt bei zahlreichen pathologischen Zuständen auf. Erkrankungen, bei denen die MMPs eine Rolle spielen sind: Arthritis (JPG Sluijter et al. 2006; EEJM Creemers et al. 2001), Tumorwachstum (JPG Sluijter et al. 2006; EI Deryugina et al. 2006), Zahnerkrankungen (EEJM

Creemers et al. 2006), Atherosklerose, Herzerkrankungen, Gefäßstenosen (ZS Galis et al. 2002) und Aneurysmabildung (MJ Hobeika et al. 2007).

Als Beispiel für eine kardiovaskuläre Erkrankung soll auf die Pathogenese des abdominalen Aortenaneurysmas detaillierter eingegangen werden. Bei der Entwicklung eines abdominalen Aortenaneurysmas kommt es zur Umstrukturierung der Gefäßwand, wobei es zu einer Abnahme von Elastin und einer Zunahme der Kollagensynthese kommt. Elastin wird durch MMP-2 und MMP-9 abgebaut. Tierversuche zeigten, dass jeweils die MMP-2-KO-Mäuse und die MMP-9-KO-Mäuse nach einer Verletzung der Aortenwand weniger Aneurysmen entwickelten als die Wildtypmäuse (MJ Hobeika et al. 2007). Auch Versuche mit ApoE^{-/-}-Mäusen bestätigten eine Beteiligung der MMPs an der Aneurysmabildung. ApoE^{-/-}MMP-3^{-/-}-Doppelknockout-Mäuse entwickelten seltener Aneurysmen als ApoE^{-/-}MMP-3^{+/-}-Mäuse (J Silence et al. 2001). In Proben von Patienten mit abdominalem Aortenaneurysma konnten mehrere MMPs in der Aortenwand ermittelt werden, die überexprimiert waren, darunter MMP-3 (TWG Carrell et al. 2002) und -9 (KM Newman et al. 1994).

Untersuchungen zeigten, dass eine erhöhte Aktivität der Kollagenasen bei der dilatativen Kardiomyopathie (SC Tyagi et al. 1996).

In Rattenherzen, bei denen durch eine Gefäßligatur künstlich ein Infarkt indiziert wurde, stieg die Kollagenaseaktivität vom zweiten bis zum siebenten Tag nach der Operation an. Das deutet darauf hin, dass die MMPs die Umbauprozesse, die nach einem Infarkt ablaufen, mit beeinflussen (JP Cleutjens et al. 1995; FG Spinale et al. 2000; Li YY et al. 1998; WS Bradham et al. 2002).

2.4. Plaqueruptur

Eine Plaqueruptur mit oberflächlicher Thrombusbildung kann einen Herzinfarkt, plötzlichen Herztod und die Syndrome der instabilen Angina pectoris verursachen (E Falk et al. 1995). Untersuchungen ergaben, dass 73,3% der am plötzlichen Herztod verstorbenen Personen einen Thrombus nach Plaqueruptur entwickelt hatten. Es sterben weniger Menschen am Gefäßverschluss durch eine größer werdende Plaque, als an den Folgen der Thrombusbildung nach einer Plaqueruptur (MJ Davies 1992). Oft bleibt eine Plaqueruptur mit anschließender Thrombusbildung klinisch unauffällig. Der Defekt kann zunächst abheilen und verschließt sich mit kollagenen Fasern und extrazellulärer Matrix. Es entsteht ein Kreislauf aus Plaqueruptur, Thrombusbildung

und Abheilung. Bei 60% der am plötzlichen Herztod verstorbenen Personen ist vorher dieser Zyklus durchlaufen worden (W Insull 2009; AP Burke et al. 2001). Nach einer Plaqueruptur kann die Kappe im Blutstrom flattern und selbst einen Gefäßverschluss auslösen (MJ Davies 1994).

Die Größe eines Atheroms sagt nichts über die Wahrscheinlichkeit einer Thrombusbildung aus. Die meisten akuten Herzinfarkte werden von Atheromen verursacht, die weniger als 50% des Gefäßes verschließen (P Libby 2000). Die Rupturanfälligkeit einer Plaque wird bestimmt durch die Größe und Konsistenz des fettreichen Kerns, Stabilität der fibrotischen Kappe, Entzündungsprozesse innerhalb der Plaque und Ermüdung der Kappe durch langanhaltende mechanische Belastung (E Falk et al. 1995). Auch Verkalkungen und einspritzende Blutgefäße nehmen Einfluss auf die Plaquestabilität (AJ Lusis et al. 2000). Durch Blutungen innerhalb der Plaque oder bei einer Plaqueruptur wird die Gerinnungskaskade aktiviert. Das dabei gebildete Thrombin steht im Verdacht, die MMP-Aktivierung zu fördern (ZS Galis et al. 1997). Eine Thrombusbildung kann auch durch Erosion des Endothels oder Freiwerden von verkalkten Elementen entstehen (W Insull 2000). 60% bis 70% der akuten Koronarthrombosen werden durch eine Plaqueruptur und 30% bis 40% durch die Erosion des Plaqueendothels ausgelöst (EJ Wassermann et al. 2006).

2.4.1. Aufbau einer Plaque

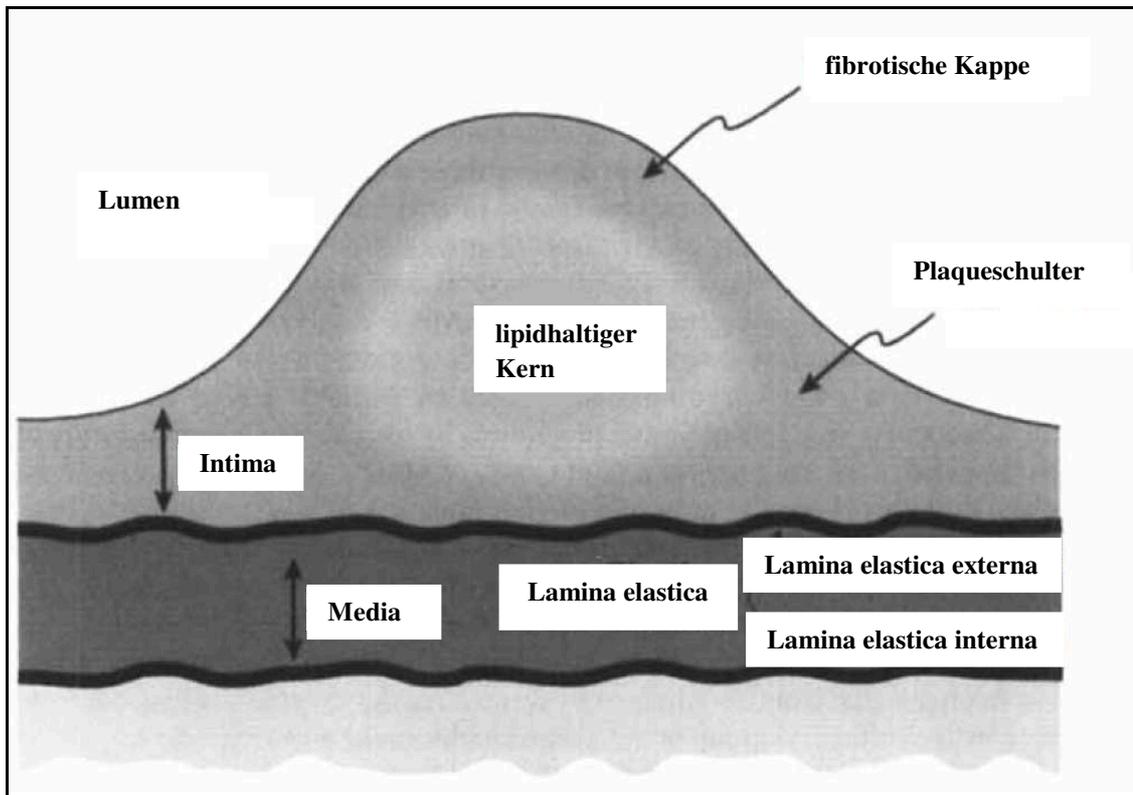


Abb.7: Aufbau einer typischen atherosklerotischen Plaque.
(modifiziert nach P Libby et al. 1997)

Die Plaques können eingeteilt werden in instabile und feste Plaques. Die weichen, instabilen, rupturanfälligen Plaques enthalten einen großen, hoch thrombogenen, lipidreichen Kern (E Falk et al. 1995).

Die Plaques werden zum Gefäßlumen hin von einer dichten Kappe, bestehend aus vielen abgeflachten glatten Muskelzellen, Bindegewebe, wie kollagenen Fasern und Proteoglykanen bedeckt (R Ross 1995; R Ross et al. 1984; W Insull 2009). Unter der fibrotischen Kappe liegt ein nekrotischer, fettreicher Kern mit zahlreichen Makrophagen und einigen glatten Muskelzellen (R Ross 1995). Die Nekrose entsteht durch Zelluntergang von Makrophagen und glatten Muskelzellen (M Schachter 1997). Eine dicke, dichte fibrotische Kappe sorgt für die Stabilität der Plaques (R Ross 1995). Sie trennt das Blut vom sehr thrombogenen Plaqueinhalt (P Libby 2000). Eine stabile Kappe enthält reichlich, regelmäßig angeordnete kollagene Fasern. In einer instabilen Kappe ist der Kollagengehalt gering und die Fasern zeigen einen irregulären Verlauf

(M Kaartinen et al. 1994; P Libby 2000). Kollagenfasern werden von glatten Muskelzellen gebildet. Durch eine Entzündung in der Intima wird auf der einen Seite weniger Kollagen gebildet und auf der anderen Seite mehr abgebaut (P Libby 2000). Mit der Größenzunahme der Plaque wachsen häufig aus der Intima kleine Gefäße, Vasa vasora genannt, in die Plaques ein (R Ross 1995). Die dünnwandigen Gefäße können leicht rupturieren und Blutungen in der Läsion verursachen (W Insull 2009).

2.4.2. Bedeutung der MMPs bei der Plaqueruptur

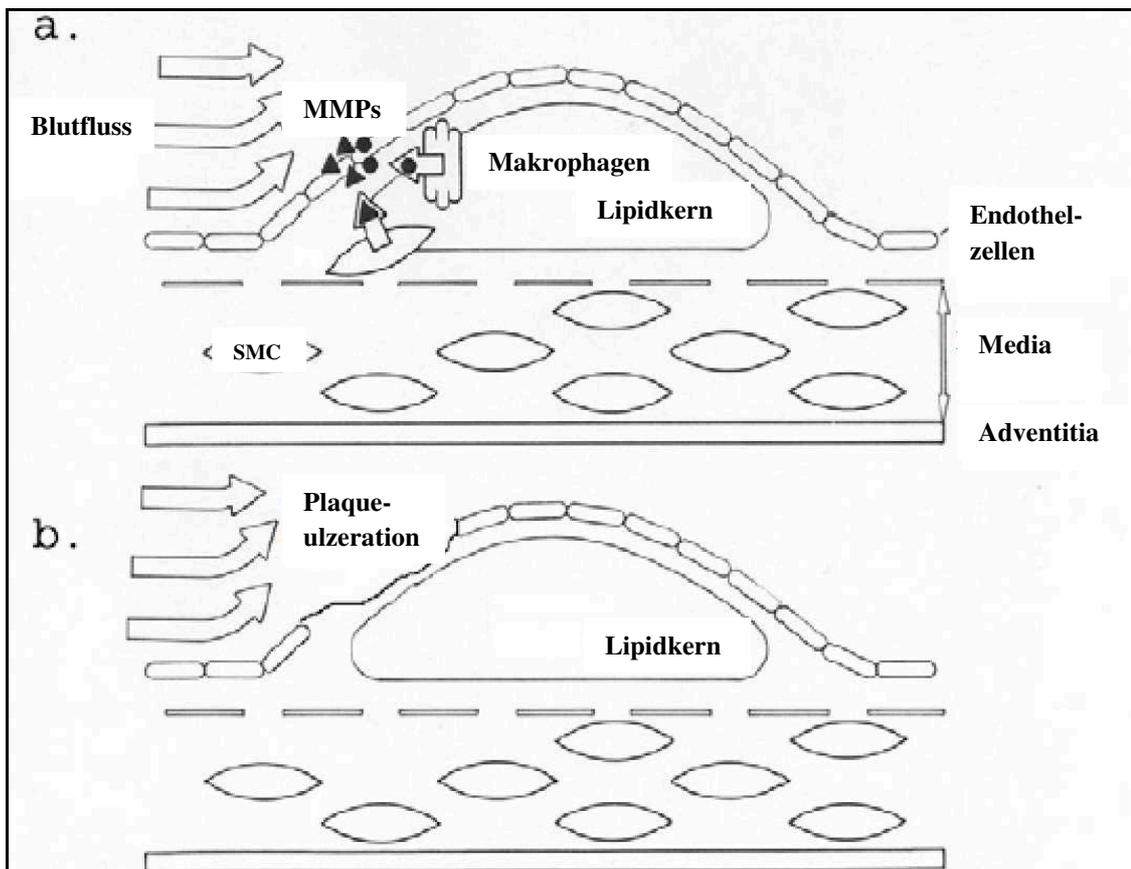


Abb.8: Plaqueruptur.

Die von den SMCs und Makrophagen gebildeten MMPs schwächen die Plaque besonders an der Plaqueschulter. Als Folge treten Plaqueruptur oder Ulzeration auf. (modifiziert nach MJ Hobeika et al. 2007)

Aus den frühen stabilen Atheromen entwickeln sich Plaques mit einer dünnen rupturanfälligen Kappe (W Insull 2009). In den instabilen Plaques besteht ein Ungleichgewicht zwischen MMP-Aktivierung und Hemmung. Eine gesunde Arterienwand enthält keine oder nur eine geringe MMP-Konzentration (JL Beaudoux et al. 2004). In den Plaques wurden MMP -1,-2, -3,-7, -9, -11 und -13 festgestellt (ZS

Galis et al. 1994; I Halpert et al. 1996; Z Li et al 1996; GK Sukhova et al. 1999). Makrophagen stellen in der Plaque die Hauptquelle der MMP-Bildung dar (ZS Galis 2002). In tierexperimentellen Untersuchungen mit Kaninchen wurden Schaumzellen aus atherosklerotischen Läsionen isoliert. Diese enthielten Stromelysin und interstitielle Kollagenase. Das weist darauf hin, dass Makrophagen durch die Bildung von MMPs ganz wesentlich zur Plaquestabilisierung beitragen (ZS Galis et al. 1995; AJ Lusis 2000). Besonders die Plaqueschulter ist makrophagenreich und rupturanfällig (R Ross 1995; MJ Davies 1994). Die von den Makrophagen freigesetzten Sauerstoffspezies fördern die Aktivierung und Expression der MMPs (S Rajagopalan et al. 1996). In der Plaqueschulter treten ebenfalls Ansammlungen von aktivierten Mastzellen (M Kaartinen et al. 1994), T-Lymphozyten (J Schonebeck et al. 1999) und neutrophilen Granulozyten auf. Diese bilden proteolytische Enzyme, die auch zur MMP-Aktivierung beitragen (E Falk et al. 1995). Das von den T-Lymphozyten gebildete IFN- γ führt zu einer deutlichen Hemmung der Kollagensynthese der SMCs. T-Zellen können die Makrophagen stimulieren, mehr MMPs zu synthetisieren (P Libby 2008; P Libby 2000). TGF- β sowie PDGF werden von aktivierten Thrombozyten synthetisiert und fördern die Kollagensynthese, was die Plaqueheilung unterstützt (P Libby 2000).

In den Plaques erfolgt die MMP-2 und -9-Expression durch Makrophagen und SMCs (RR Pauly et al. 1994; Z Li et al. 1996; MJ Hobeika et al. 2007). OxLDL fördert durch Steigerung der MMP-9-Expression der Makrophagen und Hemmung von TIMP-1 den Abbau der ECM (XP Xu et al. 1999). Gough et al. untersuchten den Einfluss einer gesteigerten MMP-9-Expression auf die Plaquestabilität mit Hilfe von ApoE^{-/-}-Mäusen. Das von Makrophagen gebildete pro-MMP-9 hatte fast keine Auswirkung auf die Plaque. Erst bei der Expression von sich selbst aktivierender MMP-9 kam es zu einer Schwächung der Plaquestabilität (PJ Gough et al. 2006). Dieses Ergebnis wird auch in Humanstudien reflektiert. Personen mit einer instabilen Angina wiesen einen höheren MMP-9-Gehalt in den Koronargefäßen auf, als Menschen mit einer stabilen Angina Pectoris (DL Brown et al. 1995). Eine MMP-11-Expression wird durch die Beeinträchtigung der CD40-CD40L Interaktion gestört. CD40L wird in den Atheromen von T-Zellen gebildet (J Schonebeck et al. 1999). Bei einer Blockade des CD40-Signals in Tierversuchen änderte sich die Zusammensetzung der Plaques. Die Zahl der Entzündungszellen reduzierte sich und der Anteil von glatten Muskelzellen und Kollagen nahm zu (M Rouis et al. 1999).

Entzündliche Erkrankungen erhöhen das Rupturrisiko. So wurde festgestellt, dass bei akuten Infektionen das Risiko für Herzinfarkt und Schlaganfall ansteigt (AJ Lusis 2000). Entzündungsmediatoren fördern die MT1-MMP-Expression der Makrophagen und SMCs in Atheromen. MT1-MMP führt zu einer Aktivierung von pro-MMP-2 (TB Rajavashisth et al. 1999; H Uzui et al. 2002).

Beim akuten Koronarsyndrom sind die Spiegel von MMP-2 und -9 im peripheren Blut erhöht (H Kai et al. 1998; P Ferroni et al. 2003), daher wird untersucht, ob sich MMPs auch als Biomarker für Herz-Kreislauf-Erkrankungen eignen.

2.5. Restenose

„Die Restenose nach Angioplastie stellt eine segmental begrenzte Wundheilungsantwort auf eine Interventions-assoziierte Traumatisierung der Gefäßwand dar“ (G Bauriedel et al. 1994).

Die „percutaneous transluminal coronary angioplasty“ (PTCA) wurde 1977 zum ersten Mal von Andreas Gruentzig klinisch angewandt. Heute ist sie ein erfolgreiches Verfahren zur Behandlung von koronaren Gefäßverengungen (M Ferrell et al. 1992). Die Angioplastie bezeichnet chirurgische Verfahren zur Entfernung von Stenosen oder Verschlüssen in Gefäßen. Dazu gehört die Ballondilatation, Dehnung mittels spezieller Katheter oder Einsetzen von Stents (Pschyrembel 2002).

Es wird bei der auftretenden Lumeneinengung nach Angioplastie zwischen konstriktivem Remodeling und einer Neointimahyperplasie differenziert (M Kuzuya et al. 2003; MJ Hobeika et al. 2007). Das konstriktive Remodeling spielt nach der Ballondilatation eine größere Rolle als die Intimahyperplasie (KM Southgate et al. 1999). Die Intimahyperplasie ist verbunden mit einer erhöhten Anzahl an SMCs, bedingt durch Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen. In der Intimahyperplasie erfolgt eine gesteigerte Ansammlung ECM. Ausgelöst wird die Hyperplasie durch Verletzung, Entzündung oder Überdehnung der Gefäßwand. Eine solche Hyperplasie tritt nicht nur nach einer Angioplastie auf, sondern auch während des Krankheitsgeschehens der Atherosklerose, in transplantierten Organen oder bei der pulmonalen Hypertension. Sie ist aber auch an physiologischen Abläufen beteiligt, wie beim Verschluss des Ductus arteriosus nach der Geburt (AC Newby et al. 2000; MG Davies et al. 1994).

Als Stent wird eine „[...] selbstexpandierende, scheringitterartige endoskopisch oder radiologisch platzierbare Prothese aus verschiedenen Materialien, die sich nach der Implantation selbständig ausdehnt“ definiert (Pschyrembel 2002). Einer Thrombusbildung, die nach einer Gefäßwandschädigung auftritt, kann inzwischen medikamentös gut vorgebeugt werden (MW Majesky 1994). Die Restenosierung ist immer noch eines der größten Probleme im Anschluss einer erfolgreichen Angioplastie (M Ferrell et al. 1992). Als Restenose wird eine erneute Stenose von mehr als 50% des Durchmessers vom Gefäßlumen im beschädigten Gefäßabschnitt bezeichnet (JW Moses et al. 2003). Sechs bis sieben Monate nach einer koronaren Ballondilatation beträgt die Rate der Restenose 32-42% (PW Serruys et al. 1994; DL Fischman et al. 1994). Es wird zwischen den herkömmlichen unbeschichteten Stents und den medikamentenfreisetzenden Stents unterschieden. Studien mit Patienten konnten belegen, dass unbeschichtete Stents zu einer Reduktion der Restenose gegenüber einer einfachen Ballondilatation führen. Eine Untersuchung des Behandlungserfolges von 410 Patienten ergab, dass die Restenoserate sechs Monate nach einer Ballondilatation 42,1% beträgt und durch den Einsatz von unbeschichteten Stents auf 31,6% gesenkt wurde (PW Serruys et al. 1994; DL Fischman et al. 1994). Die Entwicklung der medikamentenfreisetzenden Stents brachte neue Behandlungsmöglichkeiten, da sie die SMC-Proliferation und das Matrixwachstum hemmen. Sie sind von einem Polymer ummantelt, das ein Medikament direkt am Wirkort freisetzt. So kann lokal eine hohe Wirkstoffkonzentration erreicht werden (V Bhatia et al. 2004). Es sind verschiedene medikamentenfreisetzende Stents entwickelt worden. Dazu gehört der Sirolimus-freisetzende Stent und Paclitaxel-freisetzende Stent. Studien an Menschen konnten eine Reduktion der Restenose im Vergleich zum unbeschichteten Stent bestätigen (JE Sousa et al. 2003; JW Moses et al. 2003; GW Stone et al. 2004). In einer Studie mit 1058 Patienten ergab die angiographische Untersuchung 240 Tage nach dem Eingriff, dass der Sirolimus-freisetzende Stent mit 3,2% eine geringere Restenoserate aufweist als ein unbeschichteter Stent mit 35,4% Restenoserate (JW Moses et al. 2003). Nachteil der medikamentenfreisetzenden Stents ist, dass sie auch die Reendothelisierung verhindern. Dadurch wird die Wundheilung verzögert und das Risiko für eine späte Thrombose steigt (T Inoue et al. 2009; S Takahashi et al. 2007; SF Lee et al. 2008). Trotz der vielversprechenden Ergebnisse ergaben Langzeitstudien vier Jahre nach der Stentimplantation, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Todesrate, dem Risiko für Herzinfarkt und der

Stentthrombose zwischen unbeschichteten Stent und medikamentenfreisetzenden Stent gibt (C Spaulding et al. 2007; MN Babapulle et al. 2004).

Die klinische Restenose bezieht sich auf die Symptome, die durch eine Minderdurchblutung des Gewebes auftreten. Histologisch führen Revaskularisierungstechniken immer zu einer Neointimabildung und damit zu einer Stenosierung. Sie ist jedoch bei den Patienten unterschiedlich stark ausgeprägt und zieht nicht immer klinische Symptome nach sich (J Phillips-Hughes et al. 1996). Die maximale Inzidenz ist etwa zwei bis drei Monate nach dem Eingriff erreicht. Angiographische Untersuchungen nach einer Ballondilatation ergaben, dass die Restenose nach vier bis sechs Monaten in der Regel nicht weiter fortschreitet (G Bauriedel et al. 1994). Der Höhepunkt der Neointimabildung nach dem Einsetzen eines unbeschichteten Stents ist nach sechs Monaten erreicht, anschließend erfolgt eine Rückbildung. Bei den medikamentenfreisetzenden Stents konnte auch nach zwei Jahren noch eine Neointimabildung beobachtet werden. Es gibt Hinweise, dass das Wachstum zwei bis vier Jahre anhält (AT Ong et al. 2005).

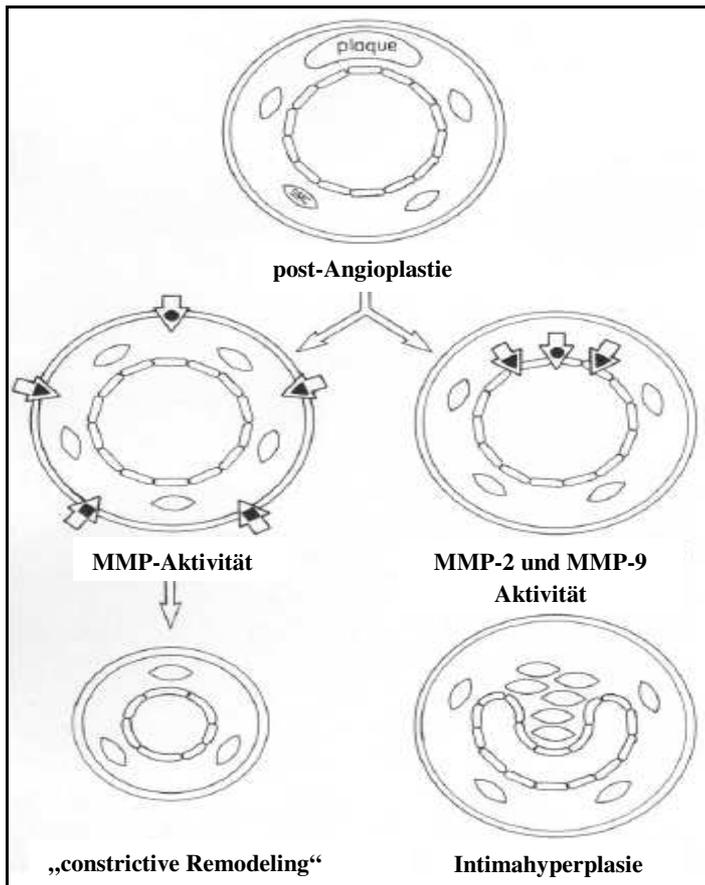


Abb.9: Lumenverkleinerung nach Angioplastie.

Bei der Restenose nach der Angioplastie wird zwischen „constrictive Remodeling“ und Intimahyperplasie unterschieden. Bei der Entwicklung einer Intimahyperplasie sind besonders MMP-2 und -9 beteiligt. (modifiziert nach MJ Hobeika et al. 2007)

2.5.1. Phasen der Neointimabildung

Nach einer Gefäßwandverletzung durch die Angioplastie laufen Wundheilungsprozesse mit Umbauvorgängen in der Gefäßwand ab (ZS Galis et al. 2002). Besonders Thrombozyten, Monozyten/Makrophagen und glatte Muskelzellen sind an der Pathogenese beteiligt (G Bauriedel et al. 1994).

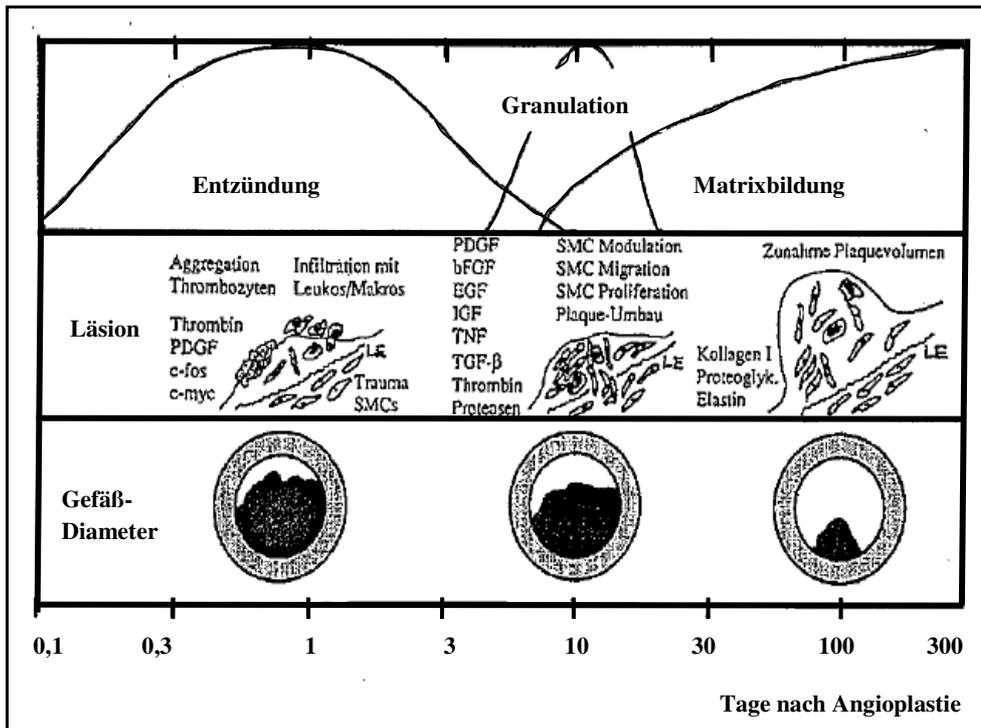


Abb.10: Schematische Darstellung der Phasen der Stenosierung.
(aus G Bauriedel et al. 1994)

Phasen der Neointimabildung nach G Bauriedel et al 1994:

- Entzündung
- Granulation
- Matrixbildung

Entzündung

Im Rahmen einer chirurgischen Manipulation wird das Endothel und Subendothel der Gefäßwand verletzt. Die Stärke der Beschädigung hat einen Einfluss auf den Grad der Stenosierung. Eine Beschädigung der Media zieht eine stärkere Stenosebildung nach sich. Die Endothelverletzung führt zur Thrombinbildung mit anschließender Plättchenaggregation. Thrombin wirkt chemotaktisch auf Monozyten und mitogen auf SMCs und Lymphozyten. Gefäßwandbeschädigung und Thrombusbildung stimulieren eine Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Zellen der Blutbahn, Endothelzellen und glatten Muskelzellen. In Tierstudien wurde eine Protoonkogen-Expression als Folge einer Überdehnung der SMCs nach der Angioplastie ermittelt. Die Protoonkogene haben vermutlich Einfluss auf Proliferations- und Differenzierungsvorgänge der SMCs (G Bauriedel et al. 1994).

Granulation

Die Granulation beginnt bereits während der Entzündungsreaktion (G Bauriedel et al. 1994). Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass die glatten Muskelzellen bei der Neointimabildung von großer Bedeutung sind. So konnten Stchelkounoff und Spaet belegen, dass die Zellen der Neointima ihren Ursprung bei den SMCs haben (MG Davies et al. 1994; TH Spaet et al. 1975). Die Verletzung des Endothels und der Basalmembran der SMCs löst eine Änderung des Phänotyps aus. Die glatten Muskelzellen gehen vom kontraktilem in das synthetische Stadium über. Die Phänotypänderung ist verbunden mit einer Zunahme der Zellorganellen, besonders des rERs und einer Abnahme der Myofilamente (G Bauriedel et al. 1994; MG Davies et al. 1994; TH Spaet et al. 1975). In der gesunden Media proliferieren weniger als 1% der SMCs. Nach der Verletzung beginnt bereits innerhalb von 24 bis 48 Stunden die Hypertrophie und Proliferation der SMCs in der Media. Innerhalb kurzer Zeit teilen sich 20% der SMCs. Untersuchungen haben einen wellenartigen Eintritt der SMCs in die S-Phase gezeigt. Es folgt eine Zellmigration aus der Media in die Intima. Dort teilen sich die Zellen noch einige Tage weiter. Anschließend differenzieren sich die Zellen zu SMCs. Nach etwa vier Wochen kehren die meisten Muskelzellen wieder in ihren ursprünglichen kontraktilem Zustand zurück. Eine kleine Population teilt sich jedoch weiter (MG Davies et al. 1994; WS Webster et al. 1974; J Phillips-Hughes et al. 1996). In einer unverletzten A. carotis communis der Maus sind in der Intima keine SMCs enthalten. Acht Tage nach einer Drahtdenudation der A. carotis communis sind die ersten SMCs in der Intima nachweisbar. Nach zwei Wochen ist in der Intima annähernd die gleiche Anzahl von SMCs enthalten wie in der Media (V Lindner et al. 1993). Die Migration der SMCs Richtung Gefäßlumen ähnelt der Tumorzellinvasion und lässt in den ersten Wochen nach der Verletzung die Zellzahl in der Neointima ansteigen (MW Majesky 1994; M Kuzuya et al. 2003).

Proteasen wie Plasmin, Kollagenasen, Cysteine, Serine und MMPs erleichtern durch Spaltung der ECM die Migration der SMCs aus der Media in die Intima und führen zu Umbauvorgängen in der Gefäßwand (G Bauriedel et al. 1994; M Kuzuya et al. 2003).

Die Proliferation der SMCs wird durch bFGF, PDGF, IGF-1 und Thrombin stimuliert (V Lindner et al. 1991; J Phillips-Hughes et al. 1996). Das bei der Plättchenadhäsion freigesetzte PDGF wirkt zusätzlich chemotaktisch auf die Migration der glatten Muskelzellen (J Phillips-Hughes et al. 1996). Tierversuche geben Hinweise, dass die

Thrombozyten einen Einfluss auf das Migrationsverhalten der SMCs haben (F Fingerle et al. 1989).

Matrixbildung

In der dritten Phase der Wundheilung wird ein bis zwei Wochen nach der Gefäßwandschädigung vermehrt ECM wie Tenascin, Fibronectin, Kollagen, Proteoglykan, Elastin und Thrombospondin durch die SMCs synthetisiert. Das führt zu einer Gefäßwandverdickung (G Bauriedel et al 1994; MW Majesky 1994; BH Strauss et al. 1994). Bei der Reendothelisierung wird die Läsion durch aktive Migration der Endothelzellen vom Wundrand ausgehend verschlossen (J Phillips-Hughes et al. 1996).

2.5.2. Bedeutung der MMPs bei der Restenose

Die MMPs sind maßgeblich am Pathomechanismus der Restenosierung beteiligt, wie zahlreiche Tierversuche belegen. Nach einer Verletzung der A. carotis communis von ApoE^{-/-}-Mäusen wurde eine vermehrte MMP-Aktivität gemessen (J Zang et al. 2008). In Rattenkarotiden wurde nach einer Ballondilatation ebenfalls ein Anstieg der MT1-MMP-mRNA und der MMP-2-Aktivität registriert (GM Jenkins et al. 1998). Die MMP-Expression ist abhängig vom Schweregrad der Verletzung. Die Implantation von Stents löst zum Beispiel eine stärkere MMP-Aktivität und ECM-Synthese aus als eine Ballondilatation (C Li et al. 2002; LJ Feldman et al. 2001). Knockout-Mäuse, die einen MMP-Inhibitor nicht synthetisieren können (TIMP-1^{-/-}-Mäuse), entwickeln in Folge einer Verletzung der A. femoralis mittels elektrischen Stromflusses signifikant mehr Neointima und wiesen eine stärkere MMP-2-Aktivität auf im Vergleich zu den Wildtypmäusen (HR Lijnen et al. 1999).

MMP-9-KO-Mäuse entwickelten nach einer Gefäßverletzung eine geringere Intimahyperplasie mit Abnahme der SMC-Migration im Vergleich zu den Wildtypmäusen (ZS Galis et al. 2002a; A Cho et al. 2002).

Besonders MMP-2 und -9 sind an der Neointimabildung beteiligt (M Kuzuya et al. 2003; N Zempo et al. 1994; HR Lijnen et al. 1998; KM Southgate et al. 1999), aber auch eine Expression von MMP-1 und -3 konnte nach einer Ballondenudation gemessen werden (M Aoyagi et al. 1998). Die MMPs zersetzen die Basalmembran und die ECM um die glatten Muskelzellen. Das erleichtert deren Migration und Proliferation aus der Media in die Intima. Eine geringe MMP-2-Expression findet auch

im unverletzten Gefäß statt. MMP-9 war in der gesunden Gefäßwand von Kaninchen hingegen nicht nachweisbar (LJ Feldman et al. 2001). Humanes Blut aus dem Koronarsinus enthielt nach einer PTCA einen signifikant erhöhten MMP-2-Gehalt. Patienten, die eine späte Restenose entwickelten, hatten ein signifikant höheres MMP-2-Level als Patienten, die keine Restenose entwickelten (Y Hojo et al. 2002).

Wie groß der Einfluss der MMPs auf das Migrationsverhalten der SMCs ist, wird ebenfalls durch eine Verabreichung von MMP-Inhibitoren nach einer Ballondenudation im Tierversuch mit Ratten ersichtlich. Es kommt zu einer deutlichen Hemmung der Migration mit einer daraus resultierenden Reduktion der Zellzahl in der Intima (MP Bendeck et al. 1994). Trotz der vielversprechenden Tierversuche zeigte die Verwendung von medikamentenbeschichteten Stents, die einen MMP-Inhibitor freisetzen, keine Reduktion der Restenoseentwicklung bei Schweinen und Affen (CM Araujo et al. 2005; HM Van Beusekom et al. 2003; GS Cherr et al. 2002).

Eine weitere Möglichkeit der MMP-Inhibition bietet Doxycyclin. Es gehört zu den Tetracyclinen und hemmt die bakterielle Proteinsynthese (MP Bendeck et al. 2002). Die Tetracycline beeinflussen zahlreiche Funktionen der Säugetierzellen, wie deren Proliferation, Migration, Apoptose und Matrixumbau (JPG Sluijter 2006). Sie hemmen außerdem die MMP-2 und -9 Aktivität. Nach einer Ballondenudation von Rattenkarotiden konnte durch dessen Verabreichung eine Verringerung der SMC-Migration und Replikation erzielt werden (MP Bendeck et al. 2002).

2.5.3. Verletzungsmodelle zur Untersuchung der Restenose

Zur Untersuchung der Restenosierung sind verschiedene Verletzungsmodelle am Versuchstier entwickelt worden. Die Verfahren können in intravaskuläre und perivaskuläre Eingriffe differenziert werden. Bei den intravaskulären Verletzungsmodellen erfolgt die Gefäßwandschädigung von innen heraus und bei den perivaskulären Eingriffen werden die Gefäße von außen verletzt (P Carmeliet et al. 1997).

- **Intravasale Eingriffe:** Ballondenudation, Drahtdenudation, Injektion von chemischen Substanzen (P Carmeliet et al. 1997), Stenting (J Chamberlain et al. 2010)
- **Perivaskuläre Eingriffe:** Stromfluss, Endotoxin, heiße oder kalte Temperaturen, Collar (P Carmeliet et al. 1997), Ligatur (Q Xu 2004), Cuff (K Tanaka et al. 2003), Laser (P Carmeliet 1998)
- **Sonstiges:** Transplantation, End-to-end mikrovaskuläre Anastomosen (P Carmeliet 1998; X Wang et al. 2006)

Drahtdenudation

1993 entwickelt Lindner et al. die Drahtdenudation der A. carotis communis der Maus (V Lindner 1993). In der Literatur wird auch die Drahtdenudation der A. femoralis beschrieben. Bei der Denudation der A. femoralis bilden 90% der operierten Mäuse nach 4 Wochen eine Intimahyperplasie. Vorteil dieses Verfahrens ist, dass die Gefäße beider Extremitäten verletzt werden können (M Roque et al. 2000). Die Denudation der A. carotis communis erfolgt über einen Draht, der in die A. carotis externa und mehrmals unter drehender Bewegung vor und zurück geschoben wird. In der vorliegenden Arbeit wurde der Eingriff über die A. carotis interna vorgenommen (V Lindner et al. 1993). Es wird in der Regel nur eine geringe Neointimabildung von 2-3 Zellschichten induziert (P Carmeliet 1998). Nach drei Wochen ist der Endotheldefekt vollständig von einem neuen Endothel bedeckt (V Lindner et al. 1993).

Andere Verfahren im Überblick

Ein weiteres Verletzungsmodell ist die Gefäßwandschädigung durch einen *perivaskulären Stromfluss*, zum Beispiel der A. femoralis oder A. carotis communis. Es werden sämtliche Zellschichten beschädigt (X Wang et al. 2006). Dabei erfolgt eine Denudation des Endothels mit anschließender Thrombusbildung. Bei der Wundheilungsreaktion werden der Thrombus und das nekrotische Material organisiert. Die Gefäßwand wird von Entzündungszellen infiltriert. Aus dem unverletzten Gefäßabschnitt wandern SMCs in die Neointima ein und es erfolgt die Neubesiedlung des Endothels (P Carmeliet et al. 1997). Bereits nach zwei Wochen ist eine komplette Reendothelisierung sichtbar. Die Verletzung der Gefäßwand mit einem perivaskulären Stromschlag zieht eine starke Neointimabildung nach sich. Nach zwei Wochen besteht die Neointima aus etwa 13 Zellschichten (X Wang et al. 2006).

Es sind verschiedene *Ligaturmodelle* etabliert. So können die A. carotis externa, A. carotis interna und die A. carotis communis nahe der Bifurkation vollständig ligiert

werden. Durch den Gefäßverschluss wird der Blutfluss dauerhaft gestört. Mit diesem einfach durchzuführenden Verletzungsmodell wird kein physiologischer bzw. pathologischer Zustand simuliert. Bei diesem Verletzungsmodell proliferieren glatte Muskelzellen, ohne dass eine mechanische Traumatisierung des Gewebes erfolgte. Es findet eine SMC-reiche Neointimabildung in den folgenden zwei bis vier Wochen nach der Operation statt (Q Xu 2004; X Wang 2006). Bei diesem Verfahren werden das Endothel und die Media nicht verletzt. Eine Thrombusbildung ist aber möglich (Q Xu 2004). Untersuchungen haben ergeben, dass ein verlangsamter Blutfluss nach einer Ballondilatation oder Gefäßtransplantation das Risiko einer Neointimabildung steigert (V Lindner et al. 1993).

Ein weiteres Verletzungsverfahren ist das Setzen eines *Collars* um das Gefäß. Dabei wird der Blutfluss eingeengt, aber nicht komplett unterbunden wie nach einer Gefäßligatur. Das Endothel wird dabei nicht direkt beschädigt. Über den Einengungsgrad wird Einfluss auf das Ausmaß der Neointimabildung genommen (X Wang et al. 2006).

Bei der *Allotransplantation* wird ein Stück Karotis von einem Spendertier in die Karotis des Empfängertieres transplantiert. Beim *Vein Graft Model* erfolgt die Transplantation von einem Venenstück in die Karotis (X Wang et al. 2006; Q Xu 2004). Dieses Modell simuliert zum Beispiel die beim Menschen häufig durchgeführte aortokoronare Bypassoperation. Dabei wird die verengte Koronararterie durch Schaffung eines künstlichen Kollateralkreislaufes mit Hilfe der transplantierten Vena saphena umgangen (Pschyrembel 2002). Die wesentlichen Ursachen für eine Lumeneinengung nach Gefäßtransplantation sind Thrombusbildung, Intimahyperplasie und Atherosklerose (Q Xu 2004). Es gibt verschiedene Techniken beim *Vein Graft Model* der Maus. So kann zum Beispiel ein Stück der Vena cava oder Vena jugularis eines Spendertieres in die A. carotis communis des Empfängers transplantiert werden (X Wang et al. 2006; Q Xu 2004). Bisher galten das Schwein und das Kaninchen für Tierversuche mit Stentimplantation als Goldstandard. Chamberlain et al. ist es gelungen ein Verfahren zu entwickeln, die Maus *in situ* zu stenten. Dabei wird über die A. femoralis der Stent in die Aorta abdominalis eingeführt. Ab dem dritten Tag nach der Stentimplantation sind Entzündungszellen und eine frühe Neointima anzutreffen (J Chamberlain et al. 2010). Ein weiteres Verletzungsmodell ist das Setzen von *Cuffs*. Dabei wird ein Polyethylen-Röhrchen um das Gefäß gelegt (K Tanaka et al. 2003). Es gab auch Versuche, eine Verletzung durch photochemische Substanzen,

Austrocknen der Gefäßwand, Erzeugung von Erfrierungen, Knicken des Gefäßes oder über Verletzung der Nerven der Vasa vasora in der Adventita auszulösen (P Carmeliet et al. 1998).

2.6. Das Immunglobulin CD147 (Syn: EMMPRIN, Basigin)

2.6.1. Allgemeines

CD147 wurde von mehreren Laboren zeitnah entdeckt. In Versuchen mit Kokulturen von humanen Fibroblasten und humanen Tumorzelllinien konnten Biswas et al. nachweisen, dass die Tumorzellen einen Faktor bilden, der die Kollagenasesynthese der Fibroblasten stimuliert (C Biswas et al. 1982; C Biswas et al. 1984). Versuche mit den humanen Lungenkarzinomzellen LX-1 ergaben, dass der entdeckte Faktor auf der Tumoroberfläche lokalisiert ist. Wegen der Fähigkeit zur Anregung der MMP-Bildung wurde der neu entdeckte Faktor auch als „tumor cell-derived collagenase stimulatory factor“ (TCSF) benannt (EM Ellis et al. 1989). Miyauchi et al. entdeckten ebenfalls ein neues Glykoprotein, das zur Gruppe der Immunglobulinsuperfamilie gehört und bezeichneten es als Basigin. Basigin steht für „basic immunoglobulin superfamily“. Sie wiesen Basigin in Mäuseembryonen, aber auch in verschiedenen Organen von adulten Mäusen nach (T Miyauchi et al. 1990). TCSF wurde von Biswas et al. als EMMPRIN deklariert. EMMPRIN steht für „extracellular matrix metalloproteinase inducer“. Durch eine Strukturanalyse konnte gezeigt werden, dass es zur Immunglobulinsuperfamilie gehört (C Biswas et al. 1995). Schließlich erhielt EMMPRIN die Bezeichnung CD147 (C Koch et al. 1999). Für ein besseres Verständnis wird in der Arbeit die einheitliche Bezeichnung CD147 verwendet.

Inzwischen wurde CD147 in zahlreichen Organismen nachgewiesen. Dazu gehören zum Beispiel OX47 der Ratte, Basigin oder gp42 der Maus, HT7 oder Neurothelin der Hühner, hBasigin und M6 des Menschen (J Jian-Li et al. 2007; EE Gabison et al. 2005; S Fossum et al. 1991).

2.6.2. Aufbau

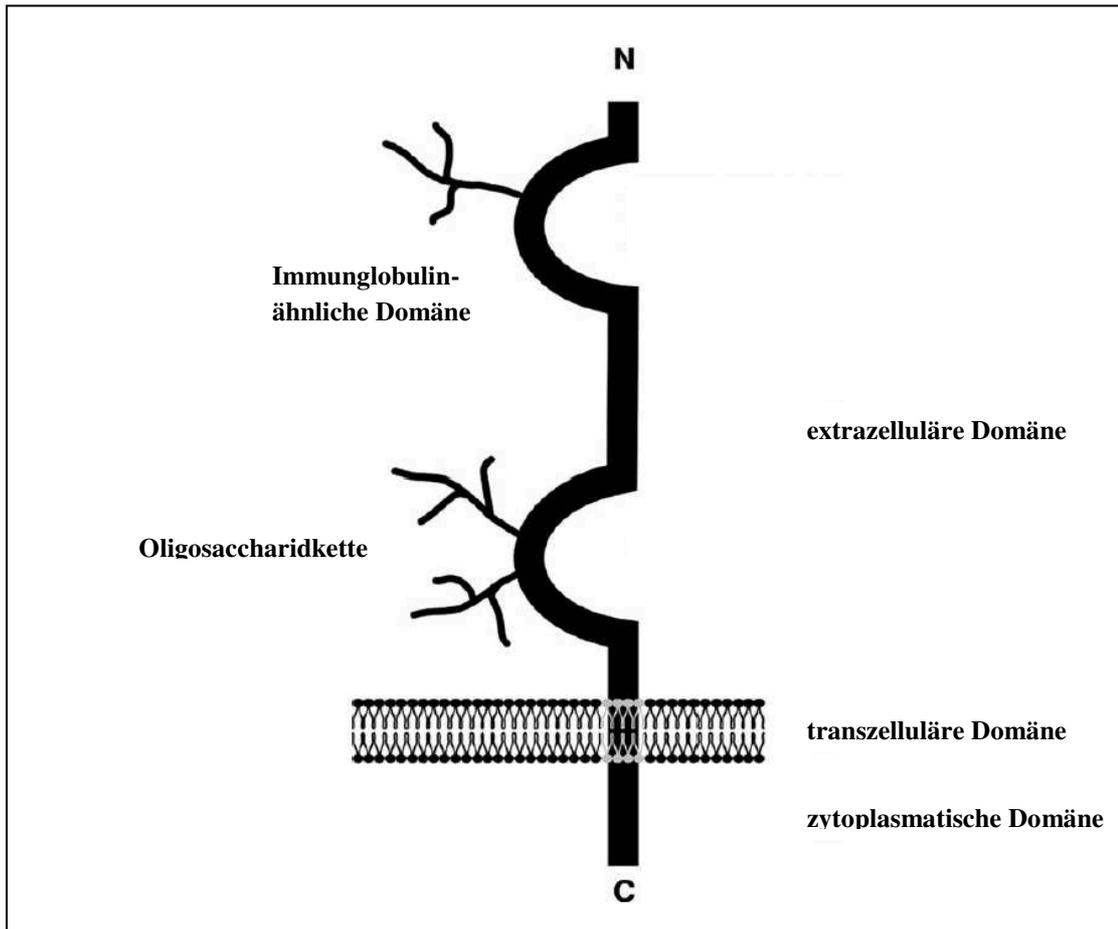


Abb.11: Aufbau von CD147.

Das CD147-Molekül setzt sich aus einer extrazellulären, einer transzellulären und einer zytoplasmatischen Domäne zusammen. In der extrazellulären Domäne sind zwei immunglobulinähnliche Domänen vorhanden. An der membrannahen Domäne sind zwei und an der distalen Domäne ist eine Oligosaccharidkette gebunden.

(modifiziert nach Muramatsu aus EE Gabison et al. 2005)

Das Molekulargewicht von CD147 schwankt zwischen 43 kDa und 66 kDa (T Miyauchi et al. 1990). Der reine Proteinanteil hat eine Größe von 28 kDa (T Muramatsu et al. 2003). CD147 weist in verschiedenen Geweben ein unterschiedliches Gewicht auf. Die Gewichtsunterschiede lassen sich durch eine unterschiedlich starke Glykosylierung erklären. Es wird vermutet, dass sich CD147 in seiner Heterogenität nicht nur in der Art der Glykosylierung unterscheidet, sondern auch in der N-terminalen Sequenz (T Kanekura et al. 1991). Die Analyse der menschlichen komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA) ergab, dass CD147 in die Gruppe der Immunoglobulinsuperfamilie eingeordnet werden kann (EE Gabison et al. 2005).

Das hochglykosylierte Transmembranprotein gehört zur Familie der „cell adhesion molecules“ (CAMs) (J Jiang-Li et al 2007).

Das Molekül besteht aus einer extrazellulären, transmembranären und einer zytoplasmatischen Domäne (T Muramatsu et al. 2003). Am stärksten ist die transmembranäre Domäne zwischen den Spezies konserviert und am geringsten die extrazelluläre Domäne (BH Reed et al. 2004; T Miyauchi et al. 1991; H Seulberger et al. 1992). 24 Aminosäuren bzw. 96% der transmembranären Domäne sind zwischen Mensch, Maus und Huhn identisch (EE Gabison et al. 2005; J Jiang-Li et al. 2007; T Miyauchi et al. 1991). Untersuchungen haben gezeigt, dass die intrazelluläre Domäne zwischen den Spezies ebenfalls hoch konserviert ist. Das deutet auf eine wichtige Funktion dieser Region hin (EE Gabison et al. 2005; VL Schuster et al. 1996).

Im extrazellulären Anteil befinden sich zwei Immunglobulin (Ig)-Domänen. An der membranahen Ig-Domäne sind zwei Oligosaccharidketten und an der distalen Ig-Domäne ist eine Oligosaccharidkette gebunden (T Muramatsu et al. 2003). Die Ig-Domäne, die am C-terminalen Ende angrenzt, hat eine starke Ähnlichkeit mit der β -Kette und der Ig V-Domäne vom „major histocompatibility complex“ II-Antigen (MHC) (T Miyauchi et al. 1990). Die unterschiedliche Glykosylierung ist abhängig von der Herkunft des CD147. Sie beeinflusst die MMP-Aktivierung (EE Gabison et al. 2005). Denn nur das hochglykosylierte CD147 kann sich auf der Zelloberfläche zu Aggregaten zusammenlegen und die MMP-Bildung der Nachbarzellen induzieren (W Tang et al. 2004).

In der transmembranären Domäne ist bei allen CD147-Isoformen Glutaminsäure enthalten (L Schuster et al. 1996; S Fossum et al. 1991; T Muramatsu et al. 2003). In Proteinabschnitten, die nur zur Verankerung in der Zellmembran dienen, kommen geladene Reste üblicherweise nicht vor. Das wäre energetisch ungünstig. Der geladene Rest in der transmembranären Domäne weist darauf hin, dass CD147 mit anderen Proteinen Komplexe bildet und dadurch einen energetisch ausgeglichenen Zustand erreicht (V Yurchenko et al. 2006).

Die N-terminale Ig-Domäne von CD147 bildet mit anderen Plasmamembran-Molekülen cis-abhängige Homo-Oligomere. Bei der MMP-Induktion durch CD147 kommt es zu einer homophilen „Counterreceptor“-Bindung. Dabei fungiert CD147 sowohl als Rezeptor als auch als Ligand (EE Gabison 2005; S Yoshida et al. 2000; J

Sun et al. 2001). Die Arbeitsgruppe von Yoshida konnte mit Hilfe von Mutationsversuchen zeigen, dass CD147 mit einer geschädigten N-terminalen Ig-Domäne keine Oligomere bilden kann. Lag die Mutation in der C-terminalen Ig-Domäne, hatte das keinen Effekt auf die Oligomerbildung in der Plasmamembran (S Yoshida et al. 2000).

Die zweite Ig-Domäne wird für die Bindung mit Caveolin-1 benötigt (EE Gabison et al. 2005; S Yoshida 2000; J Sun et al. 2001). Caveolin-1 ist ein integriertes Membranprotein. Es ist beteiligt am extra- und intrazellulären Lipidtransport. Caveolin-1 ist besonders an der Zelloberfläche der Caveolen lokalisiert. Caveolen sind Einstülpungen der Zellmembran (P Liu et al. 2002). Die Bildung eines Caveolin-1-CD147-Komplexes hat zur Folge, dass sich weniger CD147-Moleküle auf der Zelloberfläche ansammeln können. Als Folge steht weniger CD147 zur Verfügung und die MMP-Induktion nimmt ab (W Tang et al. 2004).

CD147 geht Bindungen mit den Integrinen $\alpha_3\beta_1$ und $\alpha_6\beta_1$ ein, aber nicht mit $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_5\beta_1$ (F Berdichevski et al. 1997). Integrine sind Transmembranproteine, die von allen kernhaltigen Säugetierzellen exprimiert werden. Sie haben wichtige Funktionen bei der Zell-Matrix-Adhäsion und Zell-Zell-Interaktion. Integrine sind Heterodimäre, bestehend aus einer α - und β -Untereinheit. Die Integrine $\alpha_3\beta_1$ und $\alpha_6\beta_1$ stellen wichtige Laminin-Rezeptoren dar. Laminin kommt besonders in der Basalmembran vor. $\alpha_3\beta_1$ wird besonders von Niere, Lunge, Haut und $\alpha_6\beta_1$ von Makrophagen und Thrombozyten exprimiert (CA Lowell et al. 2012; KT Iacono et al. 2007). Unsere Arbeitsgruppe entdeckte mit Hilfe von verschiedenen *in vitro* Versuchen Glycoprotein VI (GPVI) der Plättchen als neuen CD147-Rezeptor (P Seizer et al. 2009).

Bei der CD147-CD147-Bindung ist besonders die erste Immunoglobulin-Domäne der extrazellulären Domäne beteiligt. Durch die Zugabe von anti-CD147-Antikörpern (anti-CD147-AK) oder eines CD147-Fc Fusionsprotein, wird die CD147-CD147-Bindung gestört. Die homophile CD147-Interaktion ist wichtig für die Stimulierung der MMP-Sekretion (J Sun et al. 2001; V Yurchenko et al. 2006). Die extrazelluläre Domäne kann auch eine Bindung mit MMPs eingehen (V Yurchenko et al. 2006). Untersuchungen haben gezeigt, dass CD147 auf der Oberfläche von Tumorzellen mit MMP-1 Komplexe bildet. Die CD147-MMP-1-Komplexe fördern vermutlich die Tumorausbreitung (H Guo et al. 2000).

2.6.3. Funktionen

CD147 spielt bei physiologischen und pathologischen Abläufen eine Rolle (EE Gabison et al. 2005). Versuche mit der CD147^{-/-}-Maus zeigten den Einfluss auf die Fortpflanzung und das Nervensystem (T Igakura et al. 1998; K Naruhashi al. 1997; QW Fan et al. 1998). Auch beim Menschen konnte eine Beteiligung an der Reproduktion festgestellt werden. Zum Zeitpunkt der Geburt wird in der Plazenta und den fetalen Eihäuten CD147 gebildet. Durch die Induktion der MMP-Bildung werden Blasensprung und Plazentaablösung nach der Geburt erleichtert (W Li et al. 2004). Noguchi et al. bewiesen eine menstruationszyklusabhängige Expression von CD147 im Endometrium (W Li et al. 2004; Y Noguchi et al. 2003). Als CyPA-Rezeptor löst es eine CyPA-vermittelte Chemotaxis von Entzündungszellen aus (V Yurchenko et al. 2002; Yurchenko et al. 2006). Es ist ebenfalls an einer Expression des Monocarboxylat-Transporters (MCT) zur Zelloberfläche involviert (P Kirk et al. 2000). CD147 spielt auch eine große Rolle bei der Tumorentwicklung. Durch die Induktion der MMP-Expression und deren Abbau der ECM wird die Metastasierung erleichtert (C Biswas et al. 1995; C Biswas 1984, C Biswas 1982). Es ist außerdem eine Beteiligung an der rheumatoiden Arthritis (T Tomita et al. 2002), Atherosklerose (C Haug et al. 2004; YW Yoon et al. 2005), dilatativen Kardiomyopathie (FG Spinale et al. 2000), Hepatitis C (NA Shackel et al. 2002) und an der Alzheimer-Erkrankung (S Zhou et al. 2005) festgestellt worden. Ebenso beeinflusst CD147 die Reifung der T-Lymphozyten im Thymus (D Harrison et al. 2003). Viele Funktionen ergeben sich durch die Stimulierung der MMP-Bildung (R Li et al. 2001; S Caudroy et al. 2002). Im Kapitel 2.3.4. werden die Funktionen der MMPs ausführlicher erläutert.

Die CD147^{-/-}-Maus

Für die Untersuchung des Einflusses von CD147 auf den Organismus entwickelte die Arbeitsgruppe von Igakura die Bsg^{-/-}-Maus. Für eine einheitliche Bezeichnung wird die Knockout-Maus in der vorliegenden Arbeit als CD147^{-/-}-Maus bezeichnet. Die Vermehrung stellte sich als sehr schwierig heraus, eine Zucht war nur durch Verpaarung von heterozygoten Mäusen (CD147^{+/-}) möglich. Viele Embryonen starben bereits vor der Plazentaimplantation. Von den geborenen Tieren verendete wiederum die Hälfte im ersten Lebensmonat. Die überlebenden Tiere hatten ein geringeres Körpergewicht als die Wildtypmäuse und waren steril. Nur 3,5% des Nachwuchses überlebte zwei Monate (T Igakura et al. 1998). Versuche mit den CD147^{-/-}-Mäusen

zeigten neben der Beteiligung von CD147 an der Fortpflanzung auch einen Einfluss auf das Nervensystem und Sehvermögen (K Naruhashi et al. 1997).

Die Arbeitsgruppe Igakura et al. untersuchte den **Einfluss von CD147 auf die Reproduktion** mit Hilfe von CD147^{-/-}-Mäusen. Bis zur Implantation in die Plazenta scheinen sich die Mäuseembryonen der KO-Mäuse normal zu entwickeln. Zum Implantationszeitpunkt sterben viele der Embryonen ab. CD147 scheint für die Zellerkennung während der Einnistung des Embryos in das Endometrium eine wichtige Funktion zu haben. In dieser Entwicklungsphase findet bei den Wildtypmäusen eine verstärkte Bildung von CD147 im Trophoektoderm und im Endometrium statt (T Igakura et al. 1998). CD147 wird besonders während der Embryogenese kurz nach der Implantation vom embryonalen Endoderm und etwas schwächer vom embryonalen Ektoderm gebildet (QW Fan et al. 1998). Von den lebend geborenen CD147^{-/-}-Mäusen starb wiederum die Hälfte im ersten Lebensmonat an einer interstitiellen Pneumonie. Die geschlechtsreifen Tiere sind steril. Die Männchen zeigen eine gestörte Spermatogenese. Bei den Weibchen kommt es vermutlich durch die fehlende Implantation des Embryos zur Sterilität. Eine morphologische Veränderung der Fortpflanzungsorgane konnte nicht beobachtet werden (T Igakura et al. 1998). Bei den Wildtypmäusen wird CD147 von Spermien, Leydig- und Sertolizellen des Hodens und Nebenhodens gebildet (DK Saxena et al. 2002; M Nakai et al. 2006). Die Oozyten der CD147^{-/-}-Mäusen hatten gegenüber den Kontrollmäusen eine geringere Befruchtungsfähigkeit (N Kuno et al. 1998). Die CD147mRNA war bei Wildtypmäusen während der gesamten Embryonalentwicklung nachweisbar, vom Einzellstadium bis zur Blastozyste (L Chen et al. 2007; K. Hori et al. 2000; QW Fan et al. 1998).

Naruhashi untersuchte den **Einfluss von CD147 auf das Nervensystem** und führte Tests zur Gedächtnis- und Lernleistung durch. Bei diesen Versuchen schnitten die Knockout-Mäuse im „Y-maze“ (Labyrinth) und im Wassersuchtest schlechter ab als die Wildtypmäuse, was auf ein schlechteres Lern- und Erinnerungsvermögen schließen lässt. Sie reagierten auch empfindlicher auf Stromschocks und konnten sich schlechter an eine neue Umgebung anpassen. Diese Versuche deuten auf eine wichtige Funktion des CD147 hinsichtlich Lern- und Erinnerungsvermögen hin (K Naruhashi et al. 1997). Erwachsene Tiere hatten in den verschiedenen Hirnarealen eine

unterschiedlich starke Expression. Insgesamt ist eine starke Bildung von CD147 im zentralen Nervensystem der Maus festgestellt worden (QW Fan et al. 1998).

Die CD147^{-/-}-Mäuse benötigten mehr Zeit, bis sie eine dunkle Kammer betraten als Wildtypmäuse. Da Mäuse als Beutetier instinktiv dunkle Regionen aufsuchen, weist dieses Verhalten auf eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber dem Licht hin. Als Ursache wird das Fehlen von CD147 in der Retina angesehen. Wildtypmäuse haben hingegen einen hohen Gehalt von CD147 in der Retina (K Naruhashi et al. 1997; NJ Philp et al. 2003). Bis zur achten Woche erscheint die Retina der CD147^{-/-}-Mäusen histologisch unauffällig. Mit 41 Wochen sind die Stäbchen und Zapfen fast vollständig zerstört. Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben, dass bei den CD147^{-/-}-Mäusen der Verlust des Sehvermögens im jungen Alter beginnt (K Hori et al. 2000). Mit Hilfe der Immunhistochemie konnte CD147 auf der Zelloberfläche der Endothelzellen, die Bestandteil der Bluthirnschranke sind, von CD147^{+/-}-Mäusen nachgewiesen werden. Die Untersuchung der CD147^{-/-}-Mäuse lieferte keinen Hinweis, dass es beim Fehlen zu einer Beeinträchtigung der Funktion kommt (T Igakura et al. 1996).

Tumorerkrankung

CD147 wird von Tumorzellen gebildet. Durch die sich daran anschließende vermehrte Expression von MMPs der benachbarten Fibroblasten wird die umliegende ECM gespalten. Das erleichtert die Tumorausbreitung und Metastasierung (C Biswas et al. 1995; C Biswas 1984; C Biswas 1982; H Kataoka et al. 1993). Immunhistochemische Untersuchungen ergaben eine deutliche Anreicherung von CD147 in Bereichen der Tumorphiliferation. CD147 wurde unter anderem auf Tumorzellen von Brust- und Lungentumoren nachgewiesen und auch auf tumornahen Stromazellen. Es ist davon auszugehen, dass CD147 mit Hilfe von besonderen Rezeptoren auf den Stromazellen bindet (S Caudroy et al. 1999). Durch eine CD147-CD147-Bindung benachbarter Zellen wird im Tumorgewebe die MMP-Bildung durch Fibroblasten, Endothelzellen und Tumorzellen gefördert (L Yan et al. 2005; S Caudroy et al. 2002). Bei der Untersuchung von Patienten mit einem malignen Melanom konnte belegt werden, dass beim Auftreten von Metastasen mehr CD147 gebildet wurde, als bei Patienten ohne Metastasen. Die Höhe des gebildeten CD147 beeinflusste direkt die Höhe der MMP-Expression durch Fibroblasten (T Kanekura et al. 2002). Sameshima et al. kultivierten humane multifforme Glioblastomzellen aus dem menschlichen Gehirn zusammen mit

Fibroblasten. Sie konnten bei diesen Versuchen beobachten, dass das CD147 der Tumorzellen die Bildung, aber auch die Aktivierung von pro-MMP-2 durch die Fibroblasten bewirkt. In Gliomen hat eine hohe MMP-2-Konzentration einen großen Einfluss auf die Tumorprogression (T Sameshima et al. 2000).

Kardiovaskuläre Erkrankungen

CD147 ist ebenfalls am Pathomechanismus der Atherosklerose beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass oxLDL die CD147- und MMP-Synthese fördert (C Haug et al. 2004). Patienten mit einem akuten Herzinfarkt zeigten eine höhere Expression von CD147 auf der Oberfläche von Monozyten im Vergleich zu Patienten mit einer chronisch stabilen Angina. Die CD147-Expression ging einher mit einer gesteigerten Bildung von MT1-MMP auf den Monozyten und einer erhöhten MMP-9-Aktivität im Plasma. MT1-MMP ist beteiligt an der CD147-vermittelten MMP-2-Aktivierung der benachbarten glatten Muskelzellen. Die MMP-Aktivierung könnte wiederum eine Destabilisierung der Plaques fördern (R Schmidt et al. 2006).

Die Schaumzellbildung aus Makrophagen beeinflusst den Verlauf der Atherosklerose (P Shashkin et al. 2005). Moreno et al. konnte aufzeigen, dass Makrophagen ein Marker für instabile atherosklerotische Plaques sind (PR Moreno et al. 1994). CD147 wurde in humanen atherosklerotischen Plaques angrenzend zu Makrophageninfiltraten nachgewiesen (YW Yoon et al. 2005). Zu einem Anstieg von CD147 kommt es ebenfalls während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen. Durch Stimulation der MMPs und deren Abbau der ECM wird die Einwanderung der Monozyten erleichtert (JF Zhang et al. 2007). Der Einfluss von CD147 und CyPA an der Schaumzellbildung ist an der Differenzierung von CD34⁺-Progenitorzellen zu Schaumzellen während der Inkubation mit Thrombozyten untersucht worden. Die verstärkte Expression von CD147, einhergehend mit einer MT1-MMP- und MMP-9-Bildung und die Freisetzung von CyPA während der Differenzierung von CD34⁺-Progenitorzellen zu Schaumzellen, könnte hinweisend auf deren Beteiligung an der Plaqueruptur sein. Eine Zugabe des CyPA-Inhibitor NIM811 führte zu einer verminderten MMP-9-Sekretion während der Schaumzellbildung (P Seizer et al. 2010).

Seizer et al. untersuchten, ob CD147 und dessen Ligand CyPA als diagnostischer Marker für entzündliche Kardiomyopathien geeignet sind. Untersuchungen von 102 humanen endomyokardialen Biopsieproben ergaben eine geringfügig signifikant

höhere CD147-Expression in Proben nicht entzündlicher Kardiomyopathie gegenüber Proben mit normalem histopathologischen Herzbefund. Die höchste Expression wurde in entzündlichen Kardiomyopathien festgestellt. CD147 könnte als Marker für myokardiale Umbauvorgänge in Frage kommen (P Seizer et al. 2013).

In Vorarbeiten wurde der Einfluss von CD147 am Verlauf des myokardialen Infarktes mit Hilfe des myokardialen Ischämie- und Reperfusionssmodel der Maus untersucht. Die Untersuchungen zeigten, dass CD147 als Therapieansatz für den Erhalt einer besseren myokardialen Funktion nach einem myokardialen Ischämie- und Reperfusionsschaden möglich sein könnte. 24 Stunden und 7 Tage nach dem gesetzten myokardialen Ischämie- und Reperfusionsschaden war die Infarktgröße von CD147^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu CD147^{+/+}-Mäusen reduziert. Die anti-CD147-AK therapierten C57BL/6-Mäusen entwickelten ebenfalls kleinere Infarkte als nach Behandlung mit dem Kontrollantikörper (P Seizer et al. 2011).

Thrombozyten spielen eine große Rolle an der Entwicklung der Atherosklerose. Sie bilden nicht nur den Thrombus nach einer Plaqueruptur, sondern beeinflussen zum Beispiel auch die Schaumzellbildung (M Gawaz et al. 2005; K Daub 2007; K Daub 2006). CD147 wird auch auf Thrombozyten exprimiert. Durch eine Thrombozytenstimulation konnte eine verstärkte CD147-Expression ausgelöst werden. Eine CD147-CD147-Interaktion der Thrombozyten führt zu einer Thrombozytenaktivierung. Die CD147 vermittelte Thrombozyten-Monozyten-Interaktion wirkt durch eine gesteigerte MMP-Aktivierung und Zytokinsekretion entzündungsfördernd (R Schmidt et al. 2008).

Bei der dilatativen Kardiomyopathie ist ebenfalls vermehrt CD147 mit einer gesteigerten MMP-Aktivität im linken Ventrikel zu beobachten (FG Spinale et al. 2000).

2.7. Liganden von CD147

CD147 hat zahlreiche Bindungspartner, dazu gehören CD147 selbst (J Sun et al. 2001), „Monocarboxylic acid transmitters“ (MCTs) (P Kirk et al. 2000), CD98 (V Yurchenko et al. 2006), Integrine (F Berditchewski et al. 1997), MMPs (H Guo et al. 2000), Caveolin-1 (W Tang et al. 2004), Cyclophilin A (CyPA) (V Yurchenko et al. 2002), Cyclophilin B (CyPB) (V Yurchenko et al. 2001) und Cyclophilin 60 (CyP60) (T Pushkarsky et al. 2005).

CyPA als Ligand für CD147

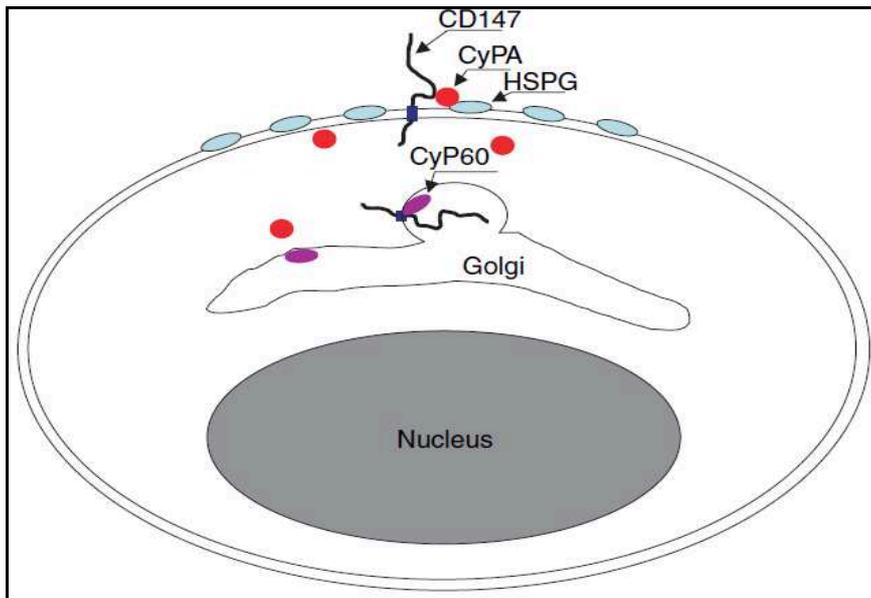


Abb.12: Interaktion zwischen Cyclophilin und CD147.

CD147 wird mit Hilfe des Golgi-Apparates zur Zelloberfläche transportiert. Im Golgi-Apparat kommt es zur Bindung zwischen Cyp60 und Pro211. Pro211 ist ein Bestandteil von CD147 und liegt zwischen der transmembranären und extramembranären Domäne. CyPA wird ebenfalls vom Golgi-Apparat ausgeschieden. Extrazellulär interagiert CyPA mit Heparansulfatproteoglykan (HSPG) der Zelloberfläche und Pro180 der extrazellulären Domäne von CD147. (aus V Yurchenko et al. 2006)

Wie in der Abbildung 12 schematisch dargestellt, ist CD147 ein Zelloberflächenrezeptor für CyPA auf dessen Zielzellen. Durch die Bindung wird die chemotaktische Wirkung von CyPA auf die Entzündungszellen ausgelöst. Die Bindung vom extrazellulären CyPA mit der Zielzelle wird durch CD147 und HSPG vermittelt. Prolin 180 und Glycin 181 aus der extrazellulären Domäne von CD147 sind wichtig für die Chemotaxis und Signalübertragung von CyPA. Die Signalübertragung ist Rotamaseabhängig (V Yurchenko et al. 2002). Es gibt Hinweise, dass Cyclophilin den intrazellulären Transport von CD147 zur Zelloberfläche beeinflusst. CyPA bindet an die prolinhaltige transmembranäre Domäne von CD147. CD147 wird mit Hilfe des Golgi-Apparates zur Zelloberfläche transportiert. Im Golgi-Apparat kommt es zur Bindung zwischen Cyp60 und Pro211. Cyp60 dient als Chaperon für CD147 und begleitet es beim intrazellulären Transport vom Golgi-Apparat zur Zelloberfläche (T Pushkarsky et al. 2005; V Yurchenko et al. 2006; V Yurchenko et al. 2002).

2.8. Cyclophilin A (CyPA)

2.8.1. Allgemeines

Die Cyclophiline gehören zur Familie der Immunophiline (A Galat 1993). Sie sind in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Wirbeltieren nachweisbar (SF Göthel et al. 1999). Formen des Cyclophilins sind CyPA, CyPB, CyPC, CyPD und CyPS (A Galat 1993). CyPA ist ein ubiquitär vorkommendes, intrazelluläres Protein (V Yurchenko et al. 2006), das im Zytosol von vielen Zellen nachweisbar ist mit einem Molekulargewicht von 18 kDa (A Galat 1993). Ryffel untersuchte die CyP-Konzentration in vielen menschlichen Organen und Geweben, wie Herz, Haut, Lunge, Niere, Fettgewebe und Pankreas. In den Geweben lag der durchschnittliche CyP-Gehalt bei 1 µg/mg Protein. In allen untersuchten Geweben konnte ebenfalls die mRNA von Cyclophilin gefunden werden. Das weist darauf hin, dass die CyP-Bildung lokal im Gewebe erfolgt. Im Blut sind die Zellen Hauptträger des Cyclophilins. Das Plasma weist nur eine geringe Konzentration auf (B Ryffel et al. 1991).

Die Entdeckung von Cyclosporin A (CsA) 1972 im Labor von Sandoz in der Schweiz trug mit seiner immunsuppressiven Wirkung erheblich zu einer verbesserten Überlebensrate nach einer Organtransplantation bei. Das 1202 Da große Molekül ist ein zyklisches Endecapeptid (D Tedesco et al. 2012). CsA weist eine hohe Bindungsaffinität zu CyPA auf. CyPA ist eine intrazelluläre PPIase mit einer hoch konservierten, katalytischen Domäne, die die endgültige Proteinfaltung katalysiert. CsA bindet an die katalytische Domäne von CyPA und bildet einen Komplex (G Fischer et al. 2010). Der CsA-CyPA-Komplex wirkt hemmend auf Calcineurin, was eine Immunsuppression zur Folge hat. Calcineurin ist eine Kalzium/Kalmodulin-abhängige Serin/Threonin Phosphatase. Aktiviertes Calcineurin führt durch eine Dephosphorylierung des „nuclear factor of activated T-lymphocytes“ (NFAT) zu dessen Aktivierung und Einwanderung aus dem Zytoplasma in den Zellkern. Dieser Transkriptionsfaktor bewirkt eine IL-2-Synthese, die bei der Immunantwort der T-Lymphozyten eine herausragende Funktion besitzt. Die Verabreichung von CsA hat zahlreiche Nebenwirkungen wie Hypertension, Schädigung der Nieren und Hyperlipidämie (D Tedesco et al. 2012).

2.8.2. Funktionen

CyPA ist eine intrazelluläre PPIase (Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase) mit einer hoch konservierten, katalytischen Domäne. Als Chaperone binden die Cyclophiline an Proteine und nehmen Einfluss auf deren endgültige Faltung (G Fischer et al. 2010; A Galat 1993). Versuche mit Fruchtfliegen ergaben, dass Cyclophilin am intrazellulären Proteintransport beteiligt ist (NJ Colley et al. 1991; EK Baker et al. 1994). CyPA ist ein intrazellulärer Rezeptor für das Immunsuppressivum Cyclosporin A (SF Göthel et al. 1999).

Das intrazelluläre CyPA wird bei Entzündungen von Zellen in den Extrazellularraum sezerniert. Extrazellulär hat es eine chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, T-Lymphozyten und Makrophagen (V Yurchenko et al. 2002; T Muramatsu et al. 2003; Y Yang et al. 2008; Q Xu et al. 1992). Durch die Bindung vom extrazellulären CyPA mit dem Zelloberflächenrezeptor CD147 der Zielzelle wird die chemotaktische Wirkung ausgelöst (V Yurchenko et al. 2002).

CyPA und CyPB sind sich in ihrer Molekülstruktur sehr ähnlich, so dass CD147 für beide als Rezeptor in Frage kommt (V Mikol et al. 1994). Zellkulturversuche mit „Chinese hamster ovary“ (CHO)-Zellen scheinen diese Hypothese zu bestätigen (V Yurchenko et al. 2001). CyPB, es wird auch als Cyclophilin 2 (CPH2) bezeichnet, ist auch im Extrazellularraum lokalisiert (G Spik et al. 1991; KW Hasel et al. 1991). Im Gegensatz zum CyPA kommt es nicht im Zytoplasma, sondern im endoplasmatischen Retikulum vor (KW Hasel et al. 1991). CyPB ist ebenfalls an entzündlichen Prozessen beteiligt. Es hat eine chemotaktische Wirkung auf humane, neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten (F De Ceuninck et al. 2003).

Viele Untersuchungen deuten darauf hin, dass CyPA entzündungsfördernd ist (K Arora et al. 2005). CyPA ist außerdem auch am Krankheitsgeschehen vom Herzinfarkt (P Seizer et al. 2011), von HIV-1 (ACS Saphire et al. 1999), der Atherosklerose (ZG Jin et al. 2004), dem abdominalen Aortenaneurysma (K Satoh et al. 2009) und anderen Gefäßerkrankungen beteiligt (ZG Jin et al. 2000; K Satoh et al. 2008). Serumproben von Sepsispatienten machten die Beteiligung von CyPA an entzündlichen Erkrankungen deutlich. Sepsispatienten hatten eine signifikant höhere Cyclophilin-Aktivität in den Serumproben als nicht erkrankte Probanden. Mit der Höhe der Cyclophilin-Aktivität stieg auch deren Mortalitätsrate (I Tegeder et al. 1997). Die

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine entzündliche Gelenkerkrankung, bei der polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs) in der Synovia vermutlich durch ihre knorpelschädigenden Enzyme zum Fortschreiten der Erkrankung beitragen. Die analysierte Synovia aus Kniepunktaten von RA-Patienten hatte erhöhte CyPA-Werte. Damit konnten zum einen das extrazelluläre Vorkommen und zum anderen die chemotaktische Wirkung auf Entzündungszellen direkt am Menschen bestätigt werden (A Billich et al. 1997). Biopsieproben von Patientenherzen, die an einem akuten Herzinfarkt verstarben, konnten eine gesteigerte CyPA- und CD147-Expression im geschädigten Gewebe aufzeigen (P Seizer et al. 2011). HIV-1-Viren haben auf ihrer Oberfläche CyPA. Dieses benötigen die Viren, um in die Zielzellen einzudringen (ACS Saphire et al. 1999). In den Plaques von ApoE^{-/-}-Mäusen wurde eine hohe Expression von CyPA experimentell ermittelt (ZG Jin et al. 2004). Tierversuche demonstrierten den Einfluss von CyPA auf die Bildung des abdominalen Aortenaneurysmas (AAA). CyPA verursacht eine Aktivierung von MT1-MMP und ein vermehrtes Einwandern von CD45⁺-Entzündungszellen. MT1-MMP aktiviert wiederum MMP-2. MMP-2 spaltet Kollagen und Elastin der Aortenwand, was schließlich zum Stabilitätsverlust führt. Das CyPA stammt aus den Zellen der Gefäßwand, besonders von den „vascular smooth muscle cells“ (VSMCs) (K Satoh et al. 2009). In Tierversuchen konnte belegt werden, dass CyPA ein durch oxidativen Stress sekretierter Faktor ist (D Harrison et al. 2003; ZG Jin et al. 2000). CyPA stimuliert die Proliferation und Migration von VSMCs und die Migration von Entzündungszellen, dadurch spielt es bei Gefäßstenosierung in Folge einer Verletzung eine wichtige Rolle (K Satoh et al. 2008; ZG Jin et al. 2000).

Vorarbeiten zeigen, dass CyPA die Einwanderung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten in das Infarktgewebe nach einem myokardialen Ischämie- und Reperfusionsschaden fördert. Bei CyPA^{-/-}-Mäusen konnte gegenüber CyPA^{+/+}-Mäusen eine kleinere Infarktgröße ermittelt werden. Die geringere Infarktgröße ging mit einer reduzierten Anzahl von Monozyten und neutrophilen Granulozyten 24 Stunden und einer verbesserten systolischen Funktion 7 Tage nach dem Eingriff einher (P Seizer et al. 2011).

Bei einer virusinduzierten Myokarditis wirkt CyPA chemotaktisch auf Makrophagen und T-Zellen (P Seizer et al. 2012).

In nicht entzündlichen Kardiomyopathien gab es keinen Anstieg der CyPA-Expression. Eine hohe CyPA-Expression wurde nur in entzündlichen

Kardiomyopathien gemessen, assoziiert mit einer Leukozyteninfiltration. Die vielversprechenden Ergebnisse zeigen, dass CyPA als spezifischer Marker für entzündliche Kardiomyopathien geeignet sein könnte (P Seizer et al. 2013).

Während der Differenzierung von CD34⁺-Progenitorzellen zu Makrophagen wird im Zellkulturüberstand eine Zunahme von freigesetzten CyPA ermittelt (P Seizer et al. 2010).

In vitro sekretieren kardiale Rattenmyozyten nach Hypoxie und anschließender Reoxygenierung CyPA und exprimieren auf ihrer Oberfläche CD147. Vermutlich dient CyPA als Schutz vor Apoptose durch oxidativen Stress (Y Seko et al. 2004). ApoE^{-/-}Ppia^{-/-}-Mäuse (CypA-KO-Mäuse) entwickeln kleinere atherosklerotische Läsionen als ApoE^{-/-}-Mäuse nach 16 Wochen atherogener Diät, verbunden mit weniger Makrophagen in den Plaques und einen geringeren LDL-Gehalt in der Aortenwand (P Nigro et al. 2011).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist, durch eine antikörperbasierte Blockade von CD147 bzw. durch Verabreichung von NIM811, einem CyPA-Inhibitor, eine Verringerung der Neointimabildung bei Mäusen nach einer Drahtdenudation der A. carotis communis herbeizuführen. NIM811 ist wie Cyclosporin A (CsA) ein Cyclophilin A (CyPA)-Inhibitor. Der CyPA-NIM811-Komplex ist im Gegensatz zu CsA nicht immunsuppressiv (B Rosenwirth et al. 1994; S Ma et al. 2006). In der Arbeitsgruppe ist die Drahtdenudation ein etabliertes Verfahren zur Induktion einer Neointimabildung. In der Studie sollen neue Erkenntnisse über den Einfluss von CD147 und CyPA auf die Neointimabildung gewonnen werden. Diese Grundlagenforschung dient der Entwicklung neuer Therapieansätze zur Prophylaxe einer Restenosierung nach Ballondilatation oder Stentimplantation beim Menschen. Eine Angioplastie ist ein häufig eingesetztes Verfahren zur Herstellung einer adäquaten Gewebespersion bei einer Gefäßstenose. Ein langfristiger Behandlungserfolg wird oft durch eine Restenosierung verhindert (M Ferrell et al. 1992). Tierversuche konnten eine Beteiligung der MMPs und von CyPA am Pathomechanismus der Gefäßstenosierung zeigen (J Zang et al. 2008; GM Jenkins et al. 1998; K Satoh et al. 2008). Nach einer Denudation der Gefäßwand steigt der MMP-Gehalt in der Gefäßwand an, dabei ist der Grad der MMP-Expression abhängig vom Schweregrad der Verletzung (J Zang et al. 2008; GM Jenkins et al. 1998; C Li et al. 2002; LJ Feldman et al. 2001). Die MMPs sind Proteinasen, die durch Spaltung der Basalmembran und der ECM die Einwanderung der SMCs aus der Media in die Intima ermöglichen und damit erheblich zur Intimaproliferation beitragen (MJ Hobeika et al. 2007; N Zempo et al. 1994; M Aoyagi et al. 1998; RR Pauly et al. 1994). Die MMP-Expression wird durch den Zelloberflächenrezeptor CD147 stimuliert (K Nabeshima et al. 2006; YT Konttinen et al. 2000). CD147 kommt unter anderem auf Epithelzellen, Endothelzellen, differenzierten Makrophagen und aktivierten T-Lymphozyten vor (S Fossum et al. 1991; EE Gabison et al. 2005; J Jiang-Li et al. 2007). Zu den zahlreichen Bindungspartnern gehören die MMPs (K Nabeshima et al. 2006; YT Konttinen et al. 2000) und CypA. CyPA ist ein ubiquitär vorkommendes, intrazelluläres Protein. Extrazellulär wirkt es durch die Bindung mit CD147 chemotaktisch auf Leukozyten (V Yurchenko et al. 2002; V Yurchenko et al. 2006; T

Muramatsu et al. 2003). Neben der inflammatorischen Wirkung vom extrazellulären CypA (K Arora et al. 2005; I Tegeder et al. 1997; A Billich et al. 1997; B Sherry et al. 1992) konnten Tierversuche auch einen stimulierenden Einfluss auf Migration und Proliferation der SMCs nach einer Gefäßwandverletzung, zeigen (K Satoh et al. 2008). Nach einer Angioplastie gehen die Wundheilungsprozesse mit einer Entzündungsreaktion in der Gefäßwand einher (ZS Galis et al. 2002; G Bauriedel et al. 1994; CL Wainwright et al. 2001). Die Entzündung wirkt fördernd auf die Neointimabildung. Viele Versuche deuten darauf hin, dass auch CD147 an Entzündungsreaktionen beteiligt ist. So wird in entzündlichen Prozessen vermehrt CD147 auf der Zelloberfläche von aktivierten Leukozyten expremiert, das bewirkt eine schnellere CyPA-vermittelte Chemotaxis (JM Damsker et al. 2007; JM Damsker et al. 2009; YT Konttinen et al. 2000).

3.2. Materialien und Methoden

3.2.1. Versuchsplan

Mäusestamm: C57BL/6J

Injektion	NIM811	Lösungsmittel-Kontrolle
Dosierung	1 mal täglich für 14 Tage 30mg/kg KG i.p.	1 mal täglich für 14 Tage volumengleich
Alter zum Zeitpunkt der OP	8-10 Lebenswochen	8-10 Lebenswochen
Tötungszeitpunkt	3 Wochen post OP	3 Wochen post OP
Geplante Tierzahl	7	7
Weitere Aufarbeitung	HE-; EvG-Färbung	HE-; EvG-Färbung

Mäusestamm: C57BL/6J

Injektion	anti-CD147-Antikörper	Isotyp-Kontrolle
Dosierung	1µg/g KG für 14 Tage	1µg/g KG für 14 Tage
Alter zum Zeitpunkt der OP	8-10 Lebenswochen	8-10 Lebenswochen
Tötungszeitpunkt	3 Wochen post OP	3 Wochen post OP
Geplante Tierzahl	7	7
Weitere Aufarbeitung	HE-; EvG-Färbung	HE-; EvG-Färbung

3. Eigene Untersuchungen

Mäusestamm: B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J (ApoE^{-/-})

Cholesterinreiches Futter	Futterumstellung Beginn 5. Lebenswoche	Futterumstellung Beginn 5. Lebenswoche
Injektion	anti-CD147-Antikörper	Isotyp-Kontrolle
Dosierung	1µg/g KG für 14 Tage	1µg/g KG für 14 Tage
Alter zum Zeitpunkt der OP	8-9 Lebenswochen	8-9 Lebenswochen
Tötungszeitpunkt	4 Wochen post OP	4 Wochen post OP
Geplante Tierzahl	9	9
Weitere Aufarbeitung	HE-; EvG-; anti-MAC3-Färbung der Karotiden Ölrot-Färbung von Aortenwurzel/ Aortenklappe und dem Aortenbogen <i>en face</i>	HE-; EvG-; anti-MAC3-Färbung der Karotiden Ölrot-Färbung von Aortenwurzel/ Aortenklappe und dem Aortenbogen <i>en face</i>

Tab.2: Übersicht über die Versuchsdurchführung

3.2.2. NIM811

„N-methyl-4-isoleucine-cyclosporin“ (NIM811) ist ein Cyclosporinderivat und gehört zur Gruppe der 4-substituierten Cyclosporine. Es ist wie CsA ein CyPA-Inhibitor (B Rosenwirth et al. 1994). Untersuchungen ergaben eine größere Bindungsaffinität zwischen NIM811 und CyPA als zwischen CsA und CyPA. Die Molekülstruktur von NIM811 und CsA ist fast identisch. Eine Isobutyl-Gruppe auf der vierten Position wird durch eine sekundäre Butyl-Gruppe ersetzt (s. Abb. 13) (S Ma et al. 2006). Diese Strukturveränderung bewirkt, dass der NIM811-CyPA-Komplex nicht Calcineurin bindet und hemmt. Somit weist NIM811 keine immunsuppressive Wirkung auf (S Ma et al. 2006; B Rosenwirth et al. 1994). Besonders bei der Suche nach neuen Behandlungsmethoden einiger Viruserkrankungen sind Forscher auf NIM811 aufmerksam geworden. Vielversprechende Untersuchungen geben Hoffnung, dass NIM811 als neues Medikament zur Behandlung einer Hepatitis-C-Infektion in Frage kommt. In Versuchen mit Ratten zeigt NIM811 einen geringeren Toxizitätsgrad als CsA. Es hat günstige pharmakokinetische Eigenschaften und ist weniger nephrotoxisch als CsA (B Rosenfeld et al. 1994; S Ma et al. 2006; JE Mathy et al. 2008). NIM811 verfügt über eine antivirale Wirkung gegenüber HIV-1 (A Steinkasserer et al. 1995; A Billich et al. 1995; K Zander et al. 2003). Es ist ebenfalls Gegenstand vieler Forschungsprojekte, weil es ein „mitochondrial permeability transition“-Inhibitor (MPT) ist. Die MPTs befinden sich auf der inneren Mitochondrienmembran und können durch bestimmte Ereignisse ein unkontrolliertes Einströmen von Wasser verursachen. Dadurch schwellen die Mitochondrien an und können zerstört werden, was einen Zelluntergang zur Folge hat. Bei Transplantationsversuchen mit Leberteilchen wirkte sich eine NIM811-Behandlung günstig aus. Es wird vermutet, dass die beim Eingriff entstehenden Radikale durch NIM811 am Öffnen des MPT-Kanals gehindert werden (Z Zhong et al. 2007). Durch eine Ligatur des Ductus biliferus wurde bei Mäusen eine Cholestase induziert. Als Folge traten Lebernekrosen auf. Eine Behandlung mit NIM811 reduzierte die Nekrosen und Apoptosen, vermutlich ebenfalls durch eine Hemmung der MPT der Mitochondrien (H Rehman et al. 2008).

Die Reperfusion nach einer Ischämie führt häufig in den Mitochondrien der Zellen zur Öffnung des MPT-Kanals mit anschließender Apoptose und Nekrose des Gewebes. Eine Verabreichung von NIM811 an Kaninchen in einem Reperfuisionsversuch führte

zu signifikant kleineren Infarkten (L Argaud et al. 2005).

In Folge eines Hirntraumas kommt es oft zur Mitochondrienschädigung mit anschließendem Neuronenuntergang. Daher wird nach Behandlungsmethoden gesucht, die den Verlust an Nervengewebe in Folge eines Unfalls verringern. Nach einer traumatischen Hirnverletzung von Mäusen und Ratten konnte eine Substitution von CsA oder NIM811 die Mitochondrienschädigung mildern (L Han et al. 2009). NIM811 wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe in verschiedenen Experimenten eingesetzt. Durch die Komplexbildung mit CyPA verhindert es die CD147-CyPA-Bindung. Im Zellkulturversuch konnte NIM811 eine Reduktion der MMP-9-Sekretion während der Differenzierung von Monozyten in Schaumzellen bewirken (P Seizer et al. 2010; P Seizer et al. 2011). Unsere Arbeitsgruppe untersuchte die Bedeutung von CyPA und CD147 am Verlauf einer virusinfizierten Myokarditis. Dazu wurden A.BY/SnJ-Mäuse *intraperitoneal* mit einem murinen Coxsackievirus B3 (CVB3) infiziert und anschließend dreimal wöchentlich *intraperitoneal* mit NIM811 bzw. einer Kontrolle behandelt. Die Tötung erfolgte 4, 8, 12 und 28 Tage *post infectionem*. Diese Versuchsreihe konnte den Einfluss von CyPA am Entzündungsgeschehen einer Myokarditis belegen. Acht Tage nach der Infektion hatten die NIM811-behandelten Mäuse signifikant kleinere Herzmuskelläsionen, eine geringere Infiltration an Makrophagen und T-Zellen und eine Reduktion der MMP-9-Expression gegenüber der Kontrollgruppe. Zu diesem Untersuchungszeitpunkt konnte jedoch eine stärkere Virusreplikation in den Kardiomyozyten der NIM811-behandelten Versuchsgruppe ermittelt werden. 28 Tage nach der Infektion zeigten beide Versuchsgruppen ähnlich große Herzmuskelnekrosen, aber die NIM811-behandelten Tiere wiesen einen geringeren Kollagengehalt auf (P Seizer et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit wird ebenfalls NIM811 als CyPA-Inhibitor eingesetzt. Durch die Applikation an Mäusen nach einer Drahtdenudation der A. carotis communis soll der Einfluss von CyPA auf die Gefäßstenosierung untersucht werden.

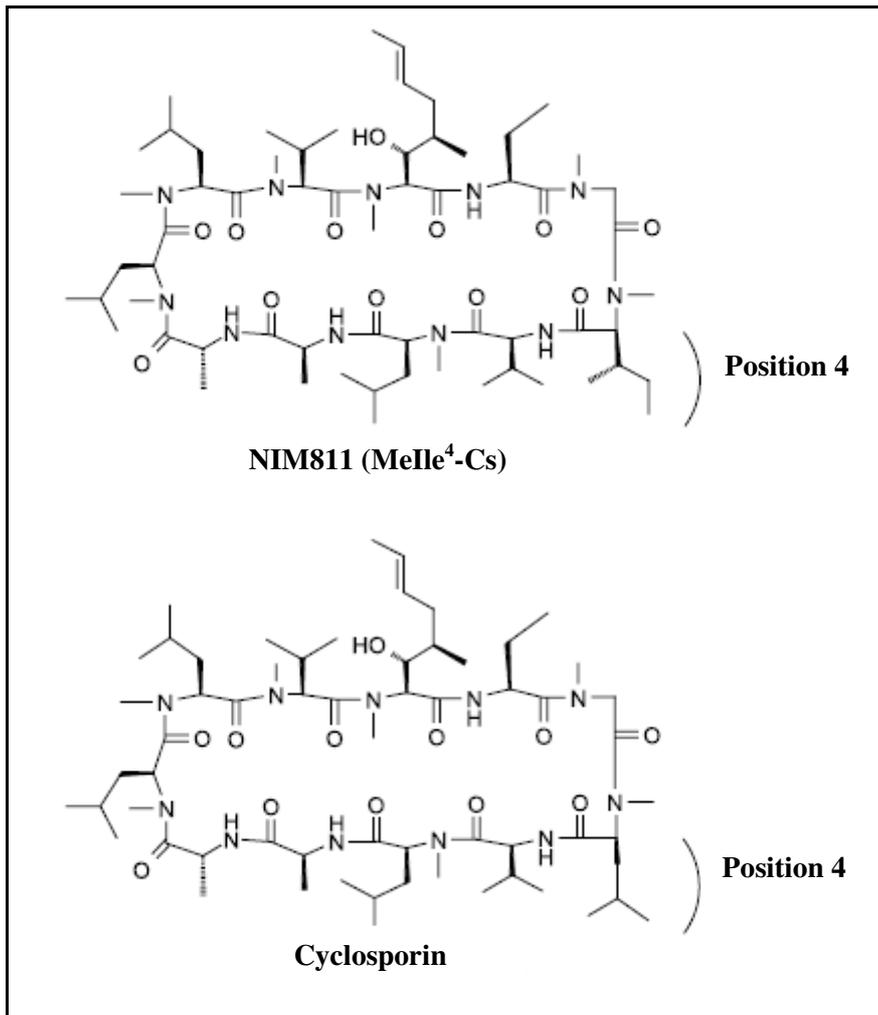


Abb.13: Struktur von NIM811 und Cyclosporin.

Die Molekülstruktur von NIM811 und CsA ist fast gleich. Auf der vierten Position wird die sekundäre Butyl-Gruppe von CsA gegen eine Isobutyl-Gruppe bei NIM811 ausgetauscht.

(modifiziert nach S Ma et al. 2006)

3.2.3. Der anti-CD147-Antikörper RL73.2

Für die Untersuchung des Einflusses von CD147 auf die Neointimabildung wird den Mäusen in dieser Arbeit 14 Tage post OP ein anti-CD147-AK appliziert. Dieser anti-Mausantikörper wird aus dem Zellkulturüberstand der RL73.2 Hybridomzellen aufgereinigt (Genovac; Freiburg). Als Isotypkontrolle dient HB189 (Genovac; Freiburg) aus IgG2a-Hybridomzellen der Ratte. In der Literatur sind zahlreiche Untersuchungen mit diesem anti-CD147-AK beschrieben. Auch in der Arbeitsgruppe gibt es bereits Erfahrung mit diesem Antikörper. Mit Hilfe des Ischämie/Reperusionsmodells in der Maus wurde die Rolle von CD147 und CyPA in der Infarktphysiologie untersucht. Die Mäuse wurden nach der OP mit dem anti-CD147-AK behandelt. Diese Tiere wiesen eine geringere Migration von Monozyten und neutrophilen Granulozyten in das Infarktgewebe auf und hatten eine bessere systolische Herzfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch die Blockade von CD147 mittels des Antikörpers konnte CyPA seine chemotaktische Funktion gegenüber den Entzündungszellen nicht ausüben (C Ochmann 2010). Auch in den Versuchen von Arora et al. wird der entzündungsfördernde Einfluss der CyPA-CD147-Interaktion deutlich. Eine Applikation vom anti-CD147-AK bzw. von CsA ergab eine Reduktion der Migration von neutrophilen Granulozyten ins Lungengewebe nach einer akuten Lungenverletzung der Maus (K Arora et al. 2005). In der Boyden Chamber konnte die CyPA-vermittelte Chemotaxis auf neutrophile Granulozyten, Monozyten und aktivierte CD4⁺-T-Zellen durch das Hinzufügen des anti-CD147-AK deutlich reduziert werden (JM Damsker et al. 2009). Auf diesen Zellen wird im entzündeten Gewebe vermehrt CD147 exprimiert. In einem kollageninduzierten Arthritismodell der Maus, welches zur Erforschung der rheumatoiden Arthritis herangezogen wird, konnten Damsker et al. erhöhte Werte von CyPA in den entzündeten Gelenken der Mäuse nachweisen. Bei der Kokultivierung von Mäusefibroblasten mit Mäusemakrophagen konnte nur der Klon UM-8D6 die pro-MMP-9-Sekretion hemmen. Dies zeigt, dass die anti-CD147-AK unterschiedliche Angriffspunkte am CD147-Molekül haben. So konnte der Klon RL73.2 die Chemotaxis hemmen, was zu einer verbesserten Klinik der Versuchsmäuse führte, hatte aber keinen Einfluss auf die CD147-vermittelte MMP-Expression (JM Damsker et al. 2009).

Bei der Untersuchung der CyPA-CD147-Interaktion beim allergischen Asthma im

Mausmodell wiesen die Luftwege erhöhte CyPA-Spiegel auf. CD4⁺-T-Zellen und eosinophile Granulozyten des betroffenen Lungengewebes zeigten eine Hochregulierung der CD147-Expression. Eine Behandlung der Mäuse mit anti-CD147-AK reduzierte die Ansammlung von eosinophilen Granulozyten und CD4⁺-T-Zellen (JM Damsker et al. 2007).

Auch bei der Untersuchung des Einflusses von CD147 auf die Multiple Sklerose wurde der anti-CD147-AK eingesetzt. Die experimentell induzierte, autoimmune, Encephalomyelitis (EAE) der Maus dient als Tiermodell. Auf den peripheren Leukozyten der Mäuse mit EAE ist CD147 schon vor dem Auftreten der ersten klinischen Symptome verstärkt exprimiert. CD147 ist auch in Hirnproben von Patienten mit MS erhöht. Eine Hochregulierung der CD147-Expression auf Entzündungszellen ist verbunden mit einer erhöhten MMP-9-Sekretion und Aktivierung. Nach einer Behandlung der Mäuse mit anti-CD147-AK konnten weniger klinische Symptome und Leukozyteninfiltrate im Parenchym des zentralen Nervensystems festgestellt werden. Die Autoren erwähnen, dass es eine CyPA-CD147-Interaktion gibt, vermuten aber, dass durch die Reduktion der MMP-Sekretion die Leukozytenmigration ins ZNS durch die Aufrechterhaltung natürlicher Barrieren erschwert wird (SM Agrawal et al. 2011).

Aus dieser Literaturrecherche lässt sich zusammenfassend ablesen, dass der anti-CD147-AK RL73.2 die CyPA-CD147-Interaktion blockiert und damit die chemotaktische Wirkung von CyPA auf Entzündungszellen aufhebt. Zum Einfluss auf die Hemmung der MMP-Expression gibt es widersprüchliche Angaben.

3.2.4. Versuchstiere

Verwendete Mäuse

Für die Versuche werden C57BL/6J-Mäuse und ApoE^{-/-}-Mäuse (B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J) verwendet.

Die C57BL/6J-Mäuse werden von Charles River Laboratories, Sulzfeld bezogen. Es kommen ausschließlich männliche Tiere zum Versuchseinsatz. Zum Zeitpunkt der Operation haben die Tiere ein Alter von acht bis zehn Wochen. Die homozygoten ApoE^{-/-}-Mäuse sind zum Teil zugekauft (Charles River Laboratories, Sulzfeld) und zum anderen aus der laboreigenen Nachzucht. Auch von den ApoE^{-/-}-Mäusen werden nur männliche Tiere verwendet. Die ApoE^{-/-}-Mäuse werden mit acht bis neun Wochen operiert.

Haltung der Mäuse

Die Tiere werden während des gesamten Versuches unter standardisierten Bedingungen gehalten.

Die Haltung der Tiere erfolgt im Makrolonkäfig Typ II long, ausgestattet mit Fressgitter und Trinkflasche. Vor der Operation leben maximal 5 Mäuse in einem Käfig. Nach dem Eingriff werden die Mäuse zu zweit gesetzt, um den Sozialstress zu verringern. Als Einstreu wird entkeimtes und entstaubtes Weichholzgranulat aus Espenholz (Fa. ABEDD-LAB & VET Service GmbH, Wien) verwendet. Zusätzlich wird den Mäusen steriles Zellstoffpapier als Beschäftigungs- und Nistmaterial angeboten. In der Tierhaltung wird künstlich ein 12 stündiger Tag-Nacht-Rhythmus erzeugt. Im Tierhaltungsraum herrscht eine konstante Luftfeuchte von 50-60%, die Raumtemperatur beträgt 20-23°C. In den Käfigen besteht eine Lichtintensität von ca. 50 Lux. Zur eindeutigen Wiedererkennung der Mäuse werden sie mit einer speziellen Ohrnummer markiert. Die C57BL/6J-Mäuse erhalten von der Aufzucht bis zum Versuchsende ein Alleinfutter (ssniff) für Ratten und Mäuse. Den ApoE^{-/-}-Mäusen wird bis zum Ende der vierten Lebenswoche ebenfalls dieses Alleinfutter gefüttert. Anschließend erfolgt eine Futterumstellung auf eine atherogene Diät (PROVIMI KLIBA SA, Grenzach-Whylen). Dieses Experimentalfutter ist besonders cholesterin- und fettreich (siehe Tabelle 3). Es fördert die Bildung atherosklerotischer Plaques. Die Tiere haben ad libitum Zugang zu Wasser und Futter. Die Tierversuche sind vom Regierungspräsidium Tübingen unter der Genehmigungsnummer M2/09 genehmigt worden.

Tab.3: Übersicht der Inhaltsstoffe des Tierfutters

	Futter der C57BL/6J-Mäuse	Futter der ApoE ^{-/-} -Mäuse
Fuertertyp	Alleinfutter für Ratte und Maus	Atherogene Diät, Eperimentalfutter für Maus und Ratte
Inhaltsstoffe	Rohprotein 19,3% Rohfett 3,4% Rohfaser 5,0% Rohasche 6,5% Calcium 1,0% Phosphor 0,70% Natrium 0,24% Vitamin A 25.000IE/kg Vitamin D3 1.000IE/kg Vitamin E 125mg/kg	Rohprotein 20,8% Rohfett 11,8% Rohfaser 4,0% Rohasche 5,4% Cholesterol 1,25% Na Cholat 0,2% Energie 3,76 kcal/kg Calcium 0,93% Phosphor 0,68% Vitamin A 11.500IE/kg Vitamin D3 850IE/kg Vitamin E 87 mg/kg

3.2.5. Drahtdenudation der *A. carotis communis*

Narkose, Antidot und Analgesie

Die Drahtdenudation wird unter Vollnarkose durchgeführt. Die Injektionsnarkose wird i.p. injiziert, bestehend aus Fentanyl (0,05mg/kg), Midazolam (5,0mg/kg) und Medetomidin (0,5mg/kg). Zusätzlich erhält die Maus über eine Kopfmaske Isofluran (0,5-1,0% Vol. in Sauerstoff, Flow 0,8l/min). Zur Kreislaufstabilisierung und Zufuhr von schnell verfügbarer Energie wird der Maus in der Aufwachphase ein Gemisch aus 5% Glucose und Ringerlösung s.c. injiziert. Die Antagonisierung der Anästhesie erfolgt mit Naloxon (1,2mg/kg), Flumazenil (0,5mg/kg) und Atipamezol (2,5mg/kg). Das Antidot wird ebenfalls s.c. verabreicht. Als Analgetikum erhalten die Mäuse noch vor der Antagonisierung und ein weiteres Mal sechs Stunden später Buprenorphin (0,1mg/kg s.c.).

Vorbereitung

Vor der Operation werden die Tiere gewogen und untersucht, um zu leichte oder kranke Tiere aus dem Versuch auszuschließen. Nach der Applikation der Injektionsnarkose wird mit dem Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums Augensalbe aufgetragen, um ein Austrocknen während der Operation zu vermeiden. Am Hals wird das Fell im Operationsfeld mit Hilfe von Enthaarungscreme entfernt. Nun kann die Maus in Rückenlage auf einer Wärmematte fixiert werden (s. Abb. 16). Der Kopf zeigt dabei in Richtung des Operateurs. Mit einer Kopfmaske wird das Tier zusätzlich mit Sauerstoff und Isofluran versorgt. Das Operationsfeld wird nun mit einer isotonischen NaCl-Lösung gesäubert und anschließend mit einer Jodlösung desinfiziert. Sobald der Flexorreflex ausgefallen ist, ist die Narkosetiefe erreicht, bei der die Operation durchgeführt werden kann.

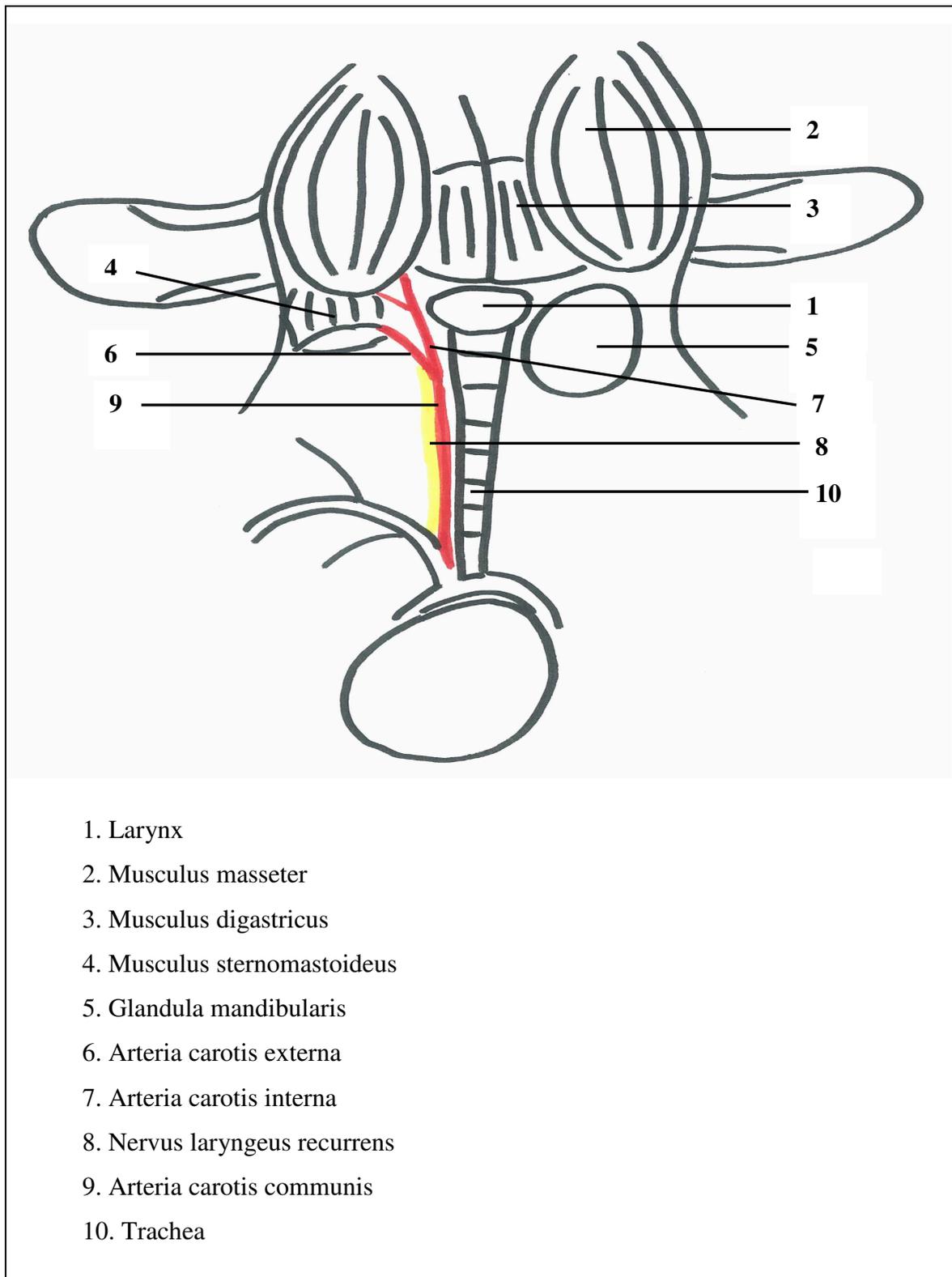


Abb.14: Übersicht anatomischer Strukturen des Halssitus.

Operation

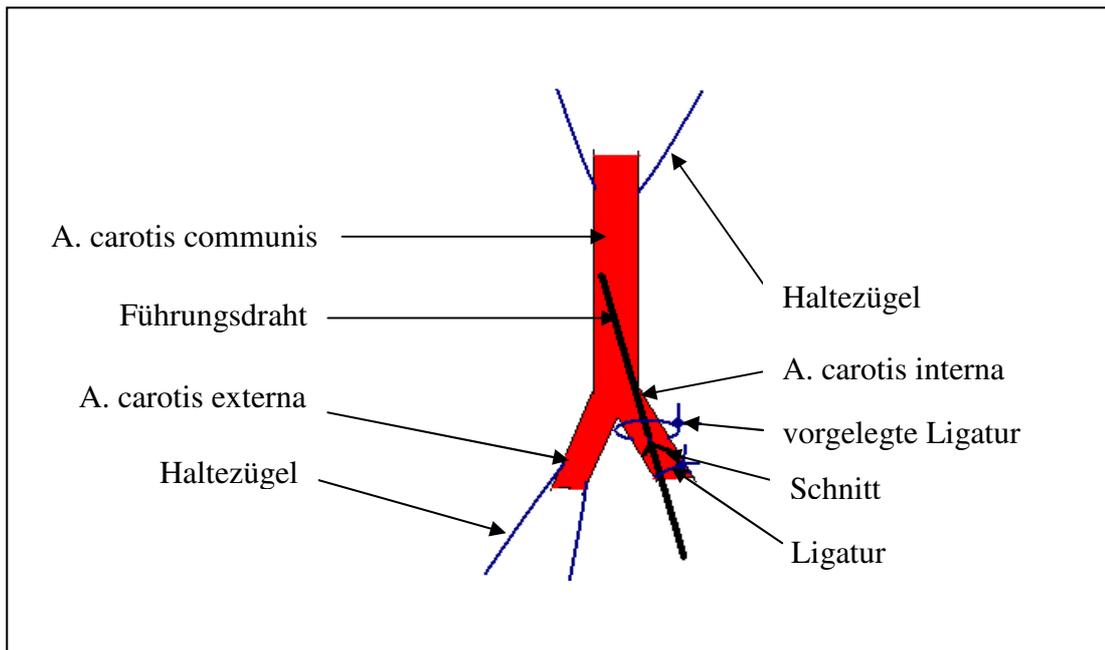


Abb.15: Schematische Darstellung der Operationsmethode.

Drahtdenudation

Die Operationstechnik wird für die Drahtdenudation der linken A. carotis communis beschrieben (s. Abb. 15 und 17). Die Operation wird mit Hilfe eines Stereomikroskopes (Stemi, 2000-C, Zeiss, Deutschland) bei 12facher Vergrößerung durchgeführt. Es erfolgt ein ca. 0,5cm langer Hautschnitt median am Hals. Dabei endet der kraniale Schnittwinkel auf Höhe des Unterkieferwinkels. Während des gesamten Eingriffes wird das Gewebe durch Superfusion mit einer isotonischen NaCl-Lösung feucht gehalten. Nun präpariert sich der Operateur stumpf zwischen den Glandulae mandibulares vor, so dass sich die Speicheldrüsen nach lateral verschieben lassen. Ein Teil der A. carotis communis wird durch den M. sternomastoideus verdeckt. Dieser Muskel wird nach caudal verlagert. Der N. laryngeus recurrens liegt der A. carotis communis lateral an (s. Abb. 14). Arterie und Nerv müssen nun vorsichtig voneinander getrennt werden. Der Operateur fährt jetzt mit einer gebogenen Pinzette unter die A. carotis communis und zieht einen 6-0 Polypropylenfaden unter dem Gefäß hindurch. Die Fadenenden werden mit einer Klemme fixiert, so dass die A. carotis communis in der gebildeten Schlaufe des Fadens zum Liegen kommt. Mit dem Faden wird ein leichter Zug auf das Gefäß ausgeübt, so dass es für den Operateur leichter zugänglich wird. Wie in Abbildung 15 schematisch dargestellt, verzweigt sich

die A. carotis communis in die A. carotis externa und interna. Als nächstes wird die Bifurkation freipräpariert. Mit der Einfädelhilfe fährt der Operateur von medial kommend unter die A. carotis externa. Mit der anderen Hand wird ein weiterer 6-0 Polypropylenfaden in die Einfädelhilfe eingeführt und mit deren Hilfe unter dem Gefäß hindurchgezogen. Diese Fadenenden werden ebenfalls mit einer Klemme fixiert. Mit Hilfe der Einfädelhilfe wird ein schon zuvor vorbereiteter 7-0 Polypropylenfaden unter die A. carotis interna gezogen. Ein Knoten wird vorgelegt, aber noch nicht festgezogen. Nun wird die Einfädelhilfe wieder unter die A. carotis interna geführt. So kann die Schlaufe weit kranial geschoben werden. Anschließend wird die Ligatur festgezogen. Mit der Einfädelhilfe wird ein weiteres Fadenstück unter der Arterie hindurchgeführt. Der zweite Faden liegt kaudal von der Ligatur. Bei diesem Fadenstück wird ebenfalls eine Ligatur vorgelegt, aber nicht zugezogen. Es folgt ein behutsames Anziehen der vorbereiteten Haltezügel. Die A. carotis communis wird gespannt, bis der Blutfluss unterbrochen ist und ein ausreichend großes Gefäßstück für die Denudation freiliegt. Als nächstes fasst der Operateur mit einer Pinzette ein Fadenende der Ligatur der A. carotis interna. Auf diese Weise ist das Gefäß gut fixiert. Mit einer Mikroschere erfolgt kaudal vom Knoten eine transverse Ateriotomie der A. carotis interna. Mit einem kleinen Nadelhalter wird ein 0.0014-inch Angioplastieführungsdraht aufgenommen und in die zuvor geschaffene Öffnung eingeführt und vorgeschoben, dabei kann durch das Festhalten der Fadenenden von der Ligatur ein ausreichender Gegendruck ausgeübt werden. Um eine ausreichend große Verletzung zu erzeugen, muss der Draht mehrmals vor und zurück bewegt werden. Nach der Entfernung des Führungsdrahtes wird die vorgelegte Ligatur zugezogen, dass die Gefäßöffnung zwischen den beiden Ligaturen zum Liegen kommt. Die Fadenenden werden gekürzt. Nun kann vorsichtig der Haltezügel von der A. carotis externa gelöst werden. Dabei ist auf austretendes Blut zu achten. Als Nächstes wird der zweite Haltezügel entfernt. Die Speicheldrüsen werden median wieder zusammengeführt. Als Letztes wird die Wunde mit Einzelheften verschlossen.

Nachbereitung

Die Naht wird mit Jod betupft. Zur Kreislaufstabilisierung und Zufuhr von schnell verfügbarer Energie wird der Maus in der Aufwachphase ein Gemisch aus 5% Glucose und Ringerlösung s.c. injiziert. Der Maus wird anschließend s.c. das Antidot und während der Aufwachphase Temgesic als Analgetikum verabreicht. Um ein Auskühlen des Tieres zu verhindern, steht der Käfig in den ersten Stunden nach der

3. Eigene Untersuchungen

Operation vor einer Rotlichtlampe. Sechs Stunden nach der Operation erhält die Maus die zweite Temgesic-Injektion.

Tiere, die nach der Operation ein schlechtes Allgemeinbefinden zeigen, wie starker Gewichtsverlust, äußere Verletzungen oder Lethargie, werden vorzeitig mit CO₂ getötet und vom Versuch ausgeschlossen.

3. Eigene Untersuchungen

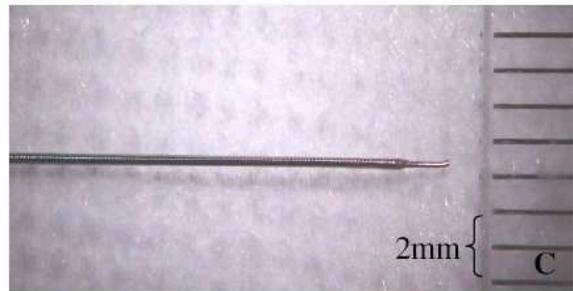


Abb.16: (A) Instrumente für die Drahtdenudation; (B) Stereomikroskop mit fixierter Maus; C Angioplastieführungsdraht; D Position der Maus während der OP

3. Eigene Untersuchungen

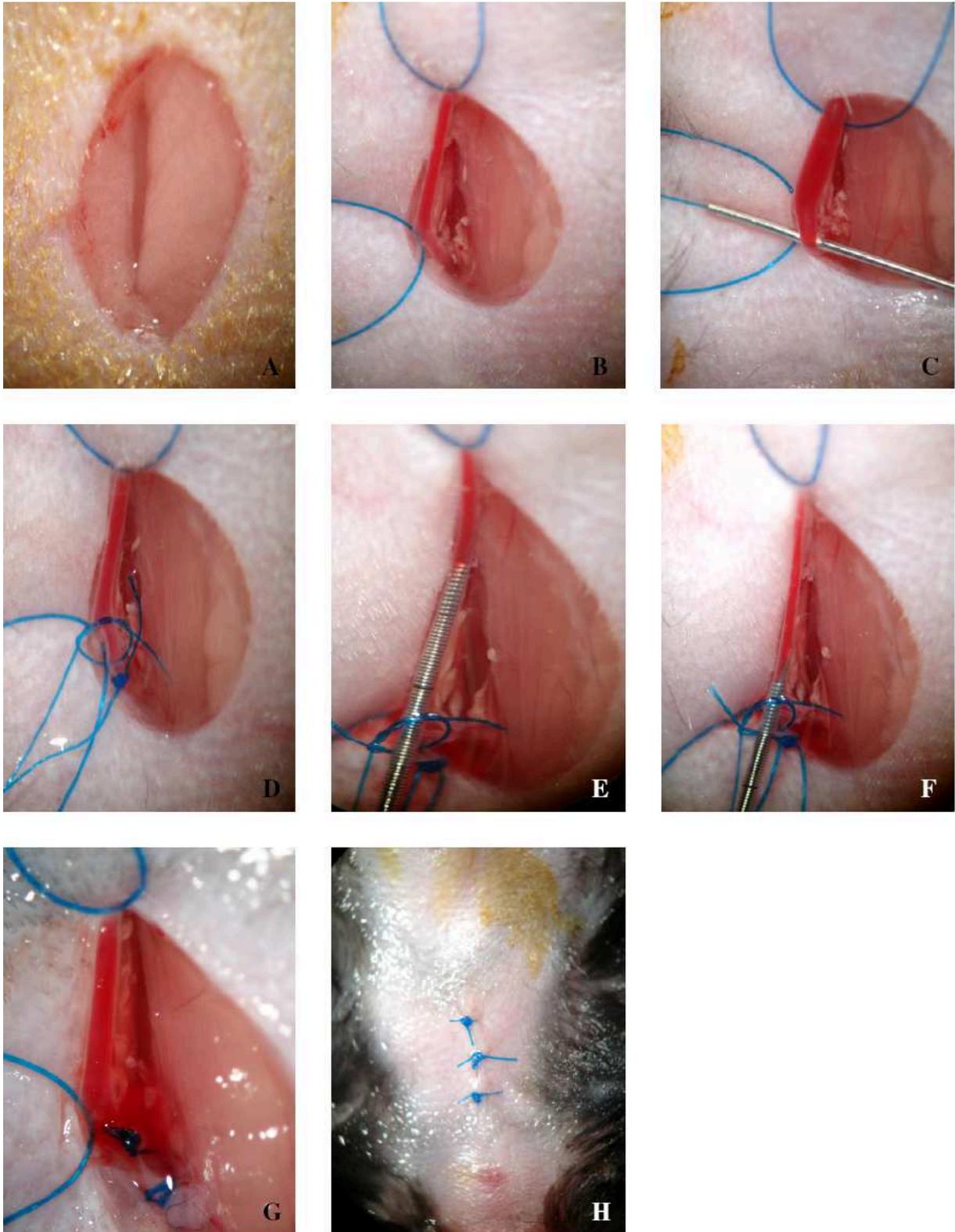


Abb.17: Drahtdenudation der A. carotis communis bei einer Maus.

Injektion der zu prüfenden Wirkstoffe

Vor der Operation werden die Mäuse gewogen, um die zu verabreichende Menge des Wirkstoffes berechnen zu können. Eine Woche nach der Operation erfolgt die nächste Gewichtskontrolle. Die Injektionsmenge wird dem neuen Gewicht entsprechend angepasst. Für die Injektion werden Insulinspritzen verwendet. Vom NIM811 erhalten die Mäuse täglich eine Dosis von 30mg/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die Lösungsmittelkontrolle wird volumengleich appliziert. Die erste Injektion erfolgt unmittelbar nach der Operation und jede weitere im Rhythmus von 24 Stunden. Die Dosis des anti-CD147-AK bzw. der IgG-Kontrolle beträgt 1µg/g Körpergewicht. Eine Stunde vor der Denudation erhält die Maus die erste Injektion, die zweite erfolgt dann sechs Stunden nach der Denudation und die dritte 18 Stunden später. Anschließend beträgt die Zeit zwischen den Injektionen 24 Stunden. Die Mäuse werden ebenfalls über einen Zeitraum von 14 Tagen mit dem Antikörper bzw. der Isotyp-Kontroll behandelt.

Tötung und Organentnahme

Für die Auswertung erfolgt bei den Wildtyp- und den ApoE^{-/-}-Mäusen die Entnahme der Karotiden. Von den ApoE^{-/-}-Mäusen werden zusätzlich das Herz, die Abdominalaorta mit deren Gefäßabgängen und das Serum gewonnen. Hierfür werden die Mäuse unter Isofluran-Narkose in Rückenlage auf der Unterlage fixiert. Durch kraniale Herzpunktion wird bei den ApoE^{-/-}-Mäusen Blut für die Serumgewinnung entnommen. Anschließend werden die denudierte und die unverletzte Karotis mit ihrer Bifurkation freipräpariert. Im nächsten Schritt folgt die Durchtrennung beider Karotiden kranial der Bifurkation mit der Mikroschere. Auf diese Weise wird die Maus durch Entbluten getötet. Anschließend werden Brustkorb und Bauchhöhle geöffnet. Die Maus wird über den linken Herzventrikel zuerst mit einer NaCl-Lösung und anschließend mit einer 4%igen Formaldehydlösung perfundiert. Auf diese Weise werden das Herz und die Karotiden von Blutresten befreit. Die Karotiden und ggf. die Aorta werden dann freipräpariert und entnommen. Bei der Entnahme des Aortenbogens ist zu beachten, dass dieser beim Eröffnen des Brustkorbes leicht verletzt werden kann. Die Karotiden und der Aortenbogen werden bis zur weiteren Verarbeitung in 4% Formaldehyd aufbewahrt, alle anderen Proben werden bei -80°C gelagert.

Materialien und Reagenzien für die Operation und Tierhaltung

Materialien:

- 0.014-inch Angioplastieführungsdraht HI- Torque FloppyII Guide Wire, Abbott Vascular, USA
- chirurgische Schere spitz-spitz F.S.T, Stainless, Deutschland
- Mikropinzetten Medicon, Deutschland
- Mikroschere F.S.T, Stainless, Deutschland
- Mosquito-Arterien-Klemmen F.S.T, Stainless, Deutschland
- Jacobsen Nadelhalter
- Pean-Kocher Klemmen
- Mikro-Nadelhalter
- 6-0 Prolene[®], blau monofil nicht resorbierbar, Nadelfaden-Kombination Ethicon, Norderstedt, Deutschland
- 7-0 Prolene[®], blau monofil nicht resorbierbar, Nadelfaden-Kombination Ethicon, Norderstedt, Deutschland

Geräte:

- Wärmematte Bowdoinham, FHC, USA
- Stereomikroskop, Stemi, 2000-C Zeiss, Deutschland
- Kaltlichtquelle, KL 1500LCD Zeiss, Deutschland
- Isofluranverdampfer mit Sauerstoffzufuhr Völker Vet, Kaltenkirchen

Medikamente:

- Bepanthen Augen- und Nasensalbe Bayer, Deutschland
- Isotonische Kochsalzlösung, NaCl[®] Fresenius Kabi, Deutschland
- Braunol[®], Povidon-Iod B.Braun, Deutschland
- Isofluran CP, Isofluran cp-pharma, Deutschland
- Novalgin[®] Tropfen, Metamizol-Natrium Aventis, Deutschland

3. Eigene Untersuchungen

- Sedator[®], Medetomidinhydrochlorid Albrecht, Deutschland
- Midazolam[®]ratiopharm Ratiopharm, Deutschland
- Naloxon CuraMed Pharma GmbH, Deutschland
- Flumazenil Kabi[®] Fresenius Kabi, Deutschland
- Antisedan[®], Atipamezol Albrecht, Aulendorf, Deutschland
- Temgesic[®], Buprenorphin Essex Pharma, Deutschland
- Fentanyl CuraMed Pharma GmbH, Deutschland
- Ringer-Injektionslösung B.Braun AG, Deutschland
- Glucose 5% Fresenius Kabi, Deutschland

Reagenzien:

- NIM811 0,04g NIM811-Pulver (2mg/ml)
3ml Cremophor
1ml unvergälltes Ethanol
16ml 5%Glucose
- Lösungsmittelkontrolle 3ml Cremophor
1ml unvergälltes Ethanol
16ml 5%Glucose
- Anti-EMMPRIN, RL73.2; 0,90mg/ml Genovac GmbH, Deutschland
- Isotyp, HB-189; 2,00mg/ml Genovac GmbH, Deutschland
- Cremophor Sigma, Deutschland
- NIM811 gesponsert von Novartis

3.2.6. Aufarbeitung der Aa. carotides

Paraffinschnitte

Die entnommenen Karotiden müssen mindestens 24 Stunden in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert werden. Anschließend werden die Gefäße mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (je eine Stunde 70%, 80%, 95%, zweimal 100% Ethanol) und schließlich für zweimal eine Stunde in Roti-Histol[®] gegeben. Das Roti-Histol[®] am Ende der Alkoholreihe bewirkt, dass das Paraffin leichter ins Gewebe eindringen kann. Anschließend werden die Karotiden zwei Stunden in flüssiges Paraffin (60°C) überführt. Im nächsten Schritt werden die Gefäße senkrecht zur späteren Schnittfläche mit Hilfe von Einbettförmchen in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke mit den Karotiden werden zur Erleichterung des Schneidens bei -20°C vorgekühlt. Es werden mit einem Rotationsmikrotom (Jung Multicut, Reichert-Jung, Deutschland) 4µm dicke Schnitte angefertigt. Für eine besonders gute Haftung werden die Paraffinschnitte auf SuperFrost-Objektträger gezogen. Vor dem Färben sollten die Schnitte mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur trocknen.

Es wird direkt hinter der Bifurkation, am Übergang der A.carotis externa und interna in die A. carotis communis, mit dem Schneiden begonnen. Die Position wird mikroskopisch ermittelt. Die Schnitte haben eine Dicke von 4µm. Auf einem Objektträger werden drei aufeinander folgende Schnitte aufgezogen. Von jeder Karotis werden mindestens 21 Objektträger mit je drei Schnitten gewonnen. Für die morphometrische Auswertung wird jeder siebte Objektträger herangezogen. Zwischen den Objektträgern, die vermessen werden, liegt somit eine Strecke von 72µm.

Entparaffinierung

Bevor Färbungen durchgeführt werden können, muss das Paraffin aus dem Gewebe entfernt werden. Als erstes werden die Schnitte dazu zweimal für jeweils zehn Minuten in eine Roti-Histol[®] Lösung gestellt. Roti-Histol[®] ist ein Ersatz für das früher verwendete Xylol. Anschließend durchlaufen die Schnitte eine absteigende Alkoholreihe. Die Alkoholreihe beginnt mit zweimal fünf Minuten in 100%igem Ethanol, danach folgen jeweils fünf Minuten in 95%igem Ethanol und fünf Minuten in 70%igem Ethanol. Am Ende werden die Schnitte drei Minuten in destilliertem Wasser gebadet. Auf diese Weise werden die Präparate schrittweise rehydriert und sind vorbereitet für die anschließenden Färbungen.

Färbungen

Die HE-Färbung gehört zu den am häufigsten durchgeführten Färbungen. Es handelt sich um eine Übersichtsfärbung, bei der das Hämatoxylin die Kerne blau anfärbt und Eosin das Zytoplasma blassrosa darstellt. Die elastischen Fasern stellen sich rosa-rot und die Muskulatur stellt sich rot dar. Die Elastika van Gieson Färbung dient der Darstellung elastischer Fasern. Zellkerne färben sich schwarz-braun, das Zytoplasma gelb-braun und das Kollagen rot. Die Muskulatur und die elastischen Fasern stellen sich schwarz dar. Mit der Sudanfärbung werden Fette gelb-rot bis rot angefärbt.

Hämatoxylin und Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Nach der Entparaffinierung werden die Schnitte fünf Minuten im Hämalaun gefärbt. Anschließend erfolgt eine Spülung im Leitungswasser. Nun werden die Schnitte 10 Minuten im lauwarmen Leitungswasser gebläut. Als Letztes folgt eine dreiminütige Färbung in 1%igem Eosin. Nach der Färbung muss den Schnitten schrittweise wieder das Wasser entzogen werden. Sie bewirkt eine Verdichtung des Gewebes. Die Präparate werden dazu jeweils etwa fünf Sekunden in 70%igem, 80%igem und 90%igem Alkohol gegeben. Dann bleiben die Schnitte zweimal fünf Minuten in 100%igem Ethanol. Am Ende der aufsteigenden Alkoholreihe erfolgt ein dreiminütiges Bad im Roti-Histol[®]. Jetzt können die Objektträger mittels Deckgläschen und Eukitt[®] eingedeckt werden. Auf diese Weise sind die Schnitte konserviert und mikroskopisch auswertbar.

Elastica van Gieson-Färbung (EvG-Färbung)

Nach der Entparaffinierung (siehe oben) werden die Schnitte direkt aus dem 70%igen Ethanol für 30 Minuten in Resorcin überführt. Anschließend werden die Präparate jeweils für drei Sekunden dreimal in 80%igem Ethanol gespült. Es folgen zehn Minuten in der Weigerts-Eisenhämatoxylin-Lösung. Die Weigert-Lösung wird zuvor zu gleichen Teilen aus Weigert`s Hämatoxylin-Lösung A und Weigert`s Hämatoxylin-Lösung B angesetzt. Als Nächstes werden die Schnitte kurz in Wasser und dann für drei Sekunden in HCL-Alkohol überführt. Danach werden die Schnitte zehn Minuten in lauwarmem Leitungswasser gebläut. Jetzt folgen zwei Minuten im Picrofuchsin. Als Letztes werden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Dazu werden die Schnitte jeweils fünf Sekunden in 70%igem, 80%igem und 90%igem Ethanol gewaschen. Danach verbleiben die Schnitte zweimal fünf Minuten in

100%igem Ethanol. Vor dem Eindecken mit Eukitt® und dem Deckgläschen werden die Objektträger für drei Minuten in Roti-Histol® überführt.

Auswertung der Karotiden

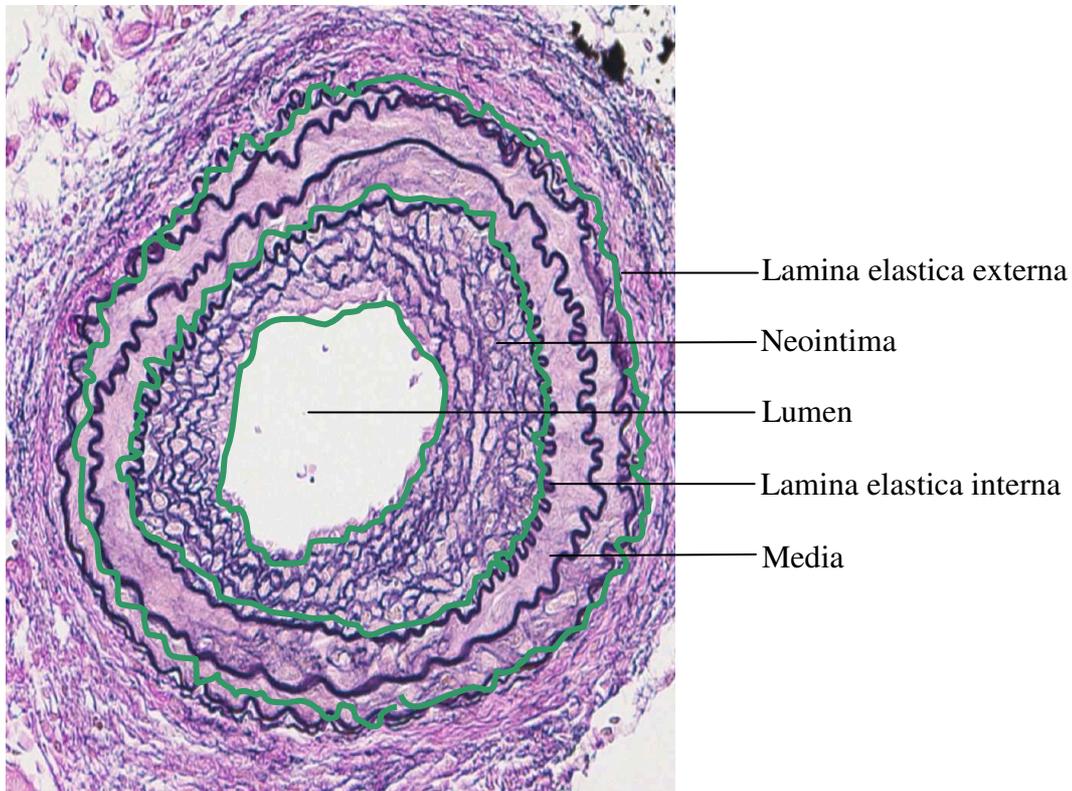


Abb.18: A. carotis communis einer C57BL/6J-Maus drei Wochen nach durchgeführter Drahtdenudation; EvG-Färbung

Zur Auswertung der denudierten Karotiden erfolgt die EvG-Färbung. Mit dieser Färbung werden unter anderem die elastischen Fasern schwarz angefärbt. Dadurch lassen sich die Lamina elastica interna und die Lamina elastica externa darstellen. Die Karotidenschnitte werden zuvor mit einem Lichtmikroskop (Optiphot-2, Nikon, GmbH Düsseldorf) und aufgesetzter Kamera (Digital sight DS, Nikon GmbH, Düsseldorf) in 100facher (10fach Okular und 10fach Objektiv) Vergrößerung fotografiert und anschließend mit Hilfe einer Software (NIS-Elements Version BR 2.10, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) am Bildschirm vermessen. Das freie Lumen, die Lamina elastica interna und die Lamina elastica externa des Gefäßes werden am Bildschirm umfahren. Das Programm berechnet anschließend den Flächeninhalt in μm^2 .

In Folge der Drahtdenudation kam es bei den C57Bl/6J-Mäusen vereinzelt zu einer starken Mediaverdickung. Bei der Mediaverdickung wird die Fläche des

3. Eigene Untersuchungen

ursprünglichen Lumens gemessen. Dabei wird sich am Verlauf der Lamina elastica interna an einer Stelle ohne Mediaverdickung orientiert. Diese Korrektur der Stenoseberechnung wird nur bei den C57Bl/6J-Mäusen durchgeführt, weil eine starke Mediaverdickung bei den ApoE^{-/-}-Mäusen zum normalen Krankheitsverlauf nach einer Drahtdenudation gehört.

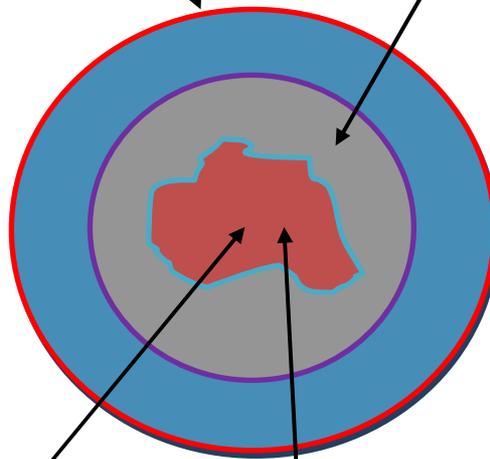
3. Eigene Untersuchungen

Mit Hilfe der ausgemessenen Flächen werden folgende Größen berechnet:

- Stenosegrad in Prozent
- Fläche der Neointima in μm^2
- Fläche der Media in μm^2

$$\text{Media} = \text{Fläche innerhalb der LEE} - \text{Fläche innerhalb der LEI}$$

$$\text{Neointima} = \text{Fläche innerhalb der LEI} - \text{Lumen}$$



$$\text{Stenose in \%} = 100\% - \text{Lumen in \%}$$

$$\text{Lumen in \%} = \frac{\text{gemessenes Lumen} \times 100\%}{\text{Fläche innerhalb der LEI}}$$

Abb.19: Schematische Darstellung der Auswertung der murinen Karotiden.
(LEE=Lamina elastica externa, LEI=Lamina elastica interna)

3.2.7. Aufarbeitung der Herzen

Gefrierschnitte

Für die Messung der subvalvulären Plaques und der atherosklerotischen Plaques der Aortenwurzel werden Gefrierschnitte von der Herzbasis mit Aortenwurzel der ApoE^{-/-}-Mäuse angefertigt. Paraffinschnitte eignen sich nicht für die Ölrot-Färbung, weil das Fett durch die Alkoholreihe herausgelöst wird. Nach der Organentnahme wird das Gewebe mit 4%igem PFA gespült und anschließend bei -80°C eingefroren. Eingebettet werden die Herzen mit Tissue-Tek[®] (O.C.T.-TM Compound, Sakura Finetek, Niederland). Das Schneiden der Herzen erfolgt mit Hilfe eines Kryotoms (CM3050, Leica, Nussloch, Deutschland) bei einer Objekttemperatur von -25°C und einer Umgebungstemperatur von -20°C. Die Schnittdicke beträgt 5µm. Die Objektträger werden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren. Es werden von jeder Herzbasis 33 Schnitte hergestellt. In die Messung der Plaques geht jeder dritte Schnitt ein. Vermessen werden sechs Schnitte der Aortenwurzel und fünf Schnitte der Aortenklappe.

Ölrot-Färbung

Die hergestellten Gefrierschnitte von der Aortenklappe und Aortenwurzel werden für die weitere Auswertung mittels Ölrot gefärbt. Die Gefrierschnitte werden 10 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet. Als Nächstes kommen die Präparate für drei Minuten ins "Phosphat buffered saline" (PBS). Im nächsten Schritt werden die Objektträger fünf Minuten in 60%igem Ethanol und anschließend zehn Minuten in die frisch filtrierte Ölrot-Gebrauchslösung überführt. Nach der Färbung werden die Schnitte etwa drei Sekunden in 60%igem Ethanol differenziert. Es folgt eine kurze Spülung in destilliertem Wasser. Zur Darstellung der Zellkerne werden die Schnitte zwei Minuten im Hämalaun gefärbt. Danach werden die Präparate fünf Minuten in lauwarmem Leitungswasser gebläut. Um den fettlöslichen Farbstoff nicht wieder aus dem Gewebe zu lösen, wird keine Alkoholreihe durchgeführt. Die Objektträger werden mit Hilfe von Glycerin eingedeckt.

Auswertung

Gemessen wird die Fläche der atherosklerotischen Plaques der Aortenwurzel und subvalvulär der Aortenklappe in den angefertigten Gefrierschnitten. Ausgewertet werden jeweils die Präparate von sechs mit anti-CD147-AK und sechs mit Isotyp behandelten ApoE^{-/-}-Mäusen. Vermessen werden die Plaques in der Ölrot-Färbung.

Zuerst werden die Schnitte über ein Lichtmikroskop (Optiphot-2, Nikon GmbH, Düsseldorf) mit aufgesetzter Kamera (Digital sight DS-U7, Nikon GmbH, Düsseldorf) fotografiert. Die Ausmessung erfolgt bei einer 40fachen Vergrößerung (10fach Okular und 4fach Objektiv) am Bildschirm mittels einer Software (NIS-Elements Version BR 2.10, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland). Vermessen werden die Plaquefläche und die Fläche des ursprünglichen Lumens. Errechnet wird der prozentuale Anteil der Plaquefläche am Lumen für die Aortenwurzel und für die Aortenklappe.

3.2.8. Aufarbeitung der Aortenbögen

Ölrot-Färbung

In den Aortenbögen der ApoE^{-/-}-Mäuse wird *en face* die Plaquegröße ausgemessen. Die fetthaltigen atherosklerotischen Plaques lassen sich mit einer Ölrot-Färbung darstellen. Die Aortenbögen werden nach der Entnahme mit 4%igem PFA gespült. Das Gewebe wird mindestens 24h in PFA fixiert, wodurch die Proteine denaturiert und vernetzt werden. Restliches Gewebe, das noch am Aortenbogen haftet, wird entfernt. Jetzt kann die Ölrot-Färbung durchgeführt werden. Zunächst wird das Gewebe für zwei Minuten in destilliertes Wasser gegeben, anschließend erfolgt eine Überführung für drei Minuten in 60%iges Ethanol. Im nächsten Schritt erfolgt für 20 bis 30 Minuten die Färbung in der zuvor filtrierten Ölrot-Gebrauchslösung. Von dort werden die Aortenbögen noch einmal für zwei Minuten in destilliertes Wasser gegeben. Nun wird der zu vermessende Aortenbogen in einer Petrischale zur Anfertigung der Bilder und zur Ausmessung positioniert und anschließend mit einem Deckgläschen fixiert. Der Aortenbogen wird dabei vollständig von einer isotonischen NaCl-Lösung umspült.

Auswertung

Die Aortenbögen werden durch ein Mikroskop (Axiovert 200 Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit integrierter Kamera in 25facher Vergrößerung fotografiert. Vermessen werden die Gefäße am Bildschirm mit der AxioVision Software (Rel.4.6, Zeiss). Zuerst wird am Bildschirm die äußere Kontur umfahren. Die Software berechnet daraus die Fläche des Aortenbogens. In die Messung gehen ein kurzes Stück der Gefäßabgänge von Truncus brachiocephalicus, A. carotis communis sinistra und A. subclavia sinistra ein. Als Nächstes werden die Plaques ausgemessen und schließlich der prozentuale Anteil der Plaquefläche an der Gesamtfläche des Aortenbogens berechnet. Es werden pro Gruppe sieben Aortenbögen ausgewertet. Die

3. Eigene Untersuchungen

Proben stammen von den ApoE^{-/-}-Mäusen, die 14 Tage nach der Drahtdenudation der A. carotis communis mit dem anti-CD147-AK bzw. mit der Isotyp-Kontrolle behandelt wurden.

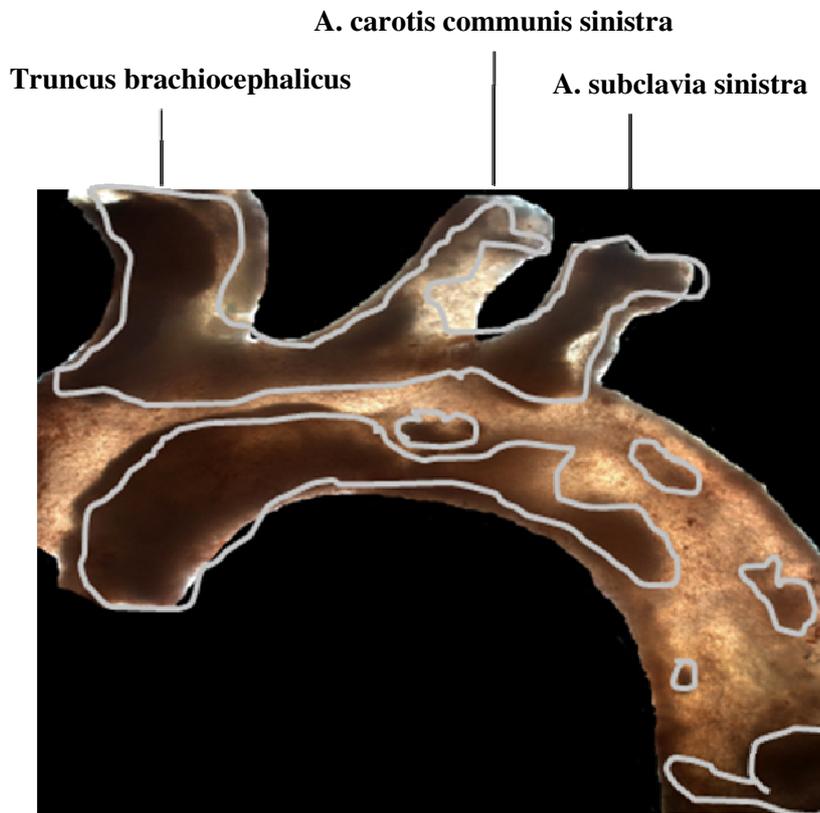


Abb.20: Aortenbogen *en face* einer ApoE^{-/-}-Maus mit markierten Plaques.

3.2.9. Immunhistochemie

In dieser Arbeit wird von den denudierten Gefäßen der ApoE^{-/-}-Mäusen eine immunhistochemische Färbung zum Nachweis von MAC3-positiven Zellen angefertigt. MAC3 ist ein Antigen auf Gewebsmakrophagen von Mäusen. In der vorliegenden Arbeit wird der Antikörperklon M3/84 verwendet.

Die Immunhistochemie dient dazu, selektiv bestimmte Proteine unter Zuhilfenahme von Antikörpern sichtbar zu machen. Es kommt zu einer Antigen-Antikörper-Bindung. Dadurch ist es möglich, bestimmte Zelltypen im Gewebe selektiv darzustellen. Es wird unterschieden zwischen einer direkten und indirekten Methode. In der direkten Methode bindet der Antikörper an sein Antigen. Der Antikörper ist bereits an ein Enzym gekoppelt. Durch die Zugabe eines Substrates wird ein Farbstoff gebildet, dadurch wird der gebundene Antikörper sichtbar. Doch diese Methode wird heute nur noch selten eingesetzt.

In der indirekten Methode wird zwischen einem primären (PAK) und einem sekundären Antikörper (SAK) unterschieden. Der PAK bindet an sein Antigen und der SAK setzt sich auf das Fc-Fragment des PAK. Hier ist der SAK an ein Enzym gekoppelt und durch die Zugabe eines Substrates kommt es zu einer Farbreaktion. Es können mehrere Sekundärantikörper an einem Primärantikörper binden, dies hat eine Verstärkung des Signals zur Folge. (T Boenisch et al. 2003) In diese Arbeit wurde als Enzym die Peroxidase verwendet und die DAB-Lösung liefert das nötige Substrat.

Ablauf der immunhistochemischen Färbung

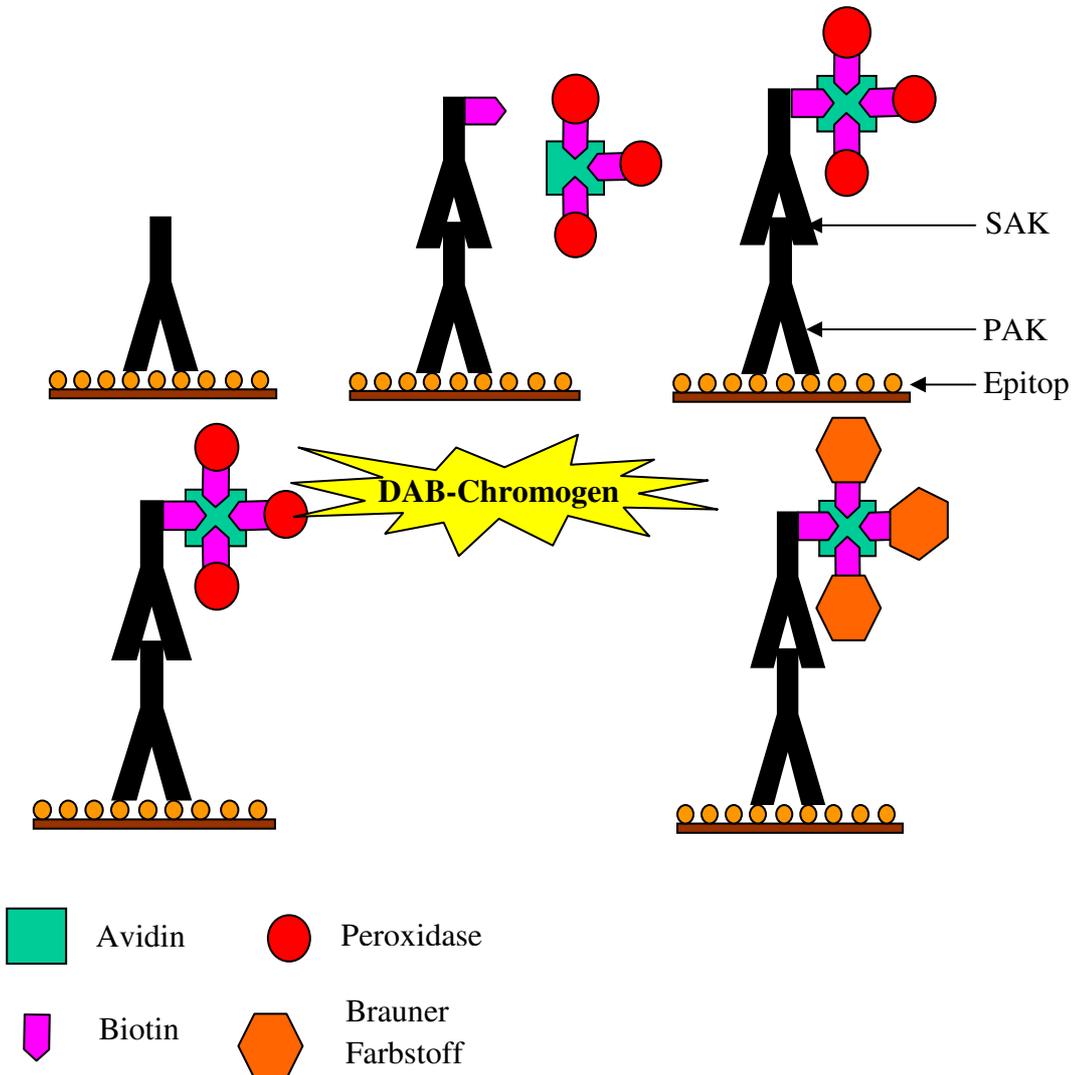


Abb.21: Schematische Darstellung der indirekten Immunhistochemie.

Avidin oder StreptAvidin haben eine starke Affinität zum Biotin. Es verfügt über vier Bindungsstellen für Biotin. Der am Primärantikörper (PAK) gebundene, biotinylierte sekundäre Sekundärantikörper (SAK) ist bereits kovalent mit Biotin verbunden. Beim Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex ist die Peroxidase an Biotin gekoppelt. In diesem Komplex sind drei Bindungsstellen des Avidins von Biotin belegt und die vierte noch freie Bindungsstelle bindet an Biotin des Sekundärantikörpers. Es kommt zu einer Komplexbildung, bestehend aus den enzymmarkierten Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexen mit dem biotinylierten SAK.

(modifiziert nach T Boenisch et al. 2003)

3. Eigene Untersuchungen

Zuerst werden die Paraffinschnitte mit Roti-Histol[®] entparaffiniert und einer absteigenden Alkoholreihe zugeführt. Nach einem Bad im PBS werden die Schnitte in Citratpuffer (pH6) gekocht, um die durch die Fixierung vernetzten Bindungsstellen für den Antikörper wieder zugänglich zu machen. Nach einem Waschvorgang in Tween[®]-PBS (0,05%) werden die Schnitte für 15min in 3% H₂O₂ (verdünnt mit Methanol) überführt. Hierdurch wird die gewebeigene Peroxidase blockiert. Die Schnitte werden erneut gewaschen. Dann werden die Schnitte für die der MAC3-Färbung mit 10%igem Kaninchenserum inkubiert. Das Serum stammt immer aus der gleichen Spezies wie der Sekundärantikörper und verhindert eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers an Kollagen oder Bindegewebe, indem diese Stellen schon vorher vom Serum besetzt werden. Auch der Zusatz von 1%igem BSA in PBS zur Antikörperverdünnung dient der Absättigung elektrostatischer Bindungen und soll eine unspezifische Hintergrundfärbung reduzieren. Die Inkubation erfolgt in einer feuchten Kammer, so dass die Schnitte nicht austrocknen. Anschließend wird das Serum abgegossen und die Schnitte werden mit dem Primärantikörper, bei der MAC3-Färbung rat anti-mouse MAC3mAb, bzw. mit dem entsprechenden IgG als Negativkontrolle beschichtet. Nach der Antikörperinkubation werden die Schnitte erneut mit Tween-PBS (0,05%) gewaschen. Danach werden die Schnitte mit dem SAK (biotinylierter rabbit anti-rat) inkubiert. Anschließend folgt ein erneutes Waschen. Nach der Inkubation der Schnitte mit dem StreptABCComplex/HRP folgt ein erneuter Waschvorgang. Durch die Zugabe des Substrates in Form der DAB-Lösung, wird mit Hilfe der gebundenen Meerrettich-Peroxidase ein brauner Farbstoff gebildet und dadurch die Bindung der Antikörper sichtbar gemacht. Es folgt die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes. Die DAB-Lösung ist ein Elektronendonator. Das Chromogen fördert die Katalyse vom H₂O₂. Die Oxidation des Chromogens wird von der Peroxidase katalysiert. Als Folge bildet sich ein brauner Farbstoff. Dieser ist in Ethanol unlöslich. Wenn sich eine ausreichende Braunfärbung eingestellt hat, wird die Reaktion durch einen erneuten Waschvorgang gestoppt. Mit einer Gegenfärbung in Mayers Hämalaun werden die Zellkerne dargestellt. Nach dem Bläuen der Schnitte erfolgt eine Entwässerung in absteigender Alkoholreihe und nach einem Bad im Roti-Histol[®] das Eindecken mit Eukitt[®].

Protokoll für die Immunhistochemie:

1.) Entparaffinierung:

Die Schnitte werden mit Roti-Histol[®] vom Paraffin befreit, anschließend folgt eine absteigende Alkoholreihe.

2 x 10min	Roti-Histol [®]
2 x 5min	100% Ethanol
5min	95% Ethanol
5min	70% Ethanol
30sec	Aqua dest.

2.) Citratpuffer:

Um die Antigene für die Antikörper leichter zugänglich zu machen, werden die Schnitte in Citratpuffer mit Hilfe einer Mikrowelle gekocht.

15min	kochen im Citratpuffer (pH6)
-------	------------------------------------

3.) Abkühlen:

Die Schnitte müssen jetzt langsam auf Raumtemperatur abgekühlt werden. Dazu wird das Gefäß mit dem Citratpuffer und den Schnitten in ein größeres gestellt und dieses kontinuierlich mit kaltem Wasser geflutet.

4.) Waschen:

3 x 5min	PBS
----------	-----

5.) Blockade der endogenen Peroxidase:

Zur Blockade der endogenen Peroxidase erfolgt ein Bad in 3% H₂O₂ in Methanol.

15min	3% H ₂ O ₂ in Methanol
-------	---

6.) Waschen:

3 x 2min	0,05% Tween [®] -PBS
----------	----------------------------------

3. Eigene Untersuchungen

7.) Fettstift:

Um das Verlaufen der Antikörper zu verhindern, werden die Präparate mit einem Fettstift umfahren.

8.) Serum:

Die Schnitte werden mit Serum beschichtet und in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wird das Serum abgeschüttet.

30min	Serum verdünnt in 1% BSA
-------	--------------------------------

9.) Primärantikörper:

Als Nächstes werden die Schnitte mit dem Primärantikörper inkubiert. Auf einem Objektträger befinden sich drei Schnitte. So wird ein Schnitt mit dem Primärantikörper beschichtet, der zweite mit PBS und der dritte mit der IgG-Kontrolle.

1h	PAK bzw. IgG in 1% BSA verdünnt
----	---------------------------------------

10.) Waschen:

5 x 5min	0,05% Tween®-PBS
----------	---------------------

11.) Sekundärantikörper:

Auf alle Schnitte wird der Sekundärantikörper gegeben.

30min	SAK in 1% BSA verdünnt
-------	---------------------------

12.) Waschen:

5 x 5min	0,05% Tween®-PBS
----------	---------------------

3. Eigene Untersuchungen

13.) StreptABComplex/HRP:

Alle Schnitte werden mit StreptABComplex/HRP bedeckt. Der Avidin-Biotin-PeroxidaseKomplex bindet mit der vierten freien Bindungsstelle am Biotin des SAK.

30min	Strept ABComplex /HRP
-------	-----------------------------

14.) Waschen:

5 x 5min	0,05% Tween®-PBS
----------	---------------------

15.) DAB-Lösung:

DAB-Lösung wird auf die Schnitte getropft und unter dem Mikroskop wird die Braunfärbung kontrolliert.

3-7min	DAB
--------	-----

16.) Waschen:

5 x 2min	0,05% Tween®-PBS
----------	---------------------

17.) Hämalaun:

Zur Darstellung der Zellkerne erfolgt eine Gegenfärbung mit Hämalaun.

2min	Hämalaun
------	----------

18.) Bläuen: im lauwarmen fließenden Leitungswasser.

10min	Bläuen
-------	--------

19.) Alkoholreihe:

Um den Schnitten das Wasser zu entziehen, werden sie einer aufsteigenden Alkoholreihe zugeführt. Dann werden die Schnitte mit Eukitt® eingedeckt.

3sec	70% Ethanol
3sec	80% Ethanol
3sec	95% Ethanol
2 x 5min	100% Ethanol
3min	Roti-Histol®

Tab.4:Auflistung der verwendeten Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper

	Primär-Antikörper	Verdünnung	Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Serum
MAC3	Purified Rat anti-mouse MAC-3 (32,25µg/ml), BD Biosciences Pharmingen	1:650	Polyclonal rabbit anti-rat immunoglobulins/ Biotinylated, Dako	1:300	10% Kaninchenserum, Dako

Auswertung

Von vier ApoE^{-/-}-Mäusen werden jeweils zwei Schnitte immunhistochemisch auf MAC3-positive Zellen gefärbt. Die Fläche der Media und Neointima wird bei 100facher Vergrößerung, wie im Kapitel 3.2.6. bereits erläutert, ausgemessen. Es folgt ein separates Auszählen der Zellen in der Neointima und in der Media bei 400facher Vergrößerung. Es wird der Mittelwert der Zellzahl pro mm² berechnet.

Materialien und Reagenzien für HE-, EvG-, Ölrot-Färbung und Immunhistochemie

Materialien:

- Objektträger 25x75x1mm, Super Frost[®] Plus R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
- Deckgläser 24x50mm, R. Langenbrinck, Emmingen, Deutschland
- Liquid Blocker PAP-Pen Science Service, Japan

Chemikalien:

- BSA Albumin bovine serum, Fraction V, $\geq 96\%$ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland,
- DAB+Chromogen DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
- Destilliertes Wasser Millipore Corporation, Billerica, USA
- Eosin G Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe, Deutschland
- Essigsäure (Eisessig) 100% Merck KG, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol 99% SAV LP, Flintsbach, Deutschland
- Eukitt[®] O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland
- Hämalaunlösung Mayers, Merck KG, Darmstadt, Deutschland
- Kaisers Glyceringelatine Merck, Darmstadt, Deutschland
- Methanol Merck KG, Darmstadt, Deutschland
- Natriumchlorid AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Natriumcitrat AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Oil Red O Sigma, Reichenhofen, Deutschland
- PBS Tablets Gibco, UK
- Pikrinsäure-Lösung, 1,2% AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Rabbit Serum DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
- Resorcin-Fuchsin Weigert, Chroma[®], Münster, Deutschland
- Roti[®]-Histol Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe, Deutschland

3. Eigene Untersuchungen

- Säurefuchsin, 2% Fluka, Buchs, Deutschland
- 25% Salzsäure Rotipuran® Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- StreptABComplex/HRP DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
- Tris Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
- Tween® 20 Merck, Hohenbrunn, Deutschland
- Wasserstoffperoxid 30% Merck KG, Darmstadt, Deutschland
- Weigerts Hämatoxylin-Lösung A Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
- Weigerts Hämatoxylin-Lösung B Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
- Zitronensäure 99,5% A.C.S. Reagenz, Aldrich, Steinheim

Lösungen:

- Picrofuchsin
166,6ml 1,2% Pikrinsäure
8,3ml 2% Säurefuchsin
0,875ml 2% Essigsäure
- Stammlösung für Ölrot-Färbung
5g Ölrot in 1 Liter 100% Ethanol
- Gebrauchslösung für Ölrot-Färbung
60ml Stammlösung
40ml Aqua dest.
- HCl-Alkohol
8ml 25% Salzsäure
192ml 70% Ethanol
- 1% BSA
"Albumin bovine serum" 1g BSA in 100ml PBS
- PBS
"Phosphat buffered saline" 2 PBS-Tabletten auf 1 L
Aqua dest.
- 0,05% Tween-PBS
500µl Tween auf 1l PBS
- Citratpuffer (pH6)
41ml 0,1M Natriumcitrat
9ml 0,1M Zitronensäure
450ml Millipore

3. Eigene Untersuchungen

- 3% H₂O₂ 30ml 30% H₂O₂
270ml Methanol
- TBS (pH7,6) 0,6g Tris
0,87g NaCl
mit Millipore auf 100ml auffüllen
- Strept ABCComplex/HRP 5ml TBS (pH7,6)
1 Tropfen Reagenz A
1 Tropfen Reagenz B

Antikörper:

- Primär-Antikörper rat anti-mouse MAC3, 32,25 µg/ml; BD Pharmingen
- Negativkontrolle Rat IgG1 kappa monoclonal Isotypcontrol (0,5mg/ml)
abcam
- Sekundär-Antikörper Polyclonal Rabbit Anti-Rat Immunoglobulins/
Biotinylated (0,84g/L) DakoCytomation, Dänemark

3.2.10. Statistik

Die Messungen werden mit dem Programm Excel dokumentiert und ausgewertet. Die Ergebnisse werden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Ergebnisse werden mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software, Inc.) mittels T-Test auf ihre Signifikanz getestet und gelten als signifikant wenn $p < 0,05$ ist.

3.3. Ergebnisse

C57BL/6J-Mäusen wird nach einer Drahtdenudation der A. carotis communis für 14 Tage das Cyclosporinderivat NIM811 i.p. injiziert, um Cyclophilin A zu inhibieren. Die Vergleichsgruppe wird mit dem Lösungsmittel behandelt. Drei Wochen nach der Operation erfolgen die Tötung und die Entnahme der Karotiden. An den EvG-gefärbten Schnitten werden die umschließenden Flächen der Lamina elastica externa, der Lamina elastica interna und das freie Lumen mit Hilfe eines Computerprogrammes ermittelt. Aus diesen Daten werden die Flächengrößen der Neointima, der Media und der Stenosegrad berechnet. Die Rechenschritte sind im Kapitel Material und Methoden (Kapitel 3.2.6) näher erläutert.

In der zweiten Versuchsgruppe wird den C57BL/6J-Mäusen für die Blockade von CD147 ein anti-CD147-AK und der Kontrollgruppe die Isotyp-Kontrolle verabreicht. In der dritten Versuchsreihe werden ApoE^{-/-}-Mäuse operiert und ebenfalls mit dem anti-CD147-AK bzw. der Isotyp-Kontrolle behandelt. Der jeweilige Versuchsablauf ist mit der oben bereits beschriebenen Gruppe identisch. Die ApoE^{-/-}-Mäuse werden jedoch erst vier Wochen nach der Operation getötet. Nach einer Ölrot-Färbung der entnommenen Aortenbögen der ApoE^{-/-}-Mäuse, wird *en face* die Plaquegröße ermittelt. An Gefrierschnitten der Aortenklappe und der Aortenwurzel wird ebenfalls die Größe der Plaques bestimmt. Von vier ApoE^{-/-}-Mäusen, die mit anti-CD147-AK bzw. mit der Isotyp-Kontrolle behandelt wurden, wird eine Immunhistochemie gegen MAC3-positive Zellen an jeweils zwei Schnitten der Karotis angefertigt. Es erfolgt ein separates Auszähleng der Entzündungszellen in der Media und in der Neointima.

In die Beurteilung gehen pro Maus neun Schnitte der denudierten Karotis ein. Von jedem Schnitt wird die Fläche der Media und Neointima und der Stenosegrad in Prozent berechnet. Aus den neun Einzelwerten wird der Mittelwert bestimmt und anschließend wird aus den einzelnen Mittelwerten der Gesamtmittelwert der Gruppe errechnet. Dieser wird für den Vergleich zwischen den Gruppen herangezogen. Die Mäuse weisen unterschiedlich große Karotidendurchmesser auf. Um die Mediafläche und Neointimafläche vergleichen zu können, müssen die Gefäße für die Berechnungen auf eine einheitliche Größe normiert werden. Es wurde eine Fläche der Lamina elastica externa von 350000µm² festgelegt.

3.3.1. Verabreichung von NIM811 bzw. der Lösungsmittelkontrolle an C57BL/6J-Mäuse nach Drahtdenudation

Nach der Drahtdenudation der A. carotis communis werden die Mäuse für 14 Tage mit NIM811 bzw. dem Lösungsmittel behandelt. 21 Tage nach der Operation erfolgt die Tötung der Tiere.

Die Versuchstiergruppe umfasst jeweils sieben Tiere. Von jedem Tier werden neun Schnitte der A. carotis communis für die Auswertung herangezogen.

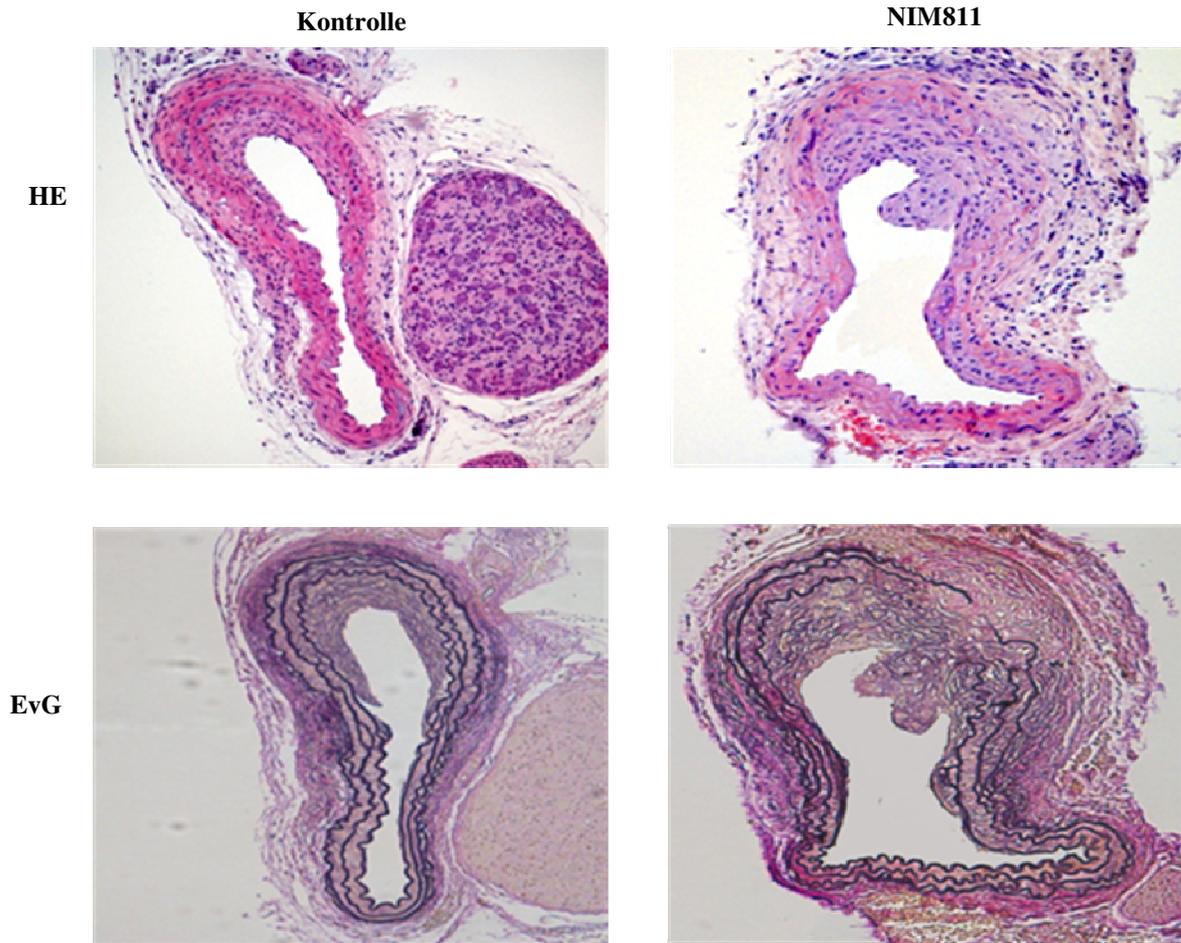


Abb.22:Bei C57BL/6J-Mäusen wird die Neointimabildung durch die Applikation des CyPA-Inhibitors NIM811 nicht beeinflusst.

Bei C57BL/6J-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit NIM811 (30mg/kg KG i.p.) oder mit der Lösungsmittelkontrolle therapiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Schnitte von HE- und EvG-Färbungen drei Wochen nach der Verletzung. (N=7)

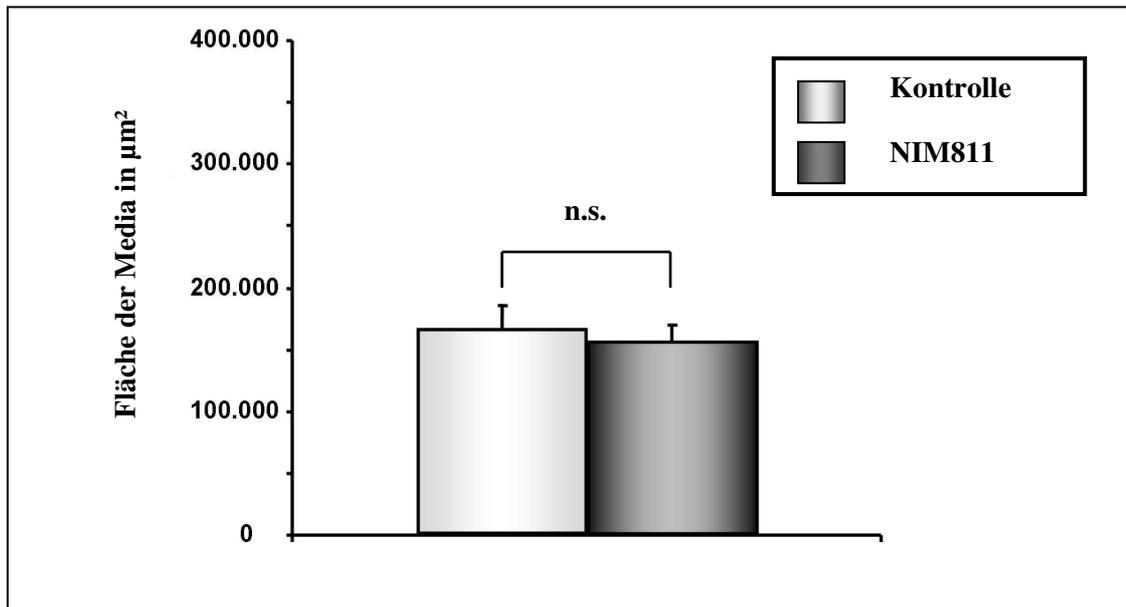


Abb.23: Bei C57BL/6J-Mäusen wird die Fläche der Media durch die Applikation von NIM811 nicht signifikant beeinflusst.

Bei C57BL/6J-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit NIM811 (30mg/kg KG i.p.) oder mit der Lösungsmittelkontrolle therapiert. Die Abbildung zeigt die Fläche der Media drei Wochen nach der Verletzung. (N=7; n.s. nicht signifikant)

Wie das Diagramm in Abbildung 23 veranschaulicht, ist die Fläche der Media nach der Gabe von NIM811 bzw. dem Lösungsmittel gleich groß. Der Mittelwert der Mediafläche von den NIM811 behandelten C57BL/6J-Mäusen nimmt eine Fläche von $154969 \pm 14277 \mu\text{m}^2$ ein. Die Kontrollgruppe hat eine Mediafläche von $165245 \pm 18262 \mu\text{m}^2$. Zwischen der mit NIM811 behandelten Versuchsgruppe und den Kontrolltieren besteht in der Mediafläche kein signifikanter Unterschied.

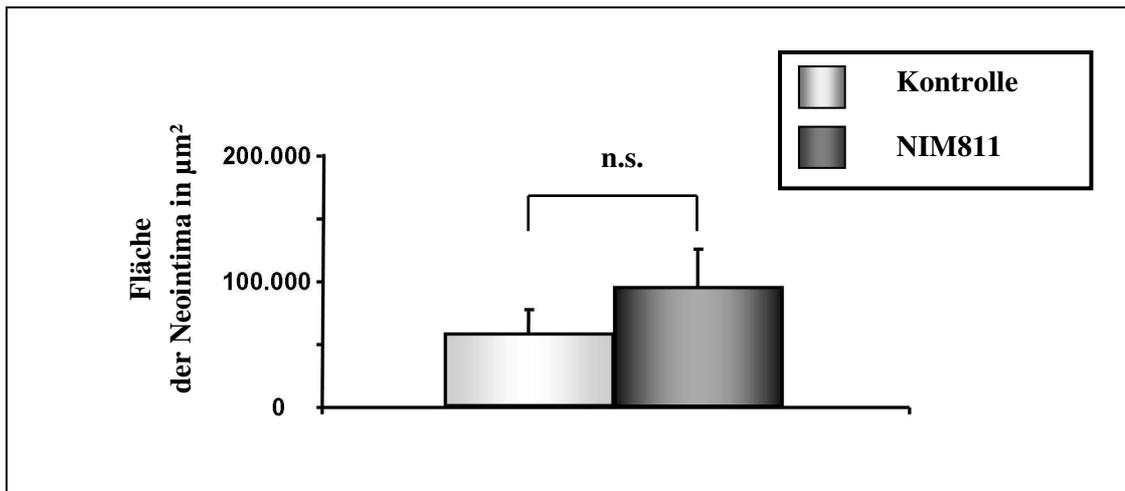


Abb.24: Bei C57BL/6J-Mäusen wird die Fläche der Neointima durch die Applikation von NIM811 nicht signifikant beeinflusst.

Bei C57BL/6J-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit NIM811 (30mg/kg KG i.p.) oder mit der Lösungsmittelkontrolle therapiert. Die Abbildung zeigt die Fläche der Neointima drei Wochen nach der Verletzung. (N=7; n.s. nicht signifikant)

In der Graphik 24 wird die Fläche der Neointima nach CyPA-Blockade durch NIM811 mit der Kontrollgruppe nach Lösungsmitteltherapie verglichen. Der Mittelwert der Neointimafläche ist $93502 \pm 31716 \mu\text{m}^2$ bei der mit NIM811 behandelten Gruppe und bei der Kontrollgruppe $57267 \pm 18599 \mu\text{m}^2$ groß. Es besteht kein signifikanter Unterschied.

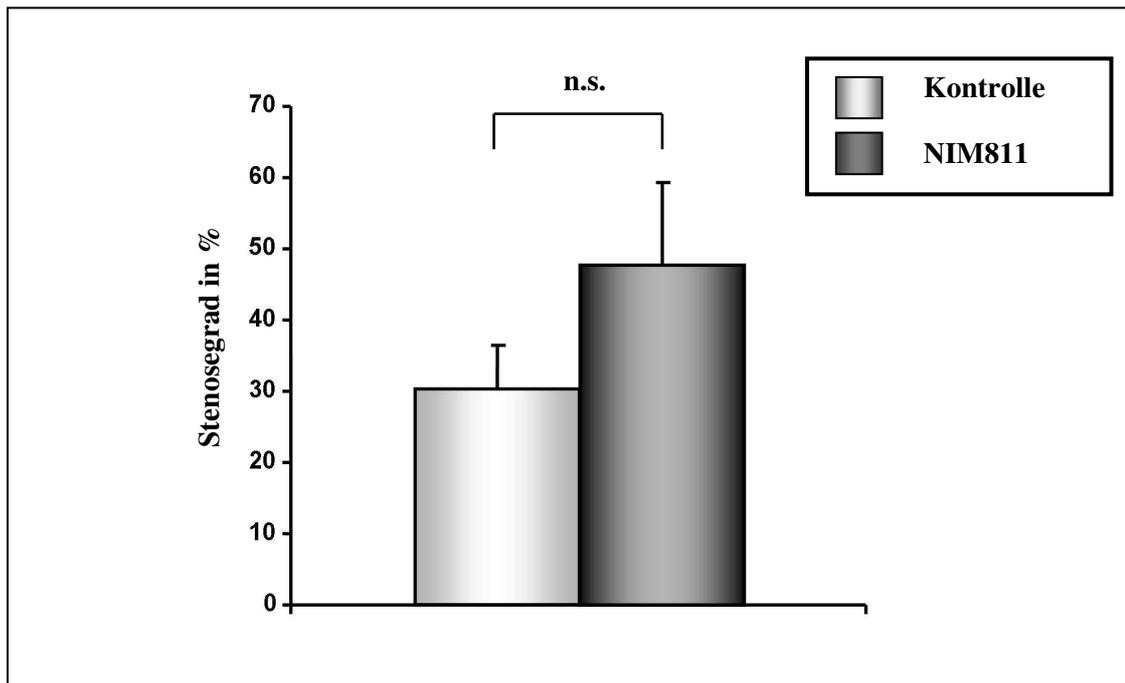


Abb.25: Bei C57BL/6J-Mäusen wird der Stenosegrad durch die Applikation von NIM811 nicht signifikant beeinflusst.

Bei C57BL/6J-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit NIM811 (30mg/kg KG i.p.) oder mit der Lösungsmittelkontrolle therapiert. Die Abbildung zeigt den Stenosegrad drei Wochen nach der Verletzung. (N=7; n.s. nicht signifikant)

Im Diagramm 25 ist der Stenosegrad nach Verabreichung von NIM811 der Lösungsmittelbehandlung gegenübergestellt. Es stellt sich ein Stenosewert nach NIM811-Behandlung von $47,8 \pm 11,5\%$ dar. Die Kontrollgruppe hat einen im Trend kleineren Stenosegrad von $30,3 \pm 6,3\%$. Es besteht kein signifikanter Unterschied.

3.3.2. Verabreichung von anti-CD147-Antikörper bzw. der Isotyp-Kontrolle an C57BL/6J-Mäuse nach Drahtdenudation

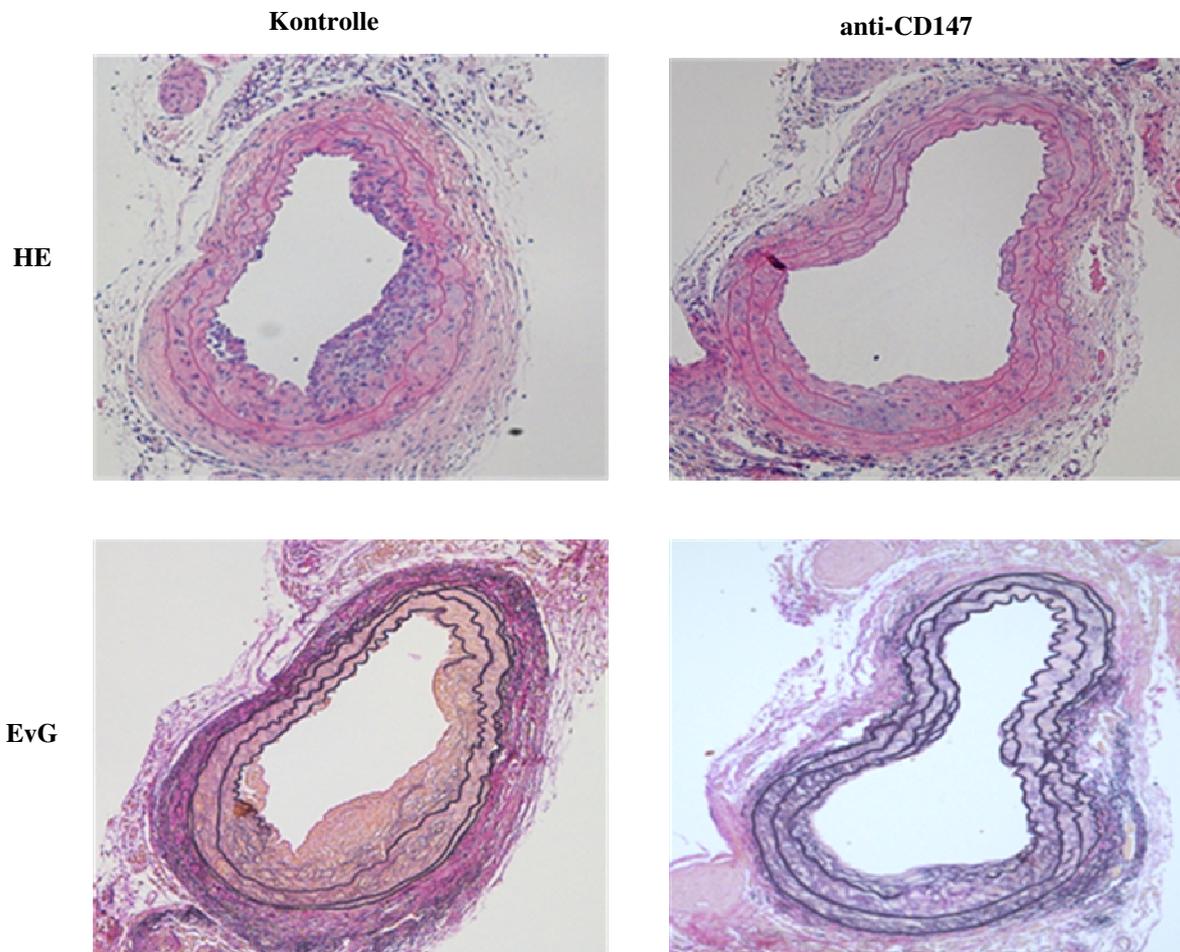


Abb.26: Bei C57BL/6J-Mäusen wird die Neointimabildung durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht beeinflusst.

Bei C57BL/6J-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Schnitte von HE- und EvG-Färbungen drei Wochen nach der Verletzung. (N=7)

3. Eigene Untersuchungen

Nach der Drahtdenudation der A. carotis communis wird den C57BL/6J-Mäusen täglich 14 Tage, für eine antikörpervermittelte Blockade von CD147, anti-CD147-AK bzw. dessen Isotyp-Kontrolle injiziert. Der Versuchsablauf und die Auswertung verlaufen nach der gleichen Methode wie bei der ersten Versuchsgruppe.

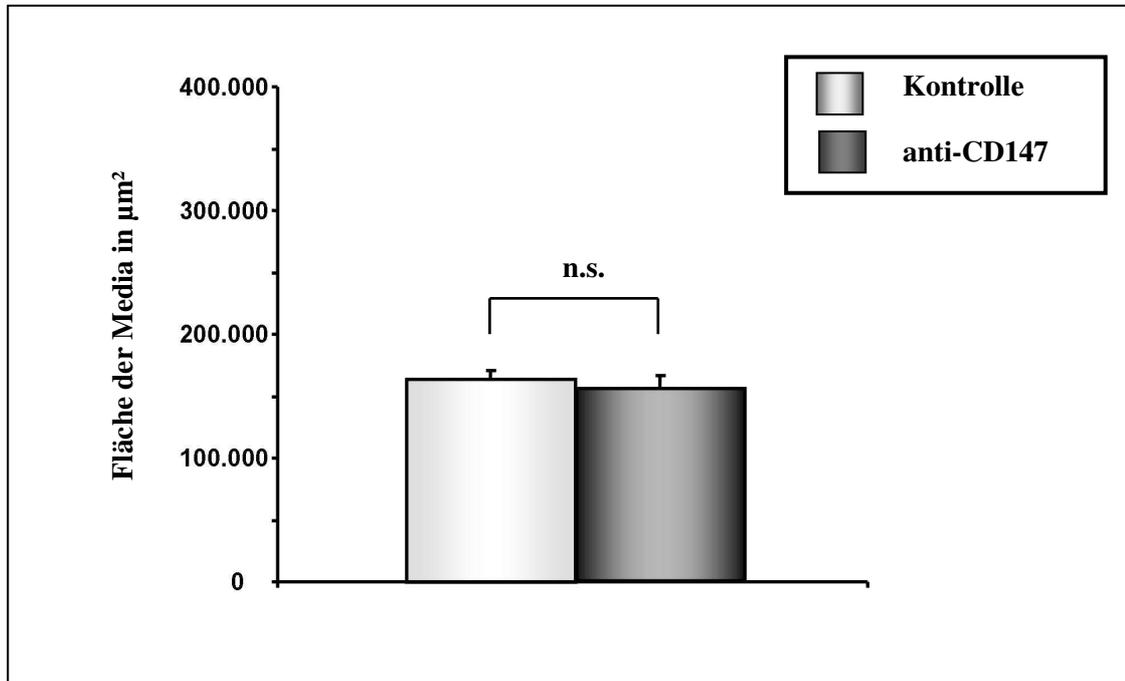


Abb.27: Bei C57BL/6J-Mäusen wird die Fläche der Media durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.

Bei C57BL/6J-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 ($1\mu\text{g/g KG i.p.}$) oder mit einem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Fläche der Media drei Wochen nach der Verletzung. (N=7; n.s. nicht signifikant)

Das Ergebnis der Auswertung der Mediafläche ist in der Graphik 27 dargestellt. Die Fläche der Media unterscheidet sich nach der anti-CD147-AK-Injektion mit $155412\pm 9894\mu\text{m}^2$ nicht signifikant von der Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von $164431\pm 7232\mu\text{m}^2$.

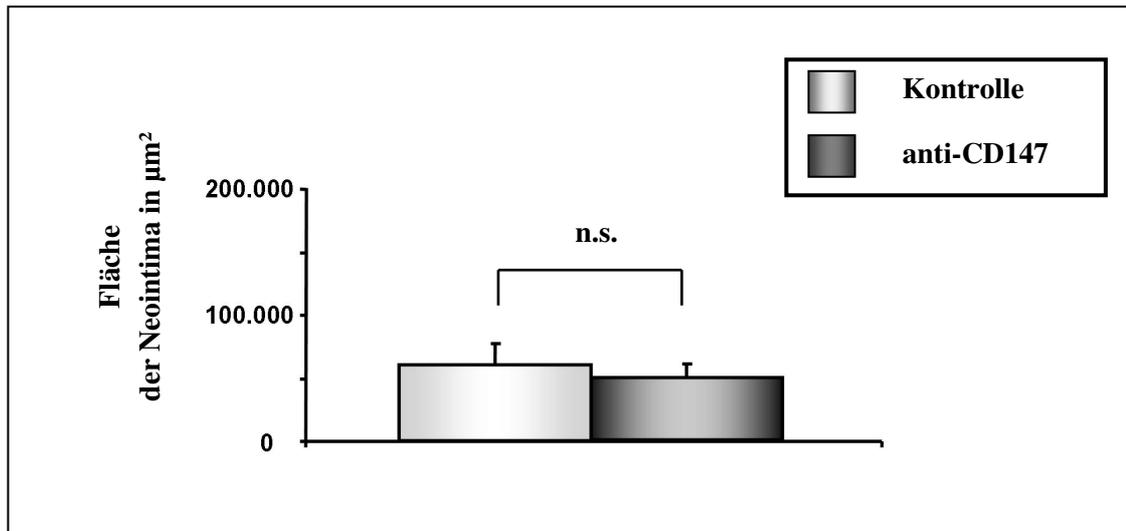


Abb.28: Bei C57BL/6J-Mäusen wird die Fläche der Neointima durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.

Bei C57BL/6J-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 ($1\mu\text{g/g KG i.p.}$) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Fläche der Neointima drei Wochen nach der Verletzung. (N=7; n.s. nicht signifikant)

Wie in Abbildung 28 ersichtlich, ist die Neointimafläche bei den anti-CD147-AK behandelten Tieren nicht kleiner als bei der Kontrollgruppe. Die Fläche der antikörpertherapierten Mäuse hat eine Größe von $48844 \pm 10866\mu\text{m}^2$ gegenüber der Kontrolle mit $59861 \pm 17670\mu\text{m}^2$. Es besteht kein signifikanter Unterschied in der Ausbildung der Neointimafläche zwischen der anti-CD147-AK behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe.

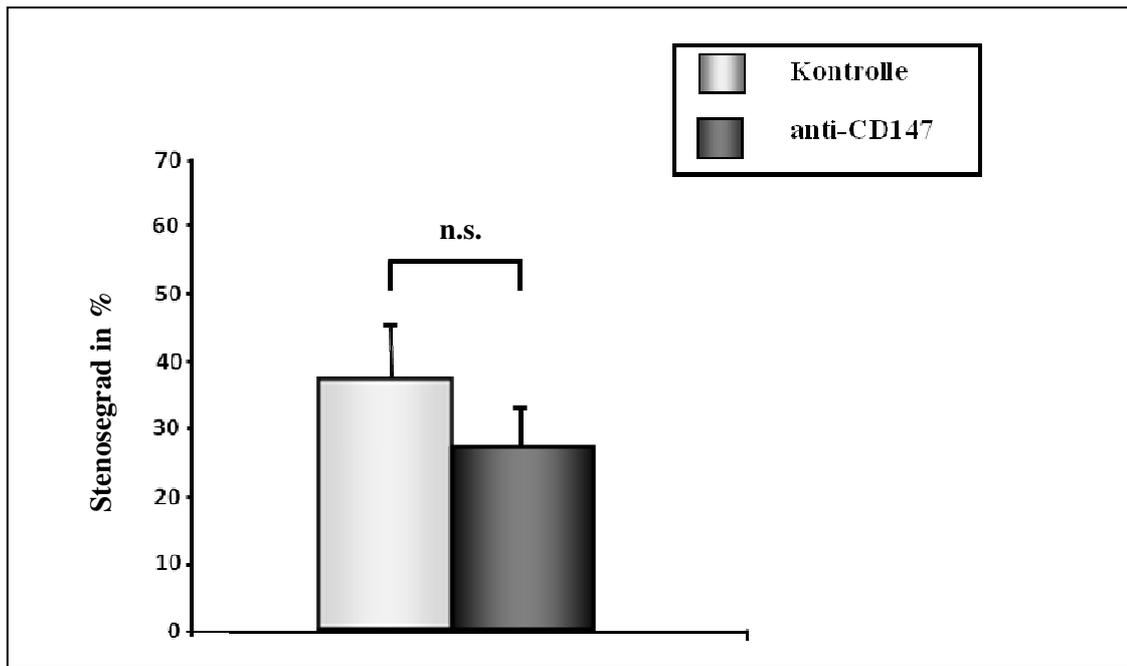


Abb.29: Bei C57BL/6J-Mäusen wird der Stenosegrad durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.

Bei C57BL/6J-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 ($1\mu\text{g/g KG i.p.}$) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt den Stenosegrad drei Wochen nach der Verletzung. (N=7; n.s. nicht signifikant)

In der Graphik 29 wird der Stenosegrad nach antikörpervermittelter Blockade mit der Kontrollgruppe verglichen. In der Tabelle 11 sind die einzelnen Mittelwerte der Stenosebildung in Prozent nach der Drahtdenudation gelistet. Die Versuchsgruppe, die mit dem Antikörper behandelt wurde, zeigt einen Mittelwert von $26,8\pm 5,3\%$. Die Kontrollgruppe hat eine mittlere Stenose von $37,2\pm 7,6\%$. Zwischen der Versuchsgruppe, die einer anti-CD147-AK-Behandlung unterzogen wurde und deren Kontrollgruppe besteht kein signifikanter Unterschied.

3.3.3. Verabreichung von anti-CD147-Antikörper bzw. der Isotyp-Kontrolle an ApoE^{-/-}-Mäuse nach Drahtdenudation

Zusätzlich zu den C57BL/6J-Mäusen wurden ApoE^{-/-}-Mäuse nach einer Drahtdenudation mit einem anti-CD147-AK bzw. mit dem Kontroll-Antikörper behandelt. Es waren für diese Versuchsreihe sieben Mäuse pro Versuchsgruppe vorgesehen. Während der Versuchsstrecke ist damit zu rechnen, dass Tiere versterben oder die Karotiden nicht auswertbar sind. Aus diesem Grund wurden mehr Tiere operiert. Es konnten jeweils neun Tiere nach der AK- bzw. der Isotyptherapie in die Wertung aufgenommen werden. Für eine ausreichende Bildung von atherosklerotischen Plaques erfolgte, im Unterschied zu den C57BL/6J-Mäusen, bei dieser Versuchsgruppe die Tötung erst vier Wochen nach der Operation. Auch hier dienen als Vergleichspunkte mit der Kontrollgruppe die Media- und Intimaflächen und der Stenosegrad in Prozent.

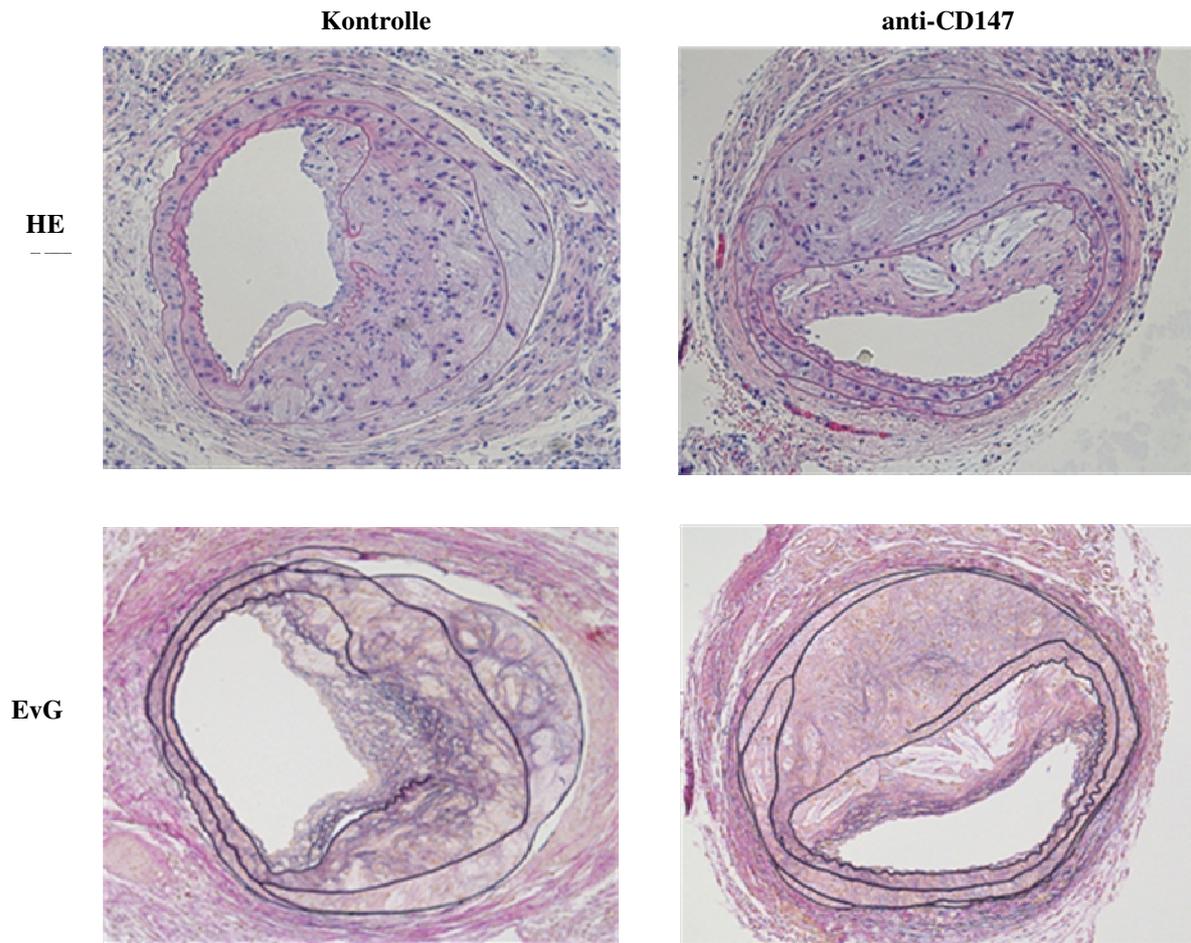


Abb.30: Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Neointimabildung durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht beeinflusst.

Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Schnitte von HE- und EvG-Färbungen vier Wochen nach der Verletzung. (N=9)

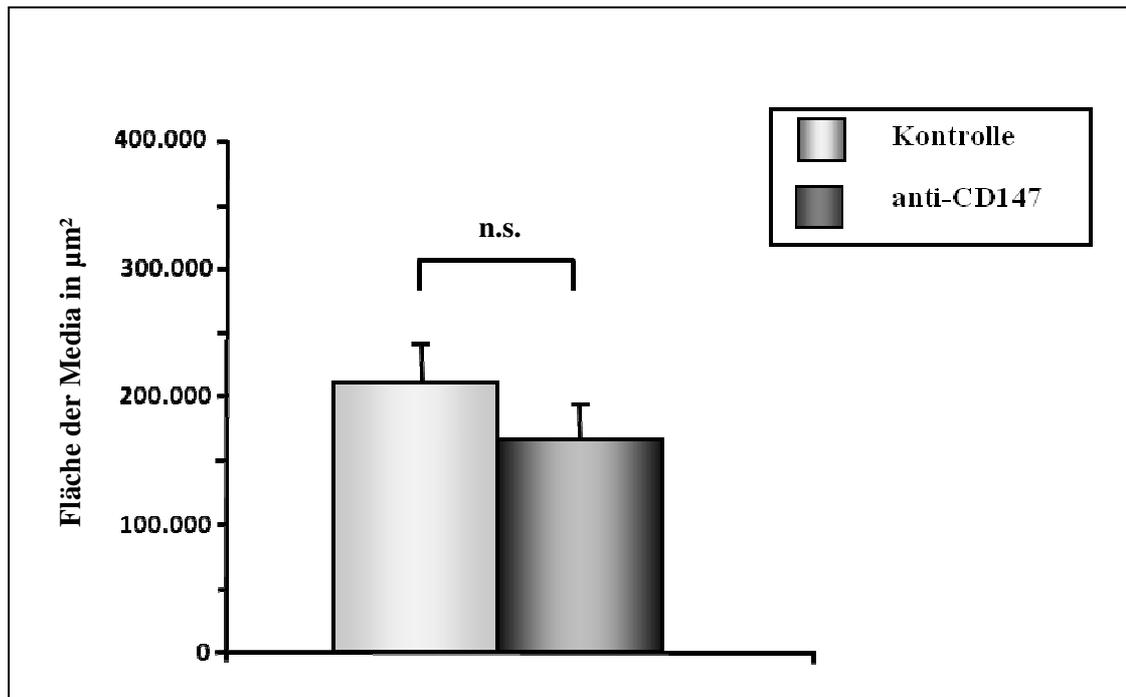


Abb.31: Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Fläche der Media durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.

Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1 μ g/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Fläche der Media vier Wochen nach der Verletzung. (N=9; n.s. signifikant)

Auch bei den ApoE^{-/-}-Mäusen wird für die Berechnung der Mediafläche, die Fläche innerhalb der Lamina elastica externa, auf eine einheitliche Größe von 350000 μm^2 normiert.

Das vorangehende Diagramm veranschaulicht, dass die Mediafläche bei den anti-CD147-AK behandelten Tieren im Trend kleiner ist als bei der Kontrollgruppe. Die Media nimmt nach der AK-Behandlung eine Fläche von 186084 \pm 19477 μm^2 und bei der Kontrollgruppe eine Fläche von 210031 \pm 19103 μm^2 ein. Es liegt allerdings kein signifikanter Unterschied vor.

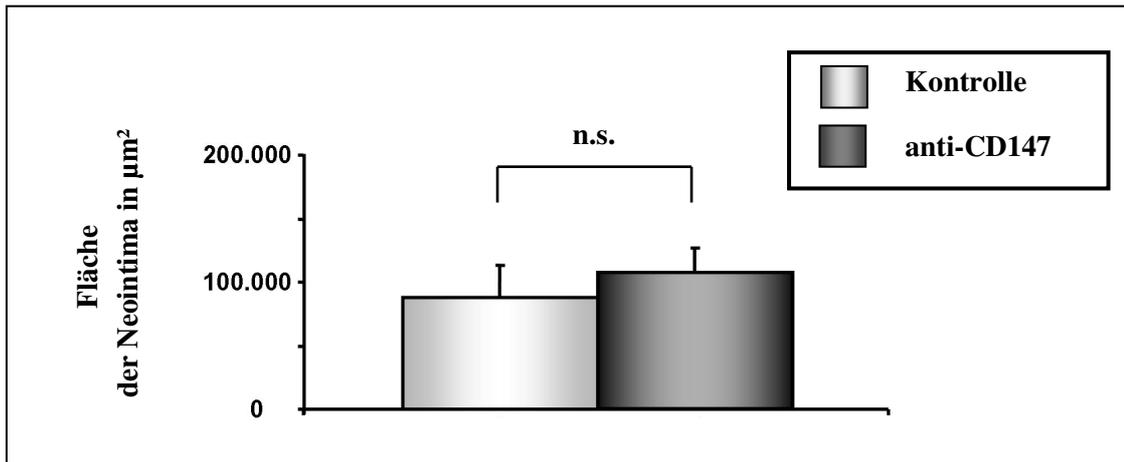


Abb.32: Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Fläche der Neointima durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.

Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1 μ g/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Fläche der Neointima vier Wochen nach der Verletzung. (N=9; n.s. nicht signifikant)

Im Schaubild 32 sind die Fläche der Neointima nach Antikörperblockade und die Isotypkontrolle gegenüber gestellt. Es zeigt sich nach der Antikörperapplikation eine Neointimafläche von $106646 \pm 19269 \mu\text{m}^2$ gegenüber der Isotypbehandlung mit $88162 \pm 24983 \mu\text{m}^2$. Es liegt kein signifikanter Unterschied vor.

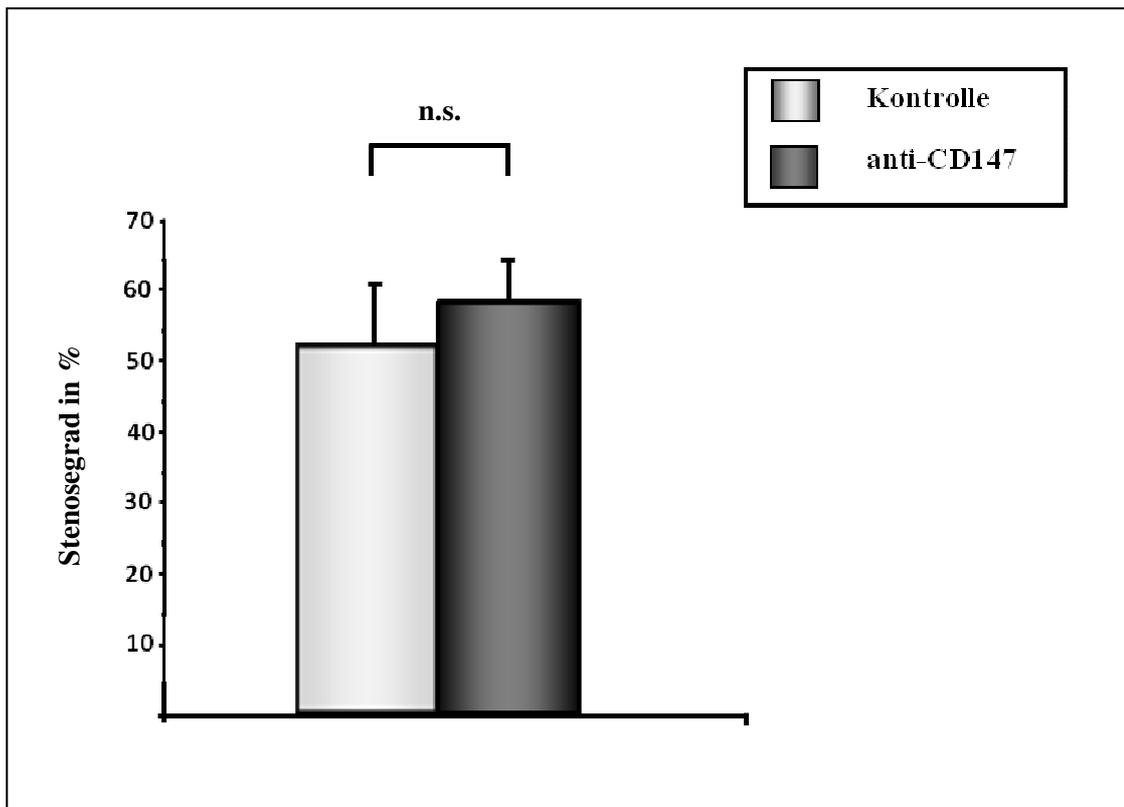


Abb.33: Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird der Stenosegrad durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.

Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt den Stenosegrad vier Wochen nach der Verletzung. (N=9; n.s. nicht signifikant)

Bei den ApoE^{-/-}-Mäusen wird für die Stenosegradberechnung die Mediaverdickung nicht mit einbezogen.

Die Abbildung 33 zeigt, dass der Stenosegrad nach Blockade von CD147 mit 58,3±5,5% kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit 51,9±9,0% ist.

Die denudierten Karotiden der ApoE^{-/-}-Mäuse wurden mit Hilfe einer Immunhistochemie auf MAC3-positive Zellen untersucht. Es wurden von vier Mäusen zwei Schnitte gefärbt.

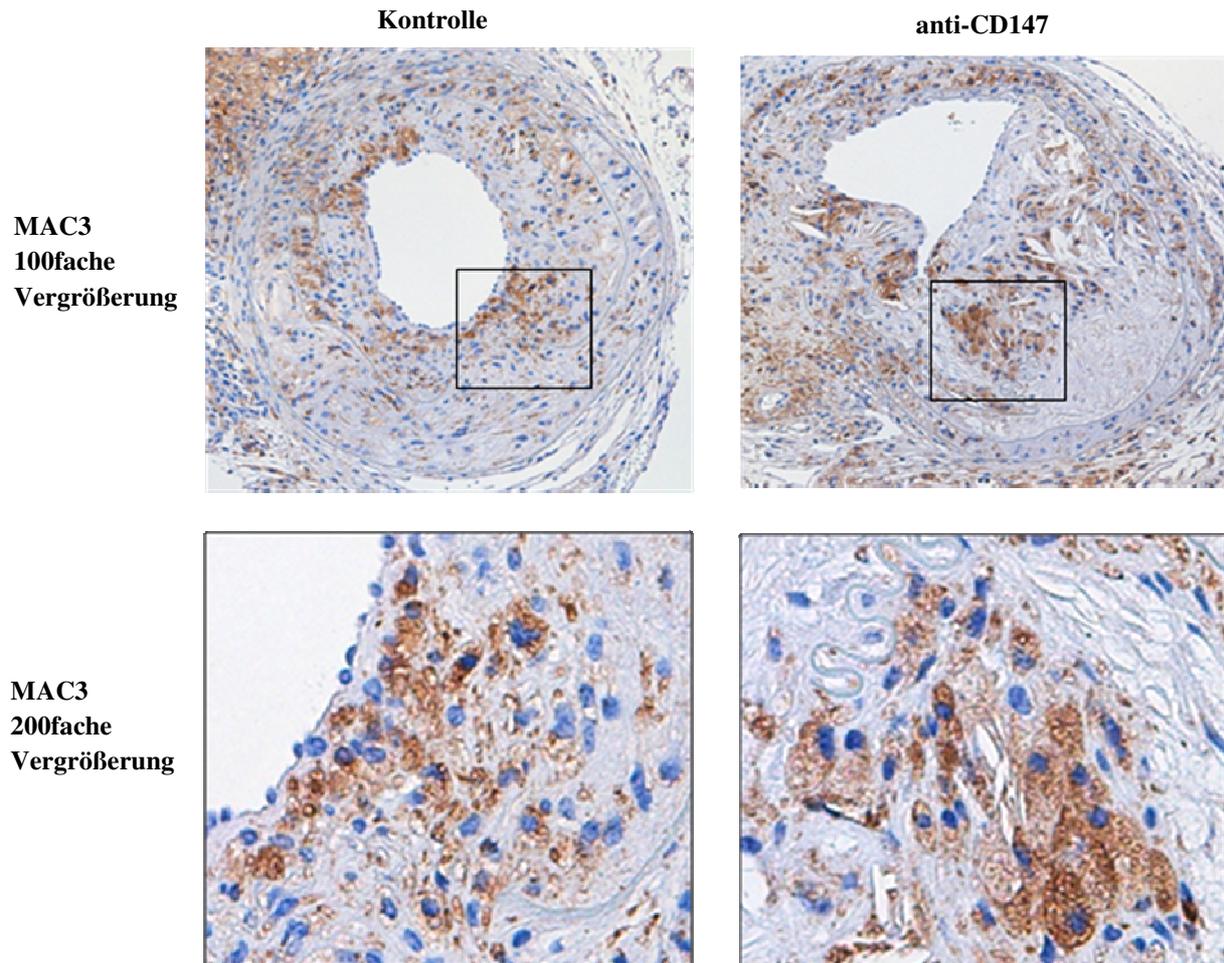


Abb.34: Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Anzahl der MAC3-positiven Zellen in der Media und Neointima durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht beeinflusst.

Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Schnitte von einer Immunhistochemie gegen MAC3-positive Zellen vier Wochen nach der Verletzung. (N=4)

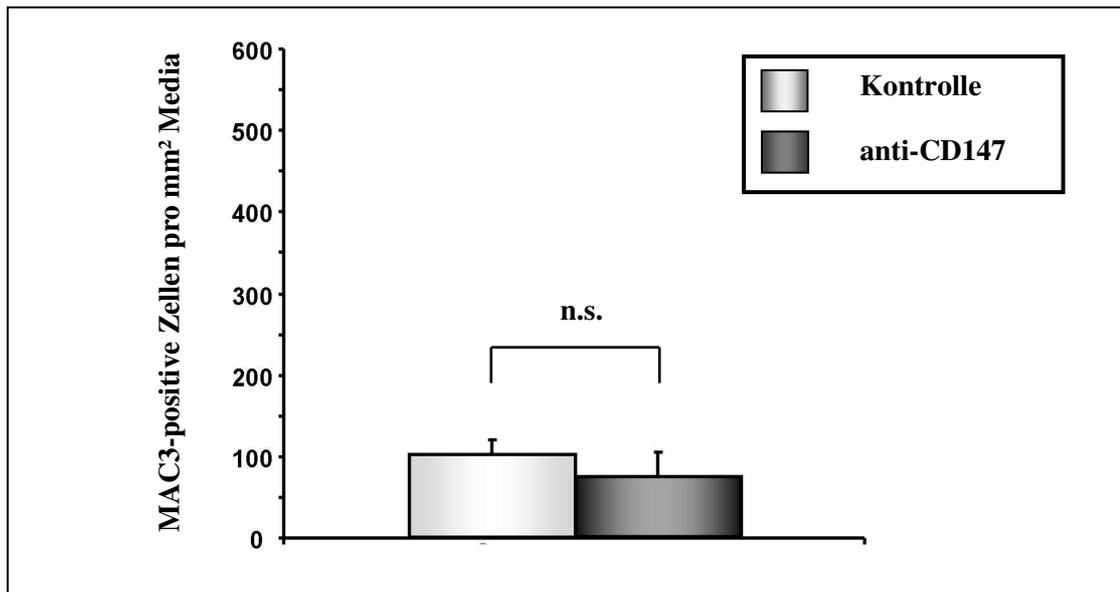


Abb.35: Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Anzahl der MAC3-positiven Zellen in der Media durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.

Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Anzahl MAC3-positiver Zellen in der Media vier Wochen nach der Verletzung. (N=4; n.s. nicht signifikant)

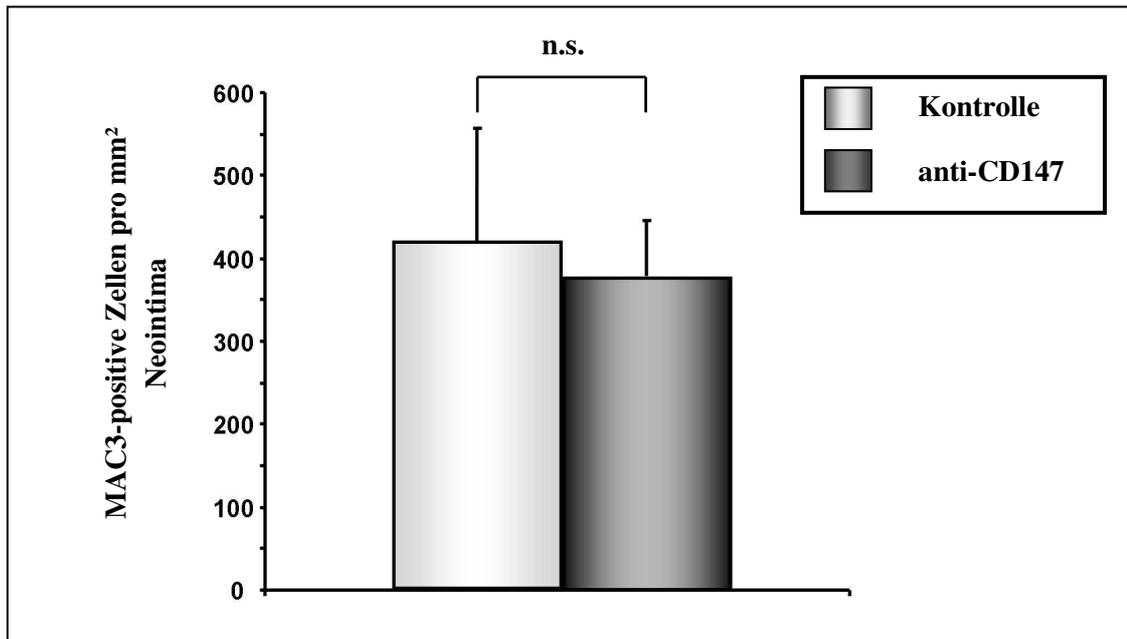


Abb.36: Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Anzahl der MAC3-positiven Zellen in der Neointima durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.

Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Anzahl MAC3-positiver Zellen in der Neointima vier Wochen nach der Verletzung. (N=4; n.s. nicht signifikant)

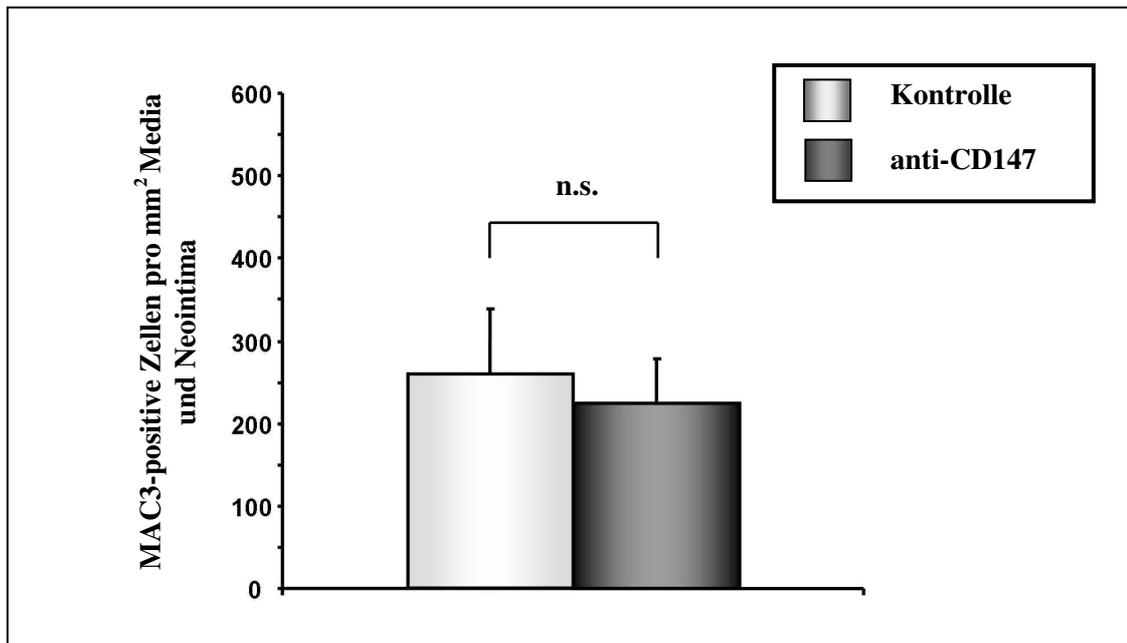


Abb.37: Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Anzahl der MAC3-positiven Zellen in der Media und Neointima durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.

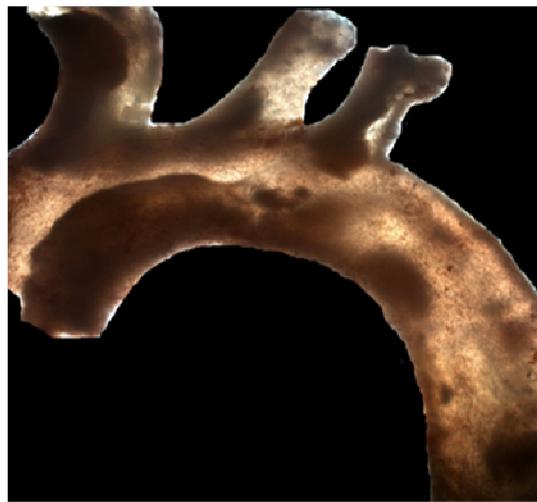
Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Anzahl MAC3-positiver Zellen in der Media und Neointima vier Wochen nach der Verletzung. (N=4; n.s. nicht signifikant)

Die Schaubilder zeigen die Anzahl der MAC3-positiven Zellen in der Media und Neointima nach antikörpervermittelter Blockade von CD147 im Vergleich zur Isotypbehandlung. Bei den anti-CD147-AK behandelten Tieren wurden tendenziell weniger MAC3-positive Zellen in der Neointima und Media ermittelt. Nach der AK-Behandlung beträgt die Anzahl MAC3-positiver in der Media 74 ± 29 Zellen/mm² und in der Neointima 375 ± 68 Zellen/mm². Die Kontrollgruppe weist in der Media 103 ± 18 Zellen/mm² und in der Neointima 417 ± 138 MAC3-positve Zellen/mm² auf. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

C57BL/6J
unbehandelt



ApoE^{-/-}
Kontrolle



ApoE^{-/-}
anti-CD147

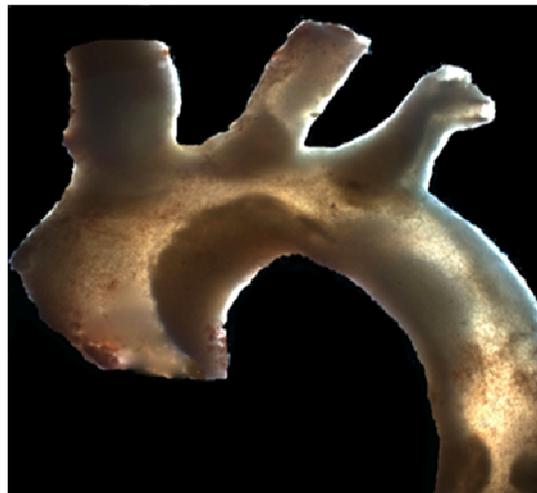


Abb.38: Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Plaqueläche im Aortenbogen durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht beeinflusst.

Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Aortenbögen nach Ölrot-Färbung *en face* einer gesunden C57BL/6J-Maus ohne Plaques und von ApoE^{-/-}-Mäusen vier Wochen nach der Denudation der A. carotis communis. (N=7)

Bei den ApoE^{-/-}-Mäusen findet zusätzlich eine Untersuchung des Aortenbogens, der Aortenklappe und der Aortenwurzel hinsichtlich der Plaquergröße statt. Die Aortenbögen werden zur besseren Darstellung der fettreichen Plaques mit Ölrot gefärbt. Die Ausmessung der Plaquerfläche und der Gesamtfläche des im Sichtfeld liegenden Aortenbogens erfolgt *en face*. Jeweils sieben Aortenbögen von ApoE^{-/-}-Mäusen nach anti-CD147-AK Behandlung bzw. Kontrollbehandlung werden untersucht. Es wird die Plaquerfläche prozentual zur Gesamtfläche des ausgemessenen Aortenbogens angegeben.

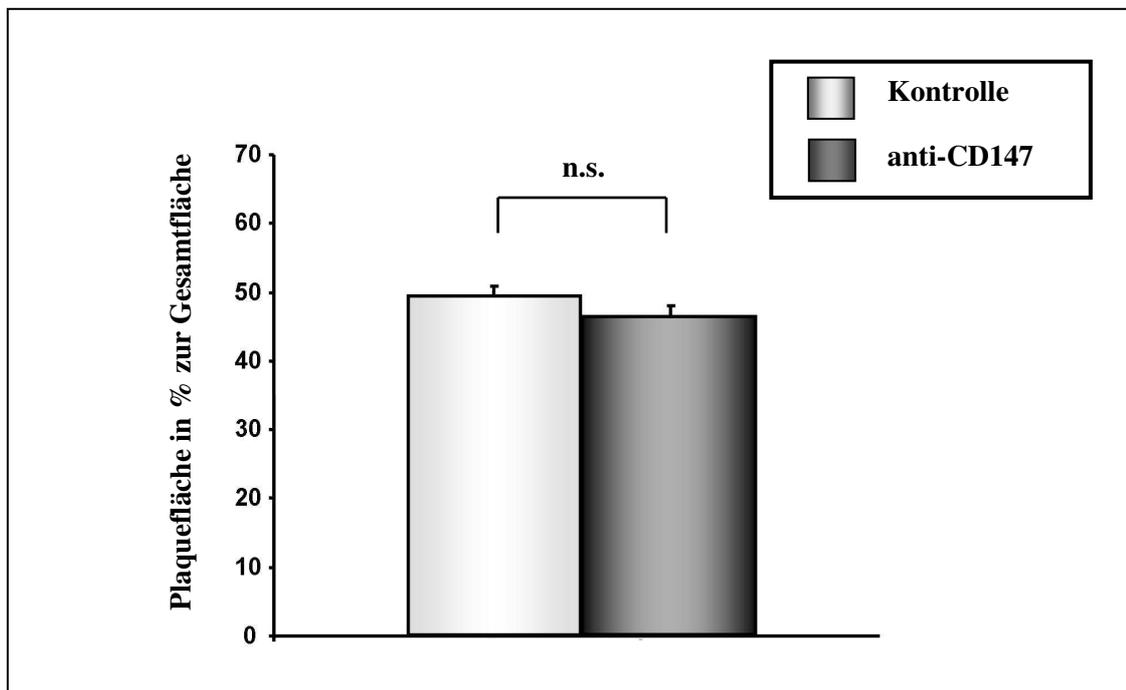


Abb.39: Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Plaquerfläche im Aortenbogen durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.

Die ApoE^{-/-}-Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Plaquerfläche im Aortenbogen vier Wochen nach der Denudation der A. carotis communis. (N=7; n.s. nicht signifikant)

Wie in Abbildung 39 ersichtlich, ist die Plaquerfläche von den anti-CD147-AK behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe gleich groß. Es zeigt sich ein Mittelwert der Plaquerfläche von 46,3±1,8% nach Antikörpertherapie. Die Kontrollgruppe weist eine mittlere Plaquerfläche von 49,3±1,4% auf. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Plaquerfläche zwischen den mit anti-CD147-AK

behandelten Tieren und der Kontrollgruppe festgestellt werden.

An den mit anti-CD147-AK behandelten ApoE^{-/-}-Mäusen und der Kontrolle wurden die Plaqueflächen in der Aortenwurzel und auf der Aortenklappe gemessen und miteinander verglichen. In die Bewertung gingen jeweils sechs Versuchstiere ein.

Es wurden fünf Gefrierschnitte von der Aortenklappe und sechs Schnitte von der Aortenwurzel angefertigt. An den Ölrot gefärbten Schnitten wurden das Lumen der Aorta und die Plaqueflächen gemessen. Mit diesen Werten wurde prozentuale Anteil der subvalvulären Plaques bzw. die atherosklerotischen Plaques der Aortenwurzel vom Gesamtlumen berechnet.

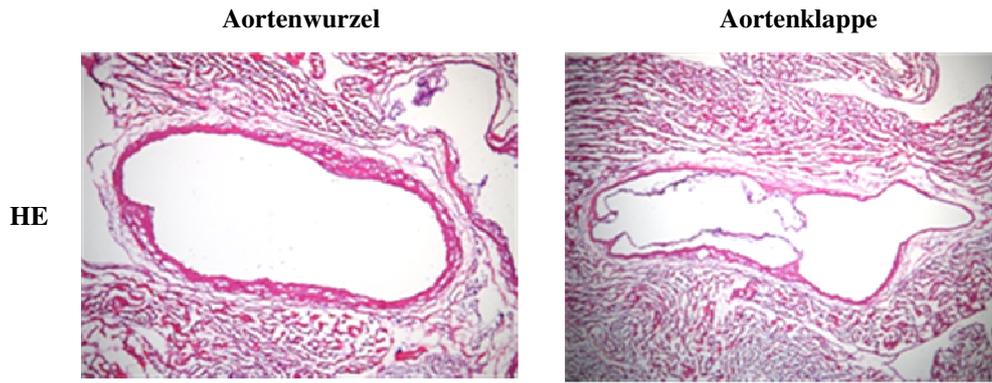


Abb.40: Die Abbildung zeigt repräsentative Schnitte der Gefrierschnitte von der Aortenwurzel und der Aortenklappe einer unbehandelten C57BL/6J-Maus.

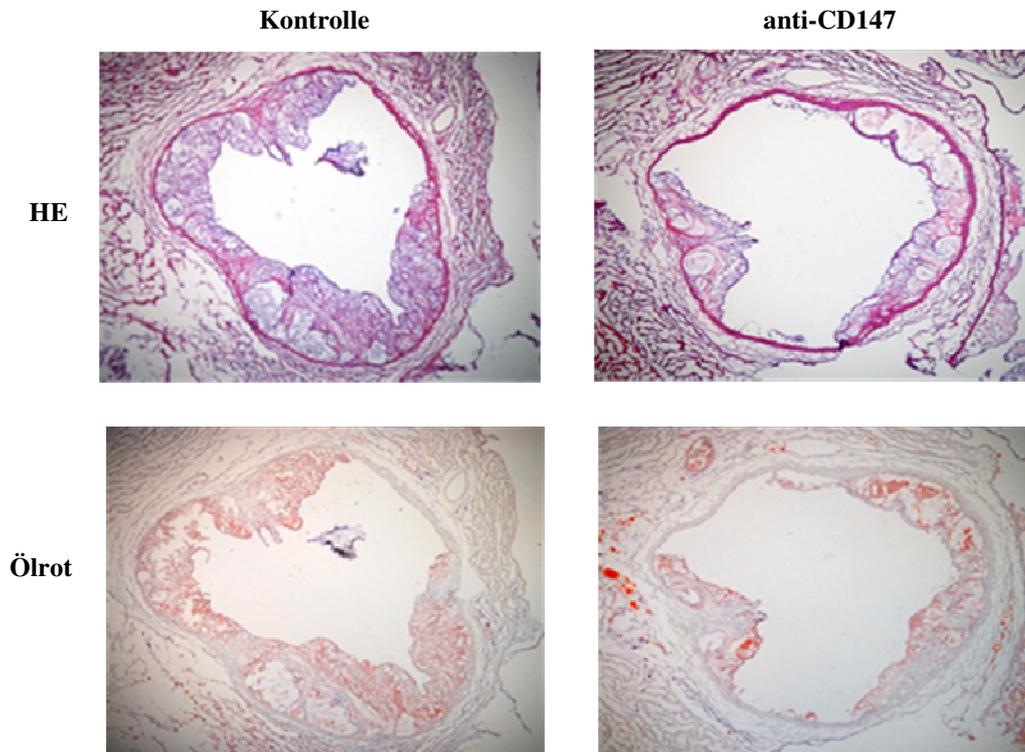


Abb.41: Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Plaquefläche in der Aortenwurzel durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht beeinflusst.

Die ApoE^{-/-}-Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Gefrierschnitte der Plaques der Aortenwurzel von Ölrot-Färbungen vier Wochen nach der Denudation der A. carotis communis. (N=6)

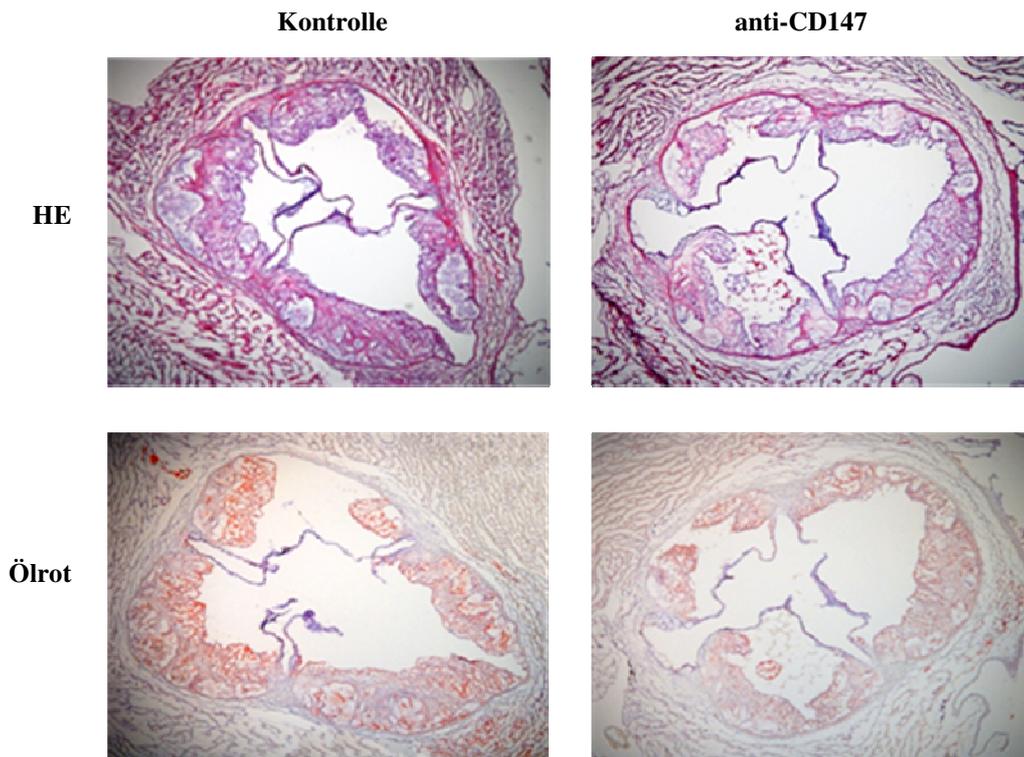


Abb.42: Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Plaqueläche an der Aortenklappe durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht beeinflusst.

Die Mäuse ApoE^{-/-}-Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Gefrierschnitte der Plaques der Aortenklappe von Ölrot-Färbungen vier Wochen nach der Denudation der A. carotis communis. (N=6)

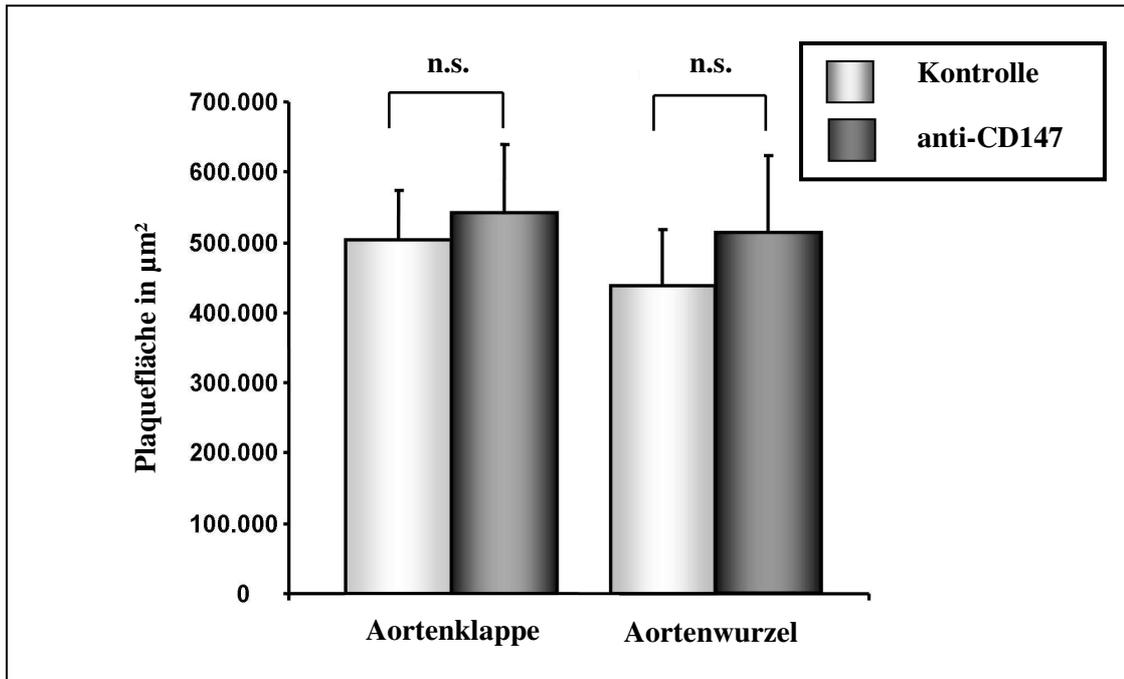


Abb.43: Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Plaquesfläche an der Aortenklappe und der Aortenwurzel durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.

Die ApoE^{-/-}-Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1 $\mu\text{g/g}$ KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Plaquesfläche an der Aortenklappe und der Aortenwurzel vier Wochen nach der Denudation der A. carotis communis. (N=6; n.s. nicht signifikant)

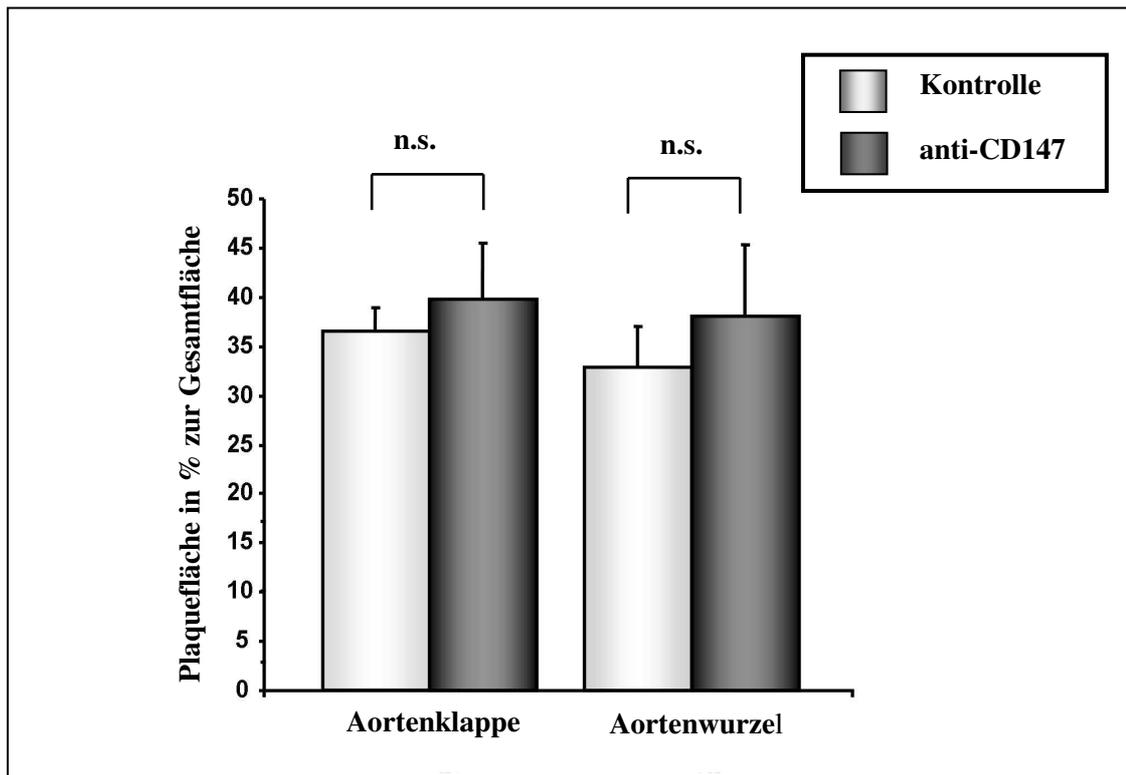


Abb.44: Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Plauefläche an der Aortenklappe und der Aortenwurzel durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.

Die ApoE^{-/-}-Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Plauefläche an der Aortenklappe und der Aortenwurzel in % zur Gesamtfläche vier Wochen nach der Denudation der A. carotis communis. (N=6; n.s. nicht signifikant)

Die vorhergehenden Schaubilder stellen die Plauefläche der Aortenwurzel und Aortenklappe der antikörpertherapierten Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe dar. Die gemessene Plauefläche im Bereich der Aortenklappe hat einen Mittelwert von 39,8±5,7% bei der anti-CD147-AK behandelten Gruppe und bei der Kontrollgruppe einem Mittelwert von 36,5±2,4%. Im Bereich der Aortenwurzel konnte eine mittlere Plauefläche von 38,1±7,3% nach AK-Behandlung bestimmt werden. Das Diagramm zeigt, dass die Kontrollgruppe im Trend eine kleinere Plauefläche von 32,9±4,1% aufweist. Die ermittelten Differenzen der Plaueflächen der anti-CD147-AK behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe sind nicht signifikant.

3.3.4. Überlebensrate und die aufgetretenen Komplikationen nach der Drahtdenudation der *A. carotis communis*

Mausstamm	C57BL/6J		C57BL/6J		ApoE ^{-/-}	
Behandlung	NIM811	Lösungs- mittel	Anti- CD147	Isotyp- Kontrolle	Anti- CD147	Isotyp- Kontrolle
operiert	12	11	12	11	15	14
auswertbar	7	7	7	7	9	9
nicht auswertbar	1	2	4	3	4	2
gestorben	4	2	1	1	1	3
Euthanasie					1	

Tab.5: Übersicht über die Erfolgsrate bei der Drahtdenudation der *A. carotis communis*

Es wurden 12 C57BL/6J-Mäuse operiert und mit NIM811 behandelt. Die Kontrollgruppe umfasst 11 Tiere. Von den 23 operierten Mäusen gingen 14 Tiere in die Wertung ein. Zwei Mäuse verstarben nach der Operation und vier sind durch den Abriss der *A. carotis externa* intraoperativ verblutet. Wie in Tabelle 5 ersichtlich, konnten von drei Versuchstieren die Karotiden nicht ausgewertet werden. Von diesen bildete ein Tier keine Neointima aus, bei einer anderen Maus war kein Lumen vorhanden und bei der dritten Maus war das Gefäß für eine Auswertung zu stark beschädigt.

Es wurden 23 C57BL/6J-Mäuse operiert und mit anti-CD147-AK bzw. dem Isotyp behandelt. Von den operierten Tieren sind zwei während der Operation durch den Abriss der *A. carotis externa* verblutet. Sieben Mäuse mussten aus der Bewertung ausgeschlossen werden. Zwei Tiere hatten eine sehr stark untypisch verdickte Media ausgebildet und bei den restlichen wurde das Gefäß nicht ausreichend stark verletzt, so

dass sich keine Neointima ausbildete.

Von den insgesamt 29 operierten ApoE^{-/-}-Mäusen konnten 18 Karotiden in die Bewertung aufgenommen werden. Vier Mäuse sind nach Operation verstorben und ein Tier musste wegen zu schlechten Allgemeinbefindens euthanasiert werden. Von sechs Mäusen waren die Karotiden wegen eines vollständigen Verschlusses des Lumens oder zu starker Beschädigung nicht auswertbar.

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Versuchsdurchführung

4.1.1. Die Maus als Versuchstier in der Atheroskleroseforschung

In dieser Arbeit wurde die Maus als Versuchstier verwendet. Die Maus ist das am häufigsten verwendete Versuchstier überhaupt. Durch ihre geringe Körpergröße, schnelle Generationsfolge und einfache Haltung ist eine ökonomische Haltung einer großen Tierzahl möglich (J Weiss et al. 2008). Neue Substanzen können leichter getestet werden, da wegen der geringen Körpergröße ist eine Produktion in großen Mengen nicht erforderlich ist (A Daugherty 2002). Kostenersparend kommt auch der geringe Verbrauch an Narkotika und Therapeutika hinzu. Ein weiterer Vorteil ist, dass sie genetisch sehr gut erforscht und gentechnisch leicht zu manipulieren ist (J Jawien et al. 2004). In dieser Arbeit wurden Wildtypmäuse (C57BL/6J) und ApoE^{-/-}-Mäuse für die Drahtdenudation der A. carotis communis nach dem Modell von Lindner et al. verwendet (V Lindner et al. 1993). Die ApoE^{-/-}-Maus ist eines der bekanntesten Modelltiere in der Atheroskleroseforschung geworden. Sie entwickelt auch ohne Fütterung einer atherogenen Diät schnell atherosklerotische Läsionen. Es ist das erste Mausmodell, das atherosklerotische Läsionen entwickelt, die denen des Menschen ähnlich sind (MH Moghadasian 2002; Y Nakashima 1994). Mit der ApoE^{-/-}-Maus soll in dieser Arbeit die Neointimabildung nach Denudation an einem atherosklerotisch vorgeschädigten Gefäß untersucht werden. Da die Maus über eine dünne Adventitia und Media verfügt, kann die zu testende Substanz gut durch die Gefäßwand penetrieren (V Lindner et al. 1992).

Nachteilig sind die erheblichen anatomischen und physiologischen Unterschiede zwischen Mensch und Maus (Q Xu 2004). Dadurch sind die Ergebnisse nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar. So weichen Mensch und Maus im Fettprofil stark voneinander ab (J Jawien et al. 2004). Auch die Ergebnisse der Restenoseforschung, die zum Beispiel bei Primaten und Schweinen erzielt werden, weichen von denen der kleinen Versuchstiere wie Mäuse häufig stark ab (M Ferrell et al. 1992). Auf Grund der geringen Lebenserwartung entwickeln die genetisch manipulierten Tiere erheblich schneller atherosklerotische Veränderungen. Beim Menschen verläuft dieser Prozess über mehrere Jahrzehnte. Die Mäuse haben wegen des großen Gewichtsunterschiedes viel dünnere Gefäße im Vergleich zum Menschen.

Der Querschnitt der Koronararterie enthält bei der Maus 3000mal weniger Zellen als beim Menschen (Q Xu et al. 2004). Die geringe Größe erschwert chirurgische Eingriffe (J Jawien et al. 2004). Die beim Menschen häufig vorkommenden Plaquerupturen mit anschließender Thrombembolie können mit keinem Mausmodell simuliert werden. Mit Hilfe der ApoE^{-/-}-Maus wurde ein Modell entwickelt, das zuverlässig atherosklerotische Plaques entwickelt. Es ist den Wissenschaftlern jedoch noch nicht gelungen, ein reproduzierbares Verfahren zu entwickeln, bei dem die Plaques wie beim Menschen spontan rupturieren und ein akutes kardiovaskuläres Ereignis auftritt, wie zum Beispiel ein Infarkt oder Schlaganfall (A Daugherty 2002).

4.1.2. Verletzungsmodelle

Die „percutaneous transluminal angioplasty“ (PCTA), wie die Ballondilatation und das Einsetzen eines Stents, sind etablierte Behandlungsmethoden beim Menschen zur Wiederherstellung des durch atherosklerotische Plaques verengten Gefäßlumens. Ein dauerhafter Behandlungserfolg wird häufig durch eine Restenose gefährdet (M Ferrell et al. 1992; J Phillips-Hughes et al. 1996). Versuche mit Tieren haben viel zu einem besseren Verständnis der Restenosierung beigetragen (RS Schwartz 1994). Mit Hilfe von Tiermodellen wird die Pathogenese weiter erforscht und es werden neue Therapien sowie Diagnose- und Präventionsverfahren entwickelt (Q Xu 2004). Um unterschiedliche Fragestellungen untersuchen zu können, gibt es mehrere Verletzungsmodelle (Q Xu 2004). Wie bei allen Forschungsgebieten ist auch die Erforschung der Neointimabildung am Tiermodell von vielen Rückschlägen gekennzeichnet. Immer wieder zeigen neue Wirkstoffe, die beim Versuchstier zufriedenstellende Ergebnisse erzielten, in der klinischen Studie dann doch nicht den erhofften Erfolg. Als Ursachen können eine unterschiedlich starke Dosierung zwischen den Versuchstieren und den Probanden und unterschiedliche Verfahren der Kontrolle der Wirksamkeit angesehen werden (RS Schwartz 1994).

Tiermodelle zur Untersuchung der Gefäßstenosierung

Besonders häufig werden Versuche mit Ratten durchgeführt, bei denen die A. carotis mittels Ballondilatation verletzt wird (P Carmeliet et al. 1997; MP Bendeck et al. 1994; AW Clowes et al. 1983). Früher wurden häufig Kaninchen verwendet (AW Clowes et al. 1983). Heute greifen die Wissenschaftler immer mehr auf die Maus zurück (P Carmeliet et al. 1998; Q Xu et al. 2004). Mit Hilfe der ApoE^{-/-}-Maus kann eine atherosklerotische Vorschädigung der Gefäße vor der Angioplastie simuliert

werden (JE Leidenfrost et al. 2003). Gerne werden auch Schweine als Versuchstiere verwendet, zum Beispiel für das Setzen von Stents (R Kornowski et al. 1998) oder bei Experimenten, bei denen eine Ballonangioplastie durchgeführt werden soll (BJGL de Smet et al. 2000). Es gibt auch Versuche mit Hunden, denen in die Koronararterie ein Stent eingesetzt wurde (RA Schatz et al. 1987). Untersuchungen zur Restenosierung nach Angioplastie werden auch an Affen durchgeführt (GS Cherr et al. 2002). Es ist zu bedenken, dass zwischen den Spezies erhebliche Unterschiede in der Neointimabildung bestehen. Das gilt für das Ausmaß der Intimaproliferation nach einer zugefügten Verletzung und für die Neointimazusammensetzung. Bei der Ratte genügt bereits eine Denudation des Endothels, um eine Neointimabildung auszulösen. Bei Schwein, Hund und Affe wäre das für eine deutliche Neointimaproliferation unzureichend (RS Schwartz 1994). Zwischen den verschiedenen Mausstämmen bestehen ebenfalls erhebliche Unterschiede in der Neointimabildung (P Carmeliet et al. 1998).

Verletzungsmodelle im Vergleich

Ein weiteres häufig verwendetes Verletzungsmodell ist das permanente Legieren der A. carotis communis. Vorteil gegenüber der Drahtdenudation ist dabei die leichte Operationstechnik und damit die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Es wird auch eine stärkere Neointimabildung induziert als bei der Drahtdenudation. Dieses Verfahren simuliert jedoch keine physiologische Situation oder Verletzung, wie sie im Rahmen einer Angioplastie auftreten könnte. Ein weiterer Nachteil ist, dass dabei der Blutfluss verändert wird (Q Xu 2004; JE Leidenfrost et al. 2003; X Wang et al. 2006). Bei der Gefäßwandverletzung durch einen Stromschlag mittels Mikrokoagulator werden sämtliche Zellschichten der Gefäßwand zerstört. Es bildet sich ein plättchen- und fibrinreicher Thrombus. Dieser verhindert, dass der Wirkstoff zum verletzten Areal vordringen kann. Vorteil der Elektroverletzung gegenüber der Drahtdenudation ist die starke Neointimabildung und die leichte Durchführbarkeit (X Wang et al. 2006; P Carmeliet et al. 1998).

Trotz gewisser Nachteile wurde in der vorliegenden Arbeit das von Lindner et al. entwickelte Verfahren der Drahtdenudation der A. carotis communis bei der Maus durchgeführt (V Lindner et al. 1993). Dieses Verletzungsverfahren wurde verwendet, weil es die Verletzungen in Folge einer Angioplastie gut simuliert. Die Methode der Drahtdenudation ist in unserer Arbeitsgruppe ein etabliertes Verfahren. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass der Blutfluss erhalten bleibt. Dadurch kann die verabreichte Substanz über den Blutkreislauf direkt den Wirkungsort erreichen (X

Wang et al. 2006; DY Hui 2008). Die Operation besitzt einen technisch hohen Anspruch und das Ausmaß der Verletzung ist stark von den Fähigkeiten des Operateurs abhängig. Die Ergebnisse sind wegen der hohen Variabilität des Verletzungsgrades zwischen den Tieren schwierig zu reproduzieren. Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens ist die häufig nur geringe Intimaproliferation. Die Neointima ist meist nur zwei bis drei Lagen dick (DY Hui 2008; X Wang et al. 2006). Das Ausmaß der Neointimabildung ist auch vom genetischen Hintergrund der Mäuse abhängig. Die von Lindner et al. beschriebene Intima- und Mediaproliferation in Folge der Drahtdenudation wurde an Swiss Webster Mäusen festgestellt (V Lindner et al. 1993). In der vorliegenden Arbeit und auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, ist eine nur geringe Neointimabildung der C57BL/6J-Mäuse festgestellt worden (BD Geest et al. 1997). Die Pathogenese der Intimahyperplasie ist am Tier bereits gut untersucht worden. Die Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen kann aber nur eingeschränkt erfolgen, denn es scheint einige Unterschiede bei der Stenosierung zu geben. Am menschlichen Material wurde eine geringe Proliferationsrate, aber eine große Migrations- und Syntheseaktivität der glatten Muskelzellen festgestellt (MG Davies et al. 1994).

4.2. Aufgetretene Probleme in der Versuchsdurchführung

Probleme bei der Drahtdenudation der *A. carotis communis*

Beim Freipräparieren der *A. carotis communis* vom *N. laryngeus recurrens* kann die Maus bei einer zu starken Manipulation des Nerven am plötzlichen Atemstillstand versterben. Die *A. carotis communis* muss soweit von den umliegenden Strukturen freipräpariert werden, dass ein ausreichend langer Gefäßabschnitt für die Denudation zur Verfügung steht. Dabei können ungewollte Verletzungen der Karotis mit Blutungen und einer Thrombusbildung entstehen. Nach der Inzision der *A. carotis interna* wird der Führungsdraht in das Gefäß eingeführt. Die Spitze des Drahtes kann das Endothel schwer beschädigen. Diese Gefäße zeigen anschließend eine hochgradige Thrombusbildung und die Auswertung ist wegen der starken Gefäßverletzung meistens nicht möglich. Der Thrombus blockiert den Blutfluss und verhindert, dass der Wirkstoff zum Wirkungsort gelangen kann. Als besonders schwierig erwies sich, bei allen Mäusen den gleichen Schweregrad der Verletzung zu setzen. Es ist viel Übung erforderlich, um die Methode zu standardisieren.

Probleme beim Auswerten der Karotiden

Für die Auswertung ist der Verlauf der Lamina elastica externa und interna entscheidend. Bei der Operation kam es vor, dass die Gefäßwand so stark beschädigt wurde, dass der Verlauf der Gefäßwandschichten nicht erkennbar war. Solche Gefäße wurden ausgeschlossen. Ein Ausschluss erfolgte ebenfalls, wenn keine deutliche Reaktion in Form von einer Neointima oder Mediaverdickung zu erkennen war. In allen Versuchsgruppen mussten Gefäße aus der Wertung ausgeschlossen werden.

4.3. Erwartungen

Die Restenose stellt eine chronische Strukturveränderung der Gefäßwand dar. Die sich dabei entwickelnde Neointima ist eine Hyperplasie der Intima, die sich besonders aus glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix zusammensetzt (MG Davies et al. 1994). Es gibt Untersuchungen, die eine Beteiligung von CyPA an der Restenosierung belegen. Mit Hilfe von Tierversuchen konnte eine vermehrte Expression von CyPA nach einer Gefäßverletzung ermittelt werden. Es fördert die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen (K Satoh et al. 2008; ZG Jin et al. 2000). CyPA wird bei Entzündungen verstärkt von Zellen in den Extrazellularraum exprimiert (K Arora et al. 2005; V Yurchenko et al. 2002, T Muramatsu et al. 2003). So konnte im Medium von aktivierten Makrophagen mehr CyPA gemessen werden als bei nicht aktivierten Makrophagen (B Sherry et al. 1992). CyPA ist ein Bindungspartner von CD147. Der Zelloberflächenrezeptor CD147 ist essentiell für die chemotaktische Wirkung des extrazellulären CyPA (W Insull 2009; V Yurchenko et al. 2002; T Muramatsu et al. 2003). Eine Blockade der CyPA-CD147-Interaktion reduzierte die Migration von Leukozyten in das Lungengewebe bei Mäusen nach einer akuten Lungenverletzung (K Arora et al. 2005).

CyPA und CD147 sind in den atherosklerotischen Plaques von ApoE^{-/-}-Mäusen enthalten (ZG Jin et al. 2004; P Seizer et al. 2008). Eine CD147-Expression findet ebenfalls in den makrophagenreichen humanen Plaques statt (TC Major et al. 2002). Sie fördert die Expression von Matrixmetalloproteinasen, die an Umbauvorgängen in der Gefäßwand in Folge einer Gefäßwandverletzung beteiligt sind (G Bauriedel et al. 1994; GM Jenkins et al. 1998; HR Lijnen et al. 1999; HR Lijnen et al. 1998). Die MMPs spalten die ECM und die Basalmembran, das erleichtert den SMCs die Migration und Proliferation aus der Media in die Intima. Die Folge ist eine Intimaproliferation (G Bauriedel et al. 1994; HR Lijnen et al. 1999; MP Bendeck et al.

1994; N Zempo et al. 1994; M Southgate et al. 1996).

Durch die Stimulation der MMP-Expression und der MMP-Aktivierung ist CD147 maßgeblich in die Plaquestabilisierung involviert (C Haug et al. 2004; YW Yoon et al. 2005). Eine wesentliche Quelle der MMP-Expression in den Plaques sind die Makrophagen und SMCs (MJ Hobeika et al. 2007). Entzündungsmediatoren fördern wiederum die MMP-Expression (TB Rajavashisth et al. 1999; H Uzui et al. 2002). Die Arbeitshypothese für die vorliegende Arbeit lautet, dass das CD147-CyPA-System eine Stenosierung, die nach einer Gefäßwandverletzung auftritt, unterstützt. Ziel dieser Arbeit ist, durch eine Behandlung mit NIM811, einem CyPA-Inhibitor, bzw. durch eine antikörpervermittelte CD147-Blockade eine Reduktion der Intimahyperplasie mit Abschwächung der Entzündungsreaktion nach einer Drahtdenudation der A. carotis communis zu bewirken. Es sollen neue Kenntnisse über den Einfluss von CD147 und CyPA auf die Stenosierung gesammelt werden mit dem Ziel neue Therapieansätze für eine verbesserte Langzeitprognose nach einer Angioplastie zu entwickeln.

4.4. Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit besteht aus drei Versuchsansätzen. Die erste Gruppe umfasste sieben C57BL/6J-Mäuse, die nach der Drahtdenudation der A. carotis communis für 14 Tage NIM811 und als Kontrollgruppe sieben C57BL/6J-Mäuse die das Lösungsmittel i.p. injiziert bekamen und drei Wochen nach der Operation getötet wurden. Die C57BL/6J-Mäuse der zweiten Versuchsreihe bekamen nach der Denudation der A. carotis communis für zwei Wochen einen anti-CD147-AK und die Kontrollgruppe dessen Isotyp i.p. injiziert. Nach einer weiteren Woche erfolgte die Tötung. Die Gruppengröße umfasste ebenfalls sieben Tiere die den Wirkstoff bekamen und sieben Tiere als Kontrollgruppe. In der dritten Versuchstiergruppe wurden ApoE^{-/-}-Mäuse für die Denudation der Karotiden verwendet. Die Tiere bekamen auch für 14 Tage anti-CD147-AK bzw. die Isotyp-Kontrolle verabreicht. Nach 14 weiteren Tagen wurden beide Gruppen, die sich jeweils aus neun Tieren zusammensetzen, geopfert.

Von allen Versuchstieren wurden die Karotiden zur histomorphometrischen Auswertung entnommen. Die Wirkung der injizierten Substanzen wurde anhand von Stenosegrad, Neointimafläche und Fläche der Media beurteilt.

4.4.1. Verabreichung von NIM811 an C57BL/6J-Mäuse

Die Verabreichung von NIM811 zeigt keinen Einfluss auf die Mediaverdickung gegenüber der Kontrollgruppe. Entgegen der Erwartung sind die Neointimafläche und der Stenosegrad nach der NIM811-Behandlung gegenüber der Kontrollgruppe unverändert. Es liegt kein signifikanter Unterschied vor.

Einfluss von NIM811 auf die Media- und Neointimaproliferation

Die Verabreichung von NIM811, einem CyPA-Inhibitor, verfolgte das Ziel, den Einfluss des CyPA-CD147-Systems auf die Neointimabildung zu untersuchen. Es gibt bereits Versuche von anderen Arbeitsgruppen, die eine Beteiligung von CyPA im Tiermodell nachweisen konnten. Es existieren Studien, die eine entzündungsfördernde Wirkung von CyPA belegen (H Kim et al. 2005; B Sherry et al. 1992; Arora et al. 2005; JM Damsker et al. 2007). So löste eine intradermale Injektion von CyPA im Mäusefuß eine stärkere Entzündungsreaktion aus als der Trägerstoff allein (B Sherry et al. 1992). Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen unterstützen die aufgestellte Arbeitshypothese. Sie konnten zeigen, dass aktivierte Leukozyten, wie sie auch bei der Entzündungsreaktion nach einer Gefäßdenudation auftreten, die Neointimabildung fördern (AM Miller et al. 2001; CL Wainwright et al. 2001; P Golino et al. 1997). Nach einer Ballondilatation der A. subclavia entwickelten Kaninchen mit einer induzierten Leukopenie eine geringere Neointima als die Kontrollgruppe (AM Miller et al. 2001). Die Arbeitsgruppe Satoh et al. zeigte, dass es durch eine permanente Ligatur der A. carotis communis zu einem Anstieg der CyPA-Expression in der Gefäßwand kommt. In Folge der Ligatur entwickelten die Mäuse eine Media- und Intimahyperplasie. Mit Hilfe von CyPA-KO-Mäusen konnte gezeigt werden, dass CyPA die Proliferation und Migration von SMCs nach einer permanenten Ligatur fördert (K Satoh et al. 2008). Auch eine andere Studie mit Ratten konnte eine verstärkte CyPA-Expression nach Gefäßwandverletzung und deren Einfluss auf die SMCs nachweisen (ZG Jin et al. 2000). Daher lautete die Arbeitshypothese für die vorliegende Arbeit, dass die Blockade von CyPA durch die Applikation von NIM811, einen CyPA-Inhibitor, die Media- und Intimaproliferation nach der Drahtdenudation gegenüber der Kontrollgruppe verringert.

Das Ergebnis von Satoh et al. lässt sich in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen. Ein Grund dafür könnte das unterschiedliche Verletzungsmodell sein. Die permanente

Ligatur ist technisch einfacher zu operieren, der Verletzungsgrad ist gleichmäßiger und damit sind die Ergebnisse besser zu reproduzieren (Q Xu 2004; JE Leidenfrost et al. 2003; X Wang et al. 2006). Die Drahtdenudation wurde für die vorliegende Arbeit verwendet, weil sie den Verletzungen nach einer Ballondilatation bzw. Stentimplantation beim Menschen mehr entspricht als die permanente Ligatur. Es ist möglich, dass die Gefäße der Kontrollgruppe weniger stark denudiert wurden und deshalb eine kleinere Neointimafläche aufwiesen. Wie in der Literatur beschrieben, führte die Drahtdenudation zu einer Media- und Intimaproliferation der A. carotis communis (V Lindner et al. 1993). Bei der Beurteilung der Ergebnisse fällt auf, dass die Fläche der Neointima in der NIM811-behandelten Gruppe nicht signifikant größer ist als in der Kontrollgruppe. Es gibt in der Literatur keinen Hinweis, dass NIM811 die Neointimabildung fördert. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist der große Standardfehler, besonders beim Stenosegrad, aufgrund der hohen Varianz der Einzelwerte und der geringen Versuchstierzahl zu beachten. Aus diesem Grund ist die Interpretation der Ergebnisse schwierig. Auch von anderen Arbeitsgruppen wird die hohe Variabilität des Verletzungsgrades nach der Drahtdenudation bemängelt (DY Hui 2008; X Wang et al. 2006; R Hafner 2011).

4.4.2. Verabreichung von anti-CD147-AK an C57BL/6J-Mäuse

Die Mediaverdickung und die Neointimafläche der Versuchstiere nach der anti-CD147-AK-Behandlung zeigen keinen Unterschied zu den Kontrolltieren auf. Die Ergebnisse weisen eine Tendenz, dass der Stenosegrad nach der anti-CD147-AK-Behandlung gegenüber der Kontrollgruppe geringer ist, auf. Die Unterschiede zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe sind nicht signifikant.

4.4.3. Verabreichung von anti-CD147-AK an ApoE^{-/-}-Mäuse

Aus den Diagrammen der operierten ApoE^{-/-}-Mäuse ist ersichtlich, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Mediafläche und in der Neointimafläche zwischen den anti-CD147-AK behandelte Tiere und deren Kontrollgruppe gibt. Der Stenosegrad zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen der antikörperbehandelten Versuchsgruppe und der Kontrolle.

Einfluss einer antikörpervermittelten Blockade von CD147 auf die Media- und Neointimaproliferation bei C57BL/6J-Mäusen und ApoE^{-/-}-Mäusen

Die antikörpervermittelte Blockade von CD147 nach der Drahtdenudation der A. carotis communis hat das Ziel, den Einfluss von CD147 auf die Stenosierung zu blockieren. Das Zelloberflächenprotein CD147 stimuliert die MMP-Expression (K Nabeshima et al. 2006). Es existieren zahlreiche Untersuchungen, die belegen, dass die MMPs maßgeblich an der Neointimabildung beteiligt sind. So konnten Pauly et al. mit Hilfe der Boyden-Kammer zeigen, dass die MMPs durch die Spaltung der ECM und besonders der Basalmembran die Migration der SMCs erleichtern (RR Pauly et al. 1994). Ein wichtiger Schritt in der Pathogenese der Neointimabildung ist die Migration und Proliferation von SMCs aus der Media in die Intima (WS Webster et al. 1974; TH Spaet et al. 1975). Auch in zahlreichen Tierversuchen konnte der Einfluss der MMPs an der Neointimabildung nachgewiesen werden (WS Webster et al. 1974; MP Bendeck et al. 1994; M Kuzuya et al. 2003). Die Untersuchungen von Chow et al. ergaben, dass die MMP-9-KO-Mäuse 8 Tage nach der Drahtdenudation der A. carotis communis eine signifikant geringere SMC-Replikation in der Media und Intima aufwiesen. Bei den KO-Mäusen war ebenfalls die Rate der SMC-Migration von der Media in die Intima signifikant kleiner als bei der Wildtypkontrolle (A Chow et al. 2007). Es gibt bereits Arbeiten, die die Neointimabildung nach der Gabe von MMP-Inhibitoren untersuchten (MP Bendeck et al. 1994; N Zempo et al. 1996). So konnte durch eine Verabreichung von Batimastat an Ratten nach einer Ballondenudation eine Reduktion der SMC-Migration in die Intima erreicht werden (N Zempo et al. 1996). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen war das Ziel, durch die Verabreichung des anti-CD147-AKs eine Reduktion der MMP-Expression zu erreichen und damit eine Verringerung der SMC-Migration und Replikation mit einer kleineren Media- und Intimaproliferation gegenüber der Kontrollgruppe. Wie die Schaubilder zeigen, ist die erwartete Wirkung nicht eingetreten. Bei der Betrachtung der Diagramme wird deutlich, dass sich die Ergebnisse widersprechen. Die C57BL/6J-Mäuse zeigen nach anti-CD147-AK-Verabreichung eine Tendenz, dass die antikörpervermittelte Blockade von CD147 zu einer verringerten Media- und Intimaproliferation führen könnte. Bei den ApoE^{-/-}-Mäusen ist hingegen eine tendenziell größere Neointimafläche bei den antikörperbehandelten Tieren gegenüber der Kontrolle gemessen worden. Mögliche Ursachen für das Ergebnis können eine ungleichmäßig durchgeführte Denudation, eine zu geringe Wirkstoffkonzentration am

Wirkungsort oder ein falscher Behandlungszeitraum sein. Die Diagramme und Schaubilder zeigen, dass die ApoE^{-/-}-Mäuse auf die Drahtdenudation mit einer stärkeren Media- und Intimaproliferation reagierten als die Wildtypmäuse. Der Grund liegt darin, dass es zwischen den Mäusestämmen Unterschiede im Ausmaß der Neointimabildung gibt. Die ApoE^{-/-}-Mäuse entwickeln auf Grund ihrer atherosklerotisch vorgeschädigten Gefäßwände eine stärkere Intimaproliferation als Wildtypmäuse (BD Geest et al. 1997; CM Matter et al. 2006).

Einfluss einer antikörpervermittelten Blockade von CD147 auf die vaskuläre Inflammation bei ApoE^{-/-}-Mäusen

Die Applikation des anti-CD147-Antikörpers verfolgt das Ziel einer Reduktion der CyPA-Wirkung nach der Drahtdenudation. Die chemotaktische Wirkung von CyPA auf Leukozyten beruht auf der Bindung vom extrazellulären CyPA mit CD147, dem Zelloberflächenrezeptor der Leukozyten (V Yurchenko et al. 2002). Es gibt bereits *in vitro* und *in vivo* Versuche die belegen, dass eine anti-CD147-AK-Behandlung zu einer verringerten CyPA-vermittelten Chemotaxis führt (K Arora et al. 2005; P Zhu et al. 2005; WM Gwinn et al. 2006). Unsere Arbeitsgruppe konnte im myokardialen Reperfusion/Ischämie-Modell der Maus durch eine anti-CD147-AK-Applikation eine verminderte Migration von neutrophilen Granulazysten und Monozyten im Infarktgebiet erzielen (P Seizer et al. 2011; C Ochmann 2010). Aus diesen Vorarbeiten lässt sich die Arbeitshypothese aufstellen, dass eine anti-CD147-AK-Behandlung nach der Drahtdenudation der A. carotis communis ebenfalls zu einer Reduktion der Entzündung führen könnte. Aus anderen Arbeiten geht hervor, dass es bei Entzündungen neben einem erhöhten extrazellulären CyPA-Gehalt auch zur gesteigerten CD147-Expression auf Leukozyten kommt (WM Gwinn et al. 2006; JM Damsker et al. 2009; JM Damsker et al. 2007). Die Beteiligung von CD147 an entzündlichen Prozessen ist bereits erwiesen und ebenso, dass der anti-CD147-AK eine Reduktion der CyPA-vermittelten Chemotaxis herbeiführt. Es existieren jedoch keine Versuche zur Wirkung von anti-CD147-AK auf das Entzündungsgeschehen nach der Drahtdenudation der A. carotis communis.

Es konnten bei den ApoE^{-/-}-Mäusen zahlreiche MAC3-positive Zellen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Bei der Beurteilung fällt auf, dass die anti-CD147-AK-behandelten Tiere eine im Trend geringere Anzahl von Makrophagen in der Media und Neointima aufwiesen, als deren Kontrollgruppe. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Das Ergebnis könnte eine Tendenz zeigen, dass die Gabe

von anti-CD147-AK zu einer Reduktion der Entzündung nach der Operation führt. Dabei bestehen jedoch große Differenzen zwischen den Einzelergebnissen. Für eine verbesserte Aussagekraft ist eine größere Anzahl von untersuchten Proben notwendig. Mit der anti-MAC3-Färbung lassen sich neben den Makrophagen auch deren Abkömmlinge, die Schaumzellen, immunhistochemisch anfärben (ZS Galis et al. 1995). Die Arbeitsgruppe von Galis et al. konnte nach einer Ballondenudation der Aorta von hypercholesterolämischen Kaninchen eine Schaumzellansammlung in der Gefäßwand beobachten (ZS Galis et al. 1995). Die ApoE^{-/-}-Mäuse entwickeln aufgrund des Gendefektes und forciert durch die cholesterinreiche Diät eine Hypercholesterinämie und spontan atherosklerotische Plaques (KS Meir et al. 2004; N Nakeshima et al. 1994). Als Folge der Drahtdenudation sammeln sich subendothelial Makrophagen an, die durch die Phagozytose von Plasmalipiden zu Schaumzellen differenzieren (R Ross et al. 1995; R Ross et al. 1993). Es existiert eine Arbeit einer anderen Gruppe, die ebenfalls den Einfluss von CD147 auf die Atherosklerose durch eine antikörperbasierte Blockade von CD147 in ApoE^{-/-}-Mäusen untersuchte (H Liu et al. 2013). Die CD147-Blockade bewirkte kleinere atherosklerotische Läsionen, stabilere Plaques, weniger oxidativen Stress in den Plaques und eine geringere MMP-Aktivität. Sechs bis acht Wochen alte männliche ApoE^{-/-}-Mäuse erhielten für einen weiteren Zeitraum von 4, 8 und 12 Wochen ein normales Haltungsfutter oder eine fett- und cholesterinreiche atherogene Diät, um die Bildung von atherosklerotischen Plaques zu forcieren. In den atherosklerotischen Läsionen der Aorta ist mit einem Immunoblot nach 8 und 12 Wochen ein signifikant höherer CD147-Gehalt in den ApoE^{-/-}-Mäusen mit atherogener Diät ermittelt worden als in der Kontrollgruppe mit normalem Haltungsfutter. Die Mäuse wurden nach 12 Wochen cholesterinreicher Fütterung für weitere 4 Wochen mit dem anti-CD147-AK RL73.2, die Kontrollgruppe mit der Isotyp-Kontrolle zweimal wöchentlich behandelt (100µg pro Maus) und anschließend getötet. Für die Beurteilung der Plaquezusammensetzung wurde mit Färbungen der Gehalt an Makrophagen, glatten Muskelzellen und kollagenen Fasern bestimmt. Die Plaques der anti-CD147-AK-therapierten Mäuse enthielten mehr glatte Muskelzellen und kollagene Fasern und deutlich weniger Makrophagen gegenüber der Kontrollgruppe. In den Plaques bewirkte die Antikörperbehandlung eine Reduktion der MMP-2 und MMP-9-Aktivität. Durch eine verringerte Spaltung der kollagenen Fasern in der Gefäßwand migrierten weniger Monozyten in die Intima und es wurden weniger Makrophagen in

den Atheromen nachgewiesen (H Liu et al. 2013). Diese Untersuchung konnte im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit belegen, dass eine antikörpervermittelte Blockade von CD147 in den Plaques eine Reduktion der Makrophagen bewirkt. Mögliche Ursachen für das unterschiedliche Ergebnis sind eine höhere Dosierung des Antikörpers und ein längerer Behandlungszeitraum in der Arbeit von Liu und Mitarbeitern. Die ApoE^{-/-}-Mäuse sind zum Zeitpunkt der Tötung auch deutlich älter als die Mäuse der vorliegenden Arbeit und haben entsprechend länger die atherogene Diät aufgenommen.

Einfluss einer antikörpervermittelten Blockade von anti-CD147-AK auf die Plaquebildung von ApoE^{-/-}-Mäusen

Mit Hilfe von ApoE^{-/-}-Mäusen wurde untersucht, ob die anti-CD147-AK-Applikation einen Einfluss auf die Plaquegröße ausübt. Die Arbeitshypothese lautete, dass der Antikörper die CyPA-vermittelte Chemotaxis von Entzündungszellen unterdrückt und somit die entzündlichen Prozesse, die bei der atherosklerotischen Gefäßerkrankung auftreten. Das könnte eine verringerte Plaquebildung zur Folge haben. Es wird davon ausgegangen, dass es durch die entzündungshemmende Wirkung und verringerte MMP-Expression zu einer geringeren Migration von Monozyten in die Intima kommt und damit weniger Zellen zur Verfügung stehen, die Lipide phagozytieren, sich zu Schaumzellen differenzieren und damit maßgeblich an der Plaquebildung beteiligt sind. In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe konnten CyPA und CD147 in den Plaques der ApoE^{-/-}-Mäuse nachgewiesen werden (P Seizer et al. 2008). Major et al. konnten ebenfalls eine CD147-Bildung in makrophagenreichen, humanen Plaques ermitteln. Sie zeigten, dass eine CD147-Expression bei der Monozytendifferenzierung in Schaumzellen stattfindet (TC Major et al. 2002). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Entzündungsmediatoren der T-Lymphozyten zu Plaquestabilisierung und Plaquewachstum beitragen. So wiesen ApoE^{-/-}-Mäuse, die kein IFN- γ synthetisieren können, kleinere Läsionen, einen geringeren Fettgehalt der Plaques und eine höhere Plaquestabilität auf (S Gupta et al. 1997). ApoE^{-/-}-Mäuse mit einer Überexpression an humanem TIMP-1, einem MMP-Inhibitor, zeigten kleinere atherosklerotische Läsionen mit weniger Makrophagen (M Rouis et al. 1999). In Proben von Patienten mit stabiler oder instabiler Angina Pectoris ist in den Koronargefäßen ein erhöhter Gehalt an MMP-9 gemessen worden. Als Quelle stellten sich die Makrophagen und die SMCs heraus (DL Brown et al. 1995).

In der vorliegenden Arbeit sind die Plaqueflächen im Aortenbogen nach Behandlung

mit anti-CD147-AK bzw. mit dem Kontroll-AK gleich groß. In der Aortenwurzel und auf der Aortenklappe wurden in den Gefrierschnitten ebenfalls die Plaques vermessen. Die Diagramme zeigen, dass die Plaqueflächen in der Aortenwurzel und auf der Aortenklappe nach anti-CD147-AK-Behandlung ebenfalls keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe aufweisen.

Die aufgestellte Arbeitshypothese lässt sich nicht bestätigen. Ein Grund für das Ergebnis kann eine zu geringe Dosis des Antikörpers oder ein zu kurzer Behandlungszeitraum, um eine Wirkung zu erzielen, sein oder der getestete AK zeigt tatsächlich keinen relevanten Einfluss auf die Neointimabildung in diesem Tiermodell. Es gibt jedoch bereits Voruntersuchungen in der Arbeitsgruppe, die bei der gleichen Dosierung und einer kürzeren Anwendungsdauer des Antikörpers eine Wirkung nachweisen konnten, allerdings in einem Myokardinfarktmodell (C Ochmann 2010). In der Arbeit von Liu und seinen Mitarbeitern führte die antikörpervermittelte Blockade von CD147 in ApoE^{-/-}-Mäusen zu einer verbesserten Plaquestabilität (H Liu et al. 2013). In dieser Arbeit wurden die Plaques nur nach ihrer Größe und der Anzahl von Makrophagen beurteilt. Es kann keine Aussage über deren Stabilität getroffen werden. Dafür sind weitere Untersuchungen notwendig, um zum Beispiel mit Färbungen, wie in der Arbeit von Liu und seinen Mitarbeitern, die Anzahl der glatten Muskelzellen und der kollagenen Fasern zu bestimmen.

4.5. Schlussfolgerungen

Auf Grund sich ändernder Lebensgewohnheiten und einer steigenden Lebenserwartung der westlichen Gesellschaft werden in Zukunft immer mehr Menschen an den Folgen der Atherosklerose erkranken und sterben. Die Entwicklung neuer Therapien wird daher immer wichtiger.

Die Entwicklung von medikamentenbeschichteten Stents brachte einen großen Fortschritt in den Behandlungsmethoden. Mit medikamentenfreisetzenden Stents kann lokal eine hohe Wirkstoffkonzentration erzielt werden. Die Sirolimus-freisetzenden Stents reduzieren die Restenose, führen aber durch die Hemmung der Endothelisierung zum erhöhten Risiko einer späten Stentthrombose, einer verzögerten Wundheilung und haben eine langandauernde Neointimabildung zur Folge. Die medikamentenfreisetzenden Stents zeigten in Langzeitstudien keine verbesserte Todesrate gegenüber den unbeschichteten Stents. Ein Ziel der kardiovaskulären Forschung ist die Entwicklung neuer Wirkstoffe für medikamentenfreisetzende

Stents, um die Langzeitprognose der Patienten zu verbessern. Ideal wäre eine Reduktion der Restenose mit gleichzeitiger Förderung der Endothelisierung (T Inoue et al. 2009; JE Sousa et al. 2003; JW Moses et al. 2003; SE Lee et al. 2008; C Spaulding et al. 2007; MN Babapulle et al. 2004). Das Ziel der vorliegenden Studie ist, den Einfluss von CyPA und CD147 auf die Neointimabildung durch die Applikation von NIM811 bzw. vom anti-CD147-Antikörper nach der Drahtdenudation der A. carotis communis der Maus zu evaluieren.

Die vorliegende Arbeit zeigt im Rückblick keinen therapeutischen Nutzen der eingesetzten Behandlungsregime auf die Entwicklung einer Gefäßrestenose.

Eine Ursache für das Ergebnis kann sein, dass die getesteten Substanzen eine Wirkung auf die Neointimabildung ausüben, die mit dem gewählten Verletzungsmodell nicht dargestellt werden konnte. Vorteil der Drahtdenudation ist, dass sie die Verletzungen, die im Rahmen einer Angioplastie auftreten, gut simuliert. Der Nachteil dieses Verletzungsmodells ist, dass es schwer zu reproduzieren und das Ergebnis stark vom Operateur abhängig ist (DY Hui 2008; X Wang et al. 2006). Der Schweregrad der gesetzten Verletzung beeinflusst das Ausmaß der Neointimabildung (RS Schwartz 1994). Zahlreiche Vorarbeiten, auf deren Grundlage die Arbeitshypothese formuliert wurde, konnten einen Einfluss von CD147 und CyPA auf die Atherosklerose und andere kardiovaskuläre Erkrankungen belegen. Es gibt auch Hinweise für einen Einfluss auf die Neointimabildung (K Satoh et al. 2008).

Seizer et al. konnten CypA und CD147 in den Plaques von ApoE^{-/-}-Mäusen (P Seizer et al. 2008) und Major et al. konnte CD147 in humanen Plaques nachweisen (TC Major et al. 2002). Es gibt Hinweise, dass CD147 durch die Stimulation der MMP-Expression die Plaquestabilisierung fördert (YW Yoon et al. 2005). Schaumzellen stellen eine Quelle der MMPs in den Plaques dar (ZS Galis et al. 1995). Patienten mit einer instabilen Angina Pectoris haben einen höheren MMP-9-Gehalt im Blut der Koronargefäße als Patienten mit einer stabilen Angina Pectoris (DL Brown et al. 1995). Eine Zunahme der CD147-Expression während der Schaumzellendifferenzierung aus CD34⁺-Progenitorzellen (P Seizer et al. 2010) weist ebenfalls auf eine Beteiligung von CD147 an der Atherosklerose hin. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten demonstrieren, dass CD147 als Angriffspunkt neuer Therapien in Frage kommen könnte. Eine antikörpervermittelte Blockade in ApoE^{-/-}-Mäusen bewirkte eine Reduktion der MMP-Aktivität in den atherosklerotischen Plaques. Als Folge transmigrierten weniger Monozyten in die Intima und die Plaquestabilität wurde

verbessert (H Liu et al. 2013).

CyPA trägt zur Bildung eines abdominalen Aortenaneurysmas bei. CyPA bewirkt über Zwischenschritte eine Aktivierung von MMP-2, das eine Spaltung von Kollagen und Elastin in der Aortenwand mit dessen Strukturverlust zur Folge hat (K Satoh et al. 2009). Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten den Einfluss von CyPA und der MMPs an der Neointimabildung. Satoh et al. konnten durch eine permanente Ligatur der A. carotis communis von CyPA-KO-Mäusen zeigen, dass CyPA die Proliferation und Migration von SMCs nach einer permanenten Ligatur fördert (K Satoh et al. 2008). Die Ergebnisse von Chow et al. machen den Einfluss von MMP-9 auf die Neointimabildung deutlich. Die Drahtdenudation von MMP-9-KO-Mäusen führte zu einer geringeren SMC-Replikation und SMC-Migration von der Media in die Intima als bei den Wildtypmäusen (A Chow et al. 2007). Die aufgestellte Arbeitshypothese konnte nicht bestätigt werden. Eine weitere mögliche Ursache für das Ergebnis könnte sein, dass die Arbeitshypothese falsch ist. Eventuell gibt es noch andere, bis jetzt nicht nachgewiesene pathophysiologische Vorgänge bei der Neointimabildung. Möglicherweise sind beim Ablauf der Neointimabildung andere Rezeptoren für CyPA und CD147 involviert, als bei der Atheroskleroseentwicklung. Bei der Atherosklerose steht besonders die Migration von Monozyten und deren Schaumzellbildung in der Intima im Vordergrund (R Ross 1995). Die Neointimabildung ist besonders von der Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima geprägt (MG Davies et al. 1994; WS Webster et al. 1974; J Phillips-Hughes et al. 1996).

Ein weiterer Grund für den fehlenden therapeutischen Nutzen in dieser Arbeit könnte sein, dass das Behandlungsprotokoll, zum Beispiel bezüglich Dosis der Wirkstoffe, der Behandlungsintervalle oder dem Behandlungszeitraum nicht optimal gewählt wurde.

5. Zusammenfassung

Die Atherosklerose ist ein erhebliches Gesundheitsproblem in den Industrieländern. Ein wichtiges Ziel ist die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden. Derzeit ist die Angioplastie ein weit verbreitetes Verfahren zur Revaskularisierung atherosklerotischer arterieller Verschlüsse. Die Verletzung der Gefäßwand nach der Angioplastie induziert Wundheilungsprozesse. Die anschließende Bildung einer Neointima verhindert häufig einen längerfristigen Behandlungserfolg.

CD147 (EMMPRIN=extracellular matrix metalloproteinase inducer) ist ein Bindungspartner von Cyclophilin A (CyPA) und der Matrixmetalloproteinasen (MMPs). CD147 stimuliert die Expression von MMPs. Nach einer Gefäßwandverletzung spalten MMPs die extrazelluläre Matrix (ECM) und fördern damit die Migration von glatten Muskelzellen (SMCs) aus der Media in die Intima. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten eine gesteigerte CyPA-Expression nach Gefäßwandverletzung. CyPA stimuliert die Proliferation und Migration von SMCs in der Intima. Das CyPA-CD147-System wirkt chemotaktisch auf Entzündungszellen. Zielstellung der Arbeit war es, den Effekt des CyPA-CD147-System auf die Neointimabildung nach Drahtdenudation der A. carotis communis der Maus zu untersuchen. Vorarbeiten zeigten einen Einfluss von extrazellulärem CyPA auf die Neointimabildung. Daher lautete unsere Arbeitshypothese, dass eine pharmakologische Blockade von CyPA mit NIM811 bzw. eine anti-CD147-Antikörperbehandlung eine Reduktion der Intimaproliferation, eine verminderte vaskuläre Inflammation und eine verbesserte Plaquestabilität bewirken könnte.

In dieser Versuchsreihe wurde die A. carotis communis von C57BL/6J- und ApoE^{-/-}-Mäusen durch eine Drahtdenudation verletzt. Die Auswertung fand an histomorphometrisch gewonnenen Daten statt.

In der ersten Versuchsgruppe wurden C57BL/6J-Mäuse (N=7) für 14 Tage nach der Operation mit NIM811 (30mg/kg Körpergewicht) bzw. die Kontrollgruppe mit dem Lösungsmittel behandelt.

Die zweite Versuchstiergruppe bestand ebenfalls aus C57BL/6J-Mäuse (N=7), die für 14 Tage nach dem Eingriff mit einem anti-CD147-Antikörper (1µg/g Körpergewicht) und die Kontrollgruppe mit der entsprechenden Isotypkontrolle (1µg/g Körpergewicht) behandelt wurden. Drei Wochen nach dem chirurgischen Eingriff wurden die zuvor genannten Versuchstiergruppen getötet und die Gefäße entnommen. Ermittelt wurden

die Fläche der Media, der Neointima und der Stenosegrad. In der dritten Versuchsgruppe wurden ApoE^{-/-}-Mäuse (N=9) operiert, die eine cholesterinreiche Diät erhielten. Auch diese Mäuse wurden für 14 Tage nach der Operation mit dem anti-CD147-Antikörper (1µg/g Körpergewicht) bzw. mit dessen Isotyp (1µg/g Körpergewicht) behandelt. Vier Wochen nach der Denudation erfolgte die Tötung der Mäuse. Auch hier wurden die Fläche der Media, der Neointima und den Stenosegrad bestimmt. Zusätzlich wurden die Entzündungsreaktion und die Plaquefläche nach Ölrot-Färbung untersucht. Die Auswertung zeigte, dass sich weder nach NIM811- noch nach anti-CD147-Antikörperbehandlung von den Wildtypmäusen signifikante Unterschiede zu den Kontrollen ergaben.

Im dritten Versuchsabschnitt wurden durch die Verwendung von ApoE^{-/-}-Mäusen atherosklerotisch vorgeschädigte Arterien simuliert. Die anti-CD147-Antikörper behandelte Gruppe entwickelte keine signifikanten Unterschiede bezüglich Mediafläche, Neointimafläche, Stenosegrad und Anzahl der MAC3-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Tiere der anti-CD147-Antikörper behandelten Gruppe wiesen keinen signifikanten Unterschied der Plaquefläche im Aortenbogen auf als die Kontrollgruppe. Mit den erhobenen Daten konnte kein eindeutiger Einfluss von NIM811 und dem anti-CD147-Antikörper auf den Stenosegrad, die Entzündungsreaktion und die Plaquefläche nach einer Drahtdenudation nachgewiesen werden. Die Arbeitshypothese wurde somit nicht bestätigt. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten NIM811 bzw. anti-CD147-Antikörper nicht als möglichen neuen Therapieansatz zur Reduktion der Restenose nach Angioplastie für eine verbesserte Langzeitprognose bestätigen. Mögliche Ursachen für dieses Ergebnis könnten eine wenig standardisierte Denudation der A. carotis communis, eine unzureichende Dosis des Wirkstoffes, eine zu kurze Wirkstoffgabe oder ein ungünstig gewählter Behandlungszeitraum sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten selbstverständlich auch eine fehlende Relevanz von CD147 und CyPA in dem gewählten Restenosemodell bedeuten. Weitere Untersuchungen sind für ein besseres Verständnis des Einflusses von NIM811 und anti-CD147-Antikörper auf die Gefäßstenose notwendig. So könnte zum Beispiel ein anderes Verletzungsmodell oder eine andere Labortierspezies herangezogen werden. Ebenso könnte die Wirkstoffdosis erhöht werden, oder längere Behandlungszeiträume und Versuchsgruppen mit unterschiedlichen Behandlungszeiträumen gewählt werden.

6 Summary

Therapeutic inhibition of CD147 and Cyclophilin A in neointima formation after wire induced carotid artery denudation in mice

Atherosclerosis is a major health problem in industrial countries. An important goal is the development of new treatment options. Angioplasty is widely used to revascularize atherosclerotic artery occlusions. The injury of the vessel wall after angioplasty induces the process of wound healing. Restenosis after neointima formation disrupts the long term success rate. CD147 (EMMPRIN=extracellular matrix metalloproteinase inducer) is a binding partner for cyclophilin A (CyPA) and matrix metalloproteinases (MMPs). CD147 stimulates MMP-expression. After vascular denudation MMPs degrade extracellular matrix (ECM) and promote the migration of smooth muscle cells (SMCs) from the media to the intima. Animal experiments showed an increase of CyPA-expression after vascular injury. CyPA stimulates proliferation and the migration of SMCs into the intima. The CyPA-CD147-system induces chemotaxis for inflammatory cells.

The aim of this study was to evaluate the effect of the CD147-CyPA-system on neointima formation after endothelial damage induced by wire denudation of the carotid artery in mice. Our hypothesis was that treatment with the CyPA-inhibitor NIM811 or with an anti-CD147-antibody reduces intima proliferation, decreases the inflammatory response and results in an increased plaque stability.

In this study we used the wire denudation model in the carotid artery in C57BL/6J- and ApoE^{-/-}-mice. The evaluation took place on the bases of histomorphometric data obtained.

The first group of C57BL/6J-mice (N=7) was treated with NIM811 (30mg/kg bodyweight) after surgery for 14 days, the control group received vehicle alone. A further group of C57BL/6J-mice (N=7) was treated with an anti-CD147-antibody (1µg/g bodyweight) for 14 days, the control group with an appropriate isotype control (1µg/g bodyweight). Three weeks after the surgical intervention the mice were sacrificed and the vessels were removed. The area of the tunica media, neointima and the extent of stenosis were determined in paraffin sections.

In the third experimental group ApoE^{-/-}-mice (N=9) were used, which were fed a cholesterol rich diet. These mice were also treated with an anti-CD147-antibody (1µg/g bodyweight) or its isotype (1µg/g bodyweight) for 14 days. Four weeks after

denudation the mice were sacrificed. Again, the area of media, neointima, extent of stenosis and inflammation response was elevated. Furthermore, the plaque areas were measured after oil-red-staining.

Neither NIM811 nor anti-CD147 treatment of wild type mice resulted in significant differences compared with the control group.

In the third experimental group, ApoE^{-/-}-mice were used to simulate atherosclerotic damaged arteries. The anti-CD147-antibody treated mice showed no significant differences concerning area of media, the area of neointima, extent of stenosis or amount of MAC3-positive cells compared to the control group. The anti-CD147-antibody treated mice had a slight but not significantly smaller plaque area in the aortic arch than the control group.

With these data no effect of NIM811 and the anti-CD147-antibody could be demonstrated on stenosis, inflammation and plaques area after wire induced denudation. The hypothesis could not be confirmed. The results of this study could not show that NIM811 or an anti-CD147-antibody could be used as a new therapy for the reduction of vascular restenosis after angioplasty to get an improved long term outcome.

Possible reasons for these results might have been an improper standardized denudation of the carotid artery, an insufficient dosage of the agents to produce measurable results, or a too short or infavourable treatment period.

More experiments are necessary for better understanding of the effect of NIM811 and anti-CD147-antibodies on vascular stenosis. For example other injury models could be used or a different species of laboratory animal. Further application of higher doses of the agents, a longer treatment period or different starting points for the treatment could be chosen.

7. Auflistung der Einzelwerte

Tab.6: Einzelwerte der Fläche der Media nach Injektion von NIM811 bzw. der Lösungsmittelkontrolle in C57BL/6J-Mäusen

Lösungsmittelkontrolle		NIM811	
Maus-Nr.	Fläche in μm^2	Maus-Nr.	Fläche in μm^2
9	153479,62	4	157437,39
11	225647,58	5	156796,41
15	111242,70	8	165123,62
17	189597,83	13	95968,69
19	126582,57	18	163604,65
21	124968,50	16	219017,31
10	225200,53	20	126838,94
Mittelwert	165245,62		154969,57
SEM	$\pm 18262,54$		$\pm 14277,56$

Tab.7: Einzelwerte der Fläche der Neointima nach Injektion von NIM811 bzw. der Lösungsmittelkontrolle in C57BL/6J-Mäusen

Lösungsmittelkontrolle		NIM811	
Maus-Nr.	Fläche in μm^2	Maus-Nr.	Fläche in μm^2
9	154361,44	4	16133,29
11	3236,83	5	92233,64
15	78792,52	8	3413,90
17	60224,85	13	241523,97
19	33468,40	18	62820,93
21	45069,64	16	15197,20
10	25716,73	20	76196,96
Mittelwert	57267,20		93502,84
SEM	$\pm 18599,32$		$\pm 31716,35$

Tab.8: Einzelwerte des Stenosegrades in Prozent nach Injektion von NIM811 bzw. der Lösungsmittelkontrolle in C57BL/6J-Mäusen

	Lösungsmittelkontrolle		NIM811	
	Maus-Nr.	Fläche in %	Maus-Nr.	Fläche in %
	9	63,00	4	86,29
	11	27,44	5	47,00
	15	31,00	8	20,94
	17	37,80	13	94,00
	19	13,00	18	29,00
	21	19,00	16	20,75
	10	21,00	20	37,00
Mittelwert		30,32		47,85
SEM		±6,26		±11,48

Tab.9: Einzelwerte der Fläche der Media nach Injektion des anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in C57BL/6J-Mäusen

	Isotyp-Kontrolle		anti-CD147-AK	
	Maus-Nr.	Fläche in μm^2	Maus-Nr.	Fläche in μm^2
	2	158672,93	5	172519,42
	4	178808,39	3	191330,84
	6	192444,21	1	170883,46
	12	153808,97	11	132823,49
	16	137911,26	15	134740,25
	22	151341,65	21	165529,07
	19	178033,97	18	120061,72
Mittelwert		164431,62		155412,61
SEM		±7232,70		±9894,38

Tab.10: Einzelwerte der Fläche der Neointima nach Injektion des anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in C57BL/6J-Mäusen

Isotyp-Kontrolle		anti-CD147-AK	
Maus-Nr.	Fläche in μm^2	Maus-Nr.	Fläche in μm^2
2	156051,84	5	46747,63
4	22517,22	3	0,00
6	18201,85	1	67019,53
12	52091,03	11	21181,13
16	75563,83	15	55904,22
22	39891,61	21	75593,27
19	54709,75	18	75464,45
Mittelwert	59861,02		48844,32
SEM	$\pm 17670,92$		$\pm 10866,87$

Tab.11: Einzelwerte der Stenose in Prozent nach Injektion des anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in C57BL/6J-Mäusen

Isotyp-Kontrolle		anti-CD147-AK	
Maus-Nr.	Fläche in %	Maus-Nr.	Fläche in %
2	79,00	5	24,00
4	25,07	3	10,63
6	31,58	1	39,81
12	23,00	11	9,00
16	37,80	15	24,00
22	20,68	21	46,28
19	42,99	18	33,89
Mittelwert	37,16		26,80
SEM	$\pm 7,61$		$\pm 5,33$

Tab.12: Einzelwerte der Fläche der Media nach Injektion des anti-CD147-AKs bzw. Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen

Isotyp-Kontrolle		anti-CD147-AK	
Maus-Nr.	Fläche in μm^2	Maus-Nr.	Fläche in μm^2
47	200150,42	38	248817,63
36	213769,96	43	71588,20
44	180128,44	45	223824,88
41	93139,00	40	210686,48
48	237659,99	46	166814,13
56	284762,99	54	155372,44
72	226835,75	71	208278,00
94	273842,74	93	138639,00
73	179990,31	90	250737,00
Mittelwert	210031,07		186084,20
SEM	$\pm 19102,98$		$\pm 19476,69$

Tab.13: Einzelwerte der Fläche der Neointima nach Injektion des anti-CD147-AKs bzw. Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen

Isotyp-Kontrolle		anti-CD147-AK	
Maus-Nr.	Fläche in μm^2	Maus-Nr.	Fläche in μm^2
47	60020,70	38	64165,48
36	61305,63	43	232816,85
44	115300,75	45	67040,05
41	254796,37	40	102775,06
48	52066,03	46	78607,22
56	14620,52	54	137199,02
72	78526,75	71	92153,25
94	15447,24	93	143019,36
73	141376,98	90	42035,74
Mittelwert	88162,33		106645,78
SEM	$\pm 24983,35$		$\pm 19269,47$

Tab.14: Einzelwerte der Stenose in Prozent nach Injektion des anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen

	Isotyp-Kontrolle		anti-CD147-AK	
	Maus-Nr.	Fläche in %	Maus-Nr.	Fläche in %
	47	37,00	38	68,00
	36	39,00	43	83,00
	44	61,00	45	52,00
	41	99,00	40	68,00
	48	45,00	46	37,00
	56	22,00	54	64,00
	72	63,00	71	65,00
	94	18,00	93	58,00
	73	83,00	90	30,00
Mittelwert		51,89		58,33
SEM		±9,03		±5,49

Tab.15: Einzelwerte der Zellzahl/mm² von MAC3-positiven Zellen in der Media nach Injektion des anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen

	Isotyp-Kontrolle		anti-CD147-AK	
	Maus-Nr.	Zellzahl/mm²	Maus-Nr.	Zellzahl/mm²
	44	197,08	46	12,91
	44	62,96	46	12,50
	56	130,69	40	51,74
	56	36,55	40	77,29
	48	111,94	45	266,43
	48	62,06	45	64,28
	72	93,85	93	83,78
	72	125,69	93	21,74
Mittelwert		102,60		73,83
SEM		±17,92		±29,27

Tab.16: Einzelwerte der Zellzahl/mm² von MAC3-positiven Zellen in der Neointima nach Injektion des anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen

Isotyp-Kontrolle		anti-CD147-AK	
Maus-Nr.	Zellzahl/mm ²	Maus-Nr.	Zellzahl/mm ²
44	487,20	46	489,45
44	277,13	46	186,46
56	281,97	40	280,24
56	0,00	40	241,66
48	1308,41	45	582,31
48	196,54	45	105,54
72	358,93	93	561,24
72	428,88	93	554,38
Mittelwert	417,38		375,16
SEM	±137,80		±67,86

Tab.17: Einzelwerte der Plaquetflächen in Prozent im Aortenbogen nach Injektion des anti-CD147-AKs bzw. des Isotyps in ApoE^{-/-}-Mäusen

Isotyp-Kontrolle		anti-CD147-AK	
Maus-Nr.	%	Maus-Nr.	%
48	51,02	38	43,86
47	45,11	34	55,70
41	44,52	43	42,77
44	50,15	40	42,37
36	55,98	45	48,43
72	49,06	46	44,27
94	49,30	90	46,73
Mittelwert	49,31		46,30
SEM	±1,45		±1,77

Tab.18: Einzelwerte der Plaueflächen in Prozent der Aortenklappe nach Applikation des anti-CD147-AKs bzw. Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen

	Isotyp-Kontrolle		anti-CD147-AK	
	Maus-Nr.	%	Maus-Nr.	%
	56	33,18	40	50,60
	36	46,62	38	41,43
	44	32,71	45	35,21
	48	40,45	54	15,01
	41	31,12	43	54,71
	47	35,20	46	42,17
Mittelwert		36,55		39,85
SEM		±2,41		±5,72

Tab.19: Einzelwerte der Plaueflächen in Prozent von der Aortenwurzel nach Applikation des anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen

	Isotyp-Kontrolle		anti-CD147-AK	
	Maus-Nr.	%	Maus-Nr.	%
	56	17,24	40	43,20
	36	48,38	38	42,08
	44	36,19	45	28,60
	48	34,77	54	8,58
	41	28,74	43	61,23
	47	32,19	46	44,89
Mittelwert		32,92		38,10
SEM		±4,15		±7,27

Tab.20: Einzelwerte der Plaueflächen in µm² der Aortenklappe nach Applikation des anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen

	Isotyp-Kontrolle		anti-CD147-AK	
	Maus-Nr.	µm ²	Maus-Nr.	µm ²
	56	377858,40	40	598907,20
	36	828336,00	38	664301,60
	44	381026,40	45	519599,20
	48	538529,60	54	127464,00
	41	415780,80	43	849102,40
	47	486499,20	46	498513,60
Mittelwert		504671,73		542981,33
SEM		±69643,51		±97764,20

Tab.21: Einzelwerte der Plaqueflächen in μm^2 von der Aortenwurzel nach Applikation des anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen

		Isotyp-Kontrolle		anti-CD147-AK	
		Maus-Nr.	μm^2	Maus-Nr.	μm^2
		56	202580,00	40	510162,00
		36	789581,33	38	646956,33
		44	478366,00	45	384902,00
		48	417680,67	54	75914,67
		41	365976,00	43	878406,67
		47	381291,33	46	583118,00
Mittelwert			439245,89		513243,28
SEM			$\pm 79470,81$		$\pm 110127,69$

8. Literaturverzeichnis

- SM AGRAWAL, C SILVA, WW TOURTELLOTTE, VW YONG (2011)**
EMMPRI: A Novel Regulator of Leukocyte Transmigration into the CNS in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.
J Neurosci; 31(2): 669-677
- M AOYAGI, M YAMAMOTO, H AZUMA, G NAGASHIMA, Y NIIMI, M TAMAKI, K HIRAKAWA, K YAMAMOTO (1998)**
Immunolocalization of matrix metalloproteinases in rabbit carotid arteries after balloon denudation.
Histochem Cell Biol; 109(2): 97-102
- CM ARAUJO, GA RANDO, MF MAURO, SAB CRISTÓVÃO, ISM SANCHEZ, AA SALMAN, JBO NETO, JA MANGIONE (2005)**
Batimastat-eluting stent implantation for treatment of coronary artery disease: result of the Brazilian pilot study.
Arq Bras Cardiol; 84(3): 256-60
- L ARGAUD, O GATEAU-ROESCH, O RAISKY, J LOUFOUAT, D ROBERT, M OVIZE (2005)**
Postconditioning Inhibits Mitochondrial Permeability Transition.
Circulation; 111(2): 194-197
- K ARORA, WM GWINN, MA BOWER, A WATSON, I OKWUMABUA, HR MACDONALD, MI BUKRINSKY, SL CONSTANT (2005)**
Extracellular cyclophilin contribute to the regulation of inflammatory responses.
J Immunol; 175(1): 517-522
- MN BABAPULLE, L JOSEPH, P BÉLISLE, JM BROÏPHY, MJ EISENBERG (2004)**
A hierarchical Bayesian meta-analysis of randomised clinical trials of drug-eluting stents.
Lancet; 364(9434): 583-591
- EK BAKER, NJ COLLEY, CS ZUKER (1994)**
The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex in vivo with its protein farget rhodopsin.
EMBO J; 13(20): 4886-4895
- BAUMHOER, STEINBRÜCK, GÖTZ (2003)**
Kurzlehrbuch Histologie
Urban & Fischer 2. Auflage; 91-94
- G BAURIEDEL, R KANDOLF, U WELSCH, B HÖFLING (1994)**
Mechanismen der Restenosierung nach Angioplastie.
Z Kardiol; 83(4): 31-41

V BHATIA, R Bhatia, M Dhindsa (2004)

Drug-eluting stents: new era and new concerns.

Postgrad Med J; 80(939): 13-18

JL BEAUDEUX, P GIRAL, E BRUCKERT, M-J FOGLIETTI, MJ CHAPMAN (2004)

Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives.

Clin Chem Lab Med; 42(2): 121-131

S BELLOSTA, RW MAHLEY, DA SANAN, J MURATA, DL NEWLAND, JM TAYLOR, RE PITAS (1995)

Macrophage-specific expression of human apolipoprotein e reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein e-null mice.

J Clin Invest; 96(5): 2170-2179

MP BENDECK, N ZEMPO, AW CLOWES, RE GALARDY, MA REIDY (1994)

Smooth muscle migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat.

Circ Res; 75(3): 539-545

MP BENDECK, C IRVIN, MA REIDY (1996)

Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury.

Circ Res; 78(1): 38-43

MP BENDECK, M CONTE, M ZHANG, N NILI, † BH STRAUSS, † SM FARWELL (2002)

Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury.

Am J Pathol; 160(3): 1089-95

Y BEN-YOSEF, N LAHAT, S SHAPIRO, H BITTERMAN, A MILLER (2002)

Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation.

Circ Res; 90(7): 784-791

F BERDITCHEVSKI, S CHANG, J BODOROVA, ME Hemler (1997)

Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins.

J Biol Chem; 272(46): 29174-29180

HM VAN BEUSEKOM, MJ POST, DM WHELAN, BJ DE SMET, DJ DUNCKER, WJ VAN DER GIESSEN (2003)

Metalloproteinase inhibition by batimastat does not reduce neointimal thickening in stented atherosclerotic porcine femoralis arteries.

Cardiovasc Radiat Med; 4(4): 186-91

A BILLICH, G WINKLER, H ASCHAUER, A ROT, P PEICHL (1997)

Presence of cyclophilin a in synovia fluids of patient with rheumatoid arthritis.

J Exp Med; 185 (5): 975-980

A BILLICH, F HAMMERSCHMID, P PEICHL, R WENGER, G ZENKE, V QUESNIAUX, B ROSENWIRTH (1995)

Mode of action of SDZ NIM811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus (HIV) typ 1: interference with HIV protein-cyclophilin A interactions.

J Virol; 69(4): 2451-2461

C BISWAS (1982)

Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts.

Biochem Biophys Res Commun; 109(3): 1026-1034

C BISWAS (1984)

Collagenase stimulation in cocultures of human fibroblasts and human tumor cells.

Cancer Lett; 24(2): 201-207

C BISWAS, Y ZHANG, R DECASTRO, H GUO, T NAKAMURA, H KATAOKA, K NABESHIMA (1995)

The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed emmprin) is a member of the immunoglobulin superfamily.

Cancer Res; 55(2): 434-439

T BOENISCH (2003)

Handbuch Immunchemische Färbungen, 3. Auflage

DakoCytomation GmbH, Hamburg Deutschland

WS BRADHAM, G MOE, KA WENDT, AA SCOTT, A KONIG, M ROMANOVA, G NAIK, FG SPINALE (2002)

TNF- α and myocardial matrix metalloproteinases in heart failure: relationship to LV remodeling.

Am J Physiol Heart Circ Physiol; 282(4): H1288-1295

K BREW, D DINAKARPANDIAN, H NAGASE (2000)

Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function.

Biochim Biophys Acta; 1477: 267-283

DL BROWN, MS HIBBS, M KEARNEY, C LOUSHIN, JM ISNER (1995)

Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina.

Circulation; 91(8): 2125-2131

AP BURKE, FD KOLODGIE, A FARB, DK WEBER, GT MALCOM, J SMIALEK, R VIRMANI (2001)

Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression.

Circulation; 103(7): 934-940

C BUSTI, E FALCINELLI, S MOMI, P GRESELE (2009)

Matrix metalloproteinases and peripheral arterial disease.
Intern Emerg Med; 5(1): 13-25

P CARMELIET, L MOONS, JM STASSEN, M DE MOL, A BOUCHÉ, JJ VAN DEN OORD, M KOCKX, D COLLEN (1997)

Animal model vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice.
Am J Pathol; 150 (2): 761-776

P CARMELIET, L MOONS, D COLLEN (1998)

Mouse model of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis.
Cardiovasc Res; 39(1): 8-33

TW CARRELL, KG BURNAND, GM WELLS, JM CLEMENTS, A SMITH (2002)

Stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are overexpressed in the wall of abdominal aortic aneurysms.
Circulation; 105(4): 477-482

JM CATANIA, G CHEN, AR PARRISH (2007)

Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology.
Am J Physiol Renal Physiol; 292(3): 905-911

S CAUDROY, M POLETTE, JM TOURNIER, H BURLET, T TOOLE, S ZUCKER, P BIREMBAUT (1999)

Expression of the extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and the matrix metalloproteinase-2 in bronchopulmonary and breast lesions.
J Histochem Cytochem; 47(12): 1575-1580

S CAUDROY, M POLETTE, B NAWROCKI-RABY, J CAO, BP TOOLE, S ZUCKER, P BIREMBAUT (2002)

EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells.
Clin Exp Metastasis; 19(8):697-702

F DE CEUNINCK, F ALLAIN, A CALIEZ, G SPIK, PM VANHOUTTE (2003)

High binding capacity of cyclophilin B to chondrocyte heparan sulfate proteoglycans and its release from the cell surface by matrix metalloproteinases: possible role as a proinflammatory mediator in arthritis.
Arthritis Rheuma; 48(8): 2197-2206

J CHAMBERLAIN, M WHEATCROFT, N ARNOLD, H Lupton, DC CROSSMAN, J GUNN, S FRANCIS (2010)

A novel mouse model of in situ stenosing.
Cardiovasc Res; 85(1): 38-44

L CHEN, M NAKAI, RJ BELTON JR, RA NOWAK (2007)

Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinases during mouse embryonic development.

Reproduction; 133(2):405-414

GS CHERR, SJ MOTEW, JA TRAVIS, J Fingerle, L Fisher, M Brandl, Jk Williams, RI Geary (2002)

Metalloproteinase inhibition and the response to angioplasty and stenting in atherosclerotic primates.

Arterioscler Thromb Vasc Biol; 22(1): 161-166

A CHO, MA REIDY (2002)

Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury.

Circ Res; 91(9): 845-851

AK CHOW, J CENA, R SCHULZ (2007)

Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature.

Br J Pharmacol; 152(2): 189-205

JP CLEUTJENS, JC KANDALA, E GUARDA, RV GUNTAKA, KT WEBER (1995)

Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction.

J Mol Cell Cardiol; 27(6): 1281-1292

AW CLOWES, MA REIDY, MM CLOWES (1983)

Mechanisms of stenosis after arterial injury.

Lab Invest; 49(2): 208-215

NJ COLLEY, EK BAKER, MA STAMNES, CS ZUKER (1991)

The cyclophilin homolog ninaa is required in the secretory pathway.

Cell; 67(2): 255-263

EE CREEMERS, JP CLEUTJENS, JF SMITS, MJ DAEMEN (2001)

Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure.

Circ Res; 89(3): 201-210

JM DAMSKER, MI BURKINSKY, SL CONSTANT (2007)

Preferential chemotaxis of activated human CD4⁺ T cells by extracellular cyclophilin A. J

Leukoc Biol; 82(3): 613-618

JM DAMSKER, I OKWUMABUA, T PUSHKARSKY, K ARORA, MI BUKRINSKY, SL CONSTANT (2009)

Targeting the chemotaxis function of CD147 reduces collagen-induced arthritis.

Immunology; 126(1): 55-62

K DAUB, H LANGER, P SEIZER, K STELLOS, AE MAY, P GOYAL, B BIGALKE, T SCHÖNBERGER, T GEISLER, D SIEGEL-AXEL, RA OOSTENDORP, S LINDEMANN, M GAWAZ (2006)

Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells.

FASEB J; 20(14): 2559-2561

K DAUB, S LINDEMANN, H LANGER, P SEIZER, K STELLOS, D SIEGEL-AXEL, M GAWAZ (2007)

The evil in atherosclerosis: adherent platelets induce foam cell formation.

Semin Thromb Hemost; 33(2): 173-178

A DAUGHERTY (2002)

Mouse models of atherosclerosis.

Am J Med Sci; 323(1): 3-10

MJ DAVIES (1992)

Anatomic features in victims of sudden coronary death: coronary artery pathology.

Circulation; 85(1): 119-124

MG DAVIES, PO HABEN (1994)

Pathobiology of intimal hyperplasia.

Br J Surg; 81(9): 1254-1269

EI DERYUGINA, JP QUIGLEY (2006)

Matrix metalloproteinases and tumor metastasis.

Cancer Metastasis Rev; 25(1): 9-34

C DESURMONT, JM CAILLAUD, F EMMANUEL, P BENOIT, JC FRUCHART, G GASTRO, D BRANELLEC, JM HEARD, N DUVERGER (2000)

Complete atherosclerosis regression after human ApoE gene transfer in ApoE-deficient/nude mice.

Arterioscler Thromb Vasc Biol; 20(2): 435-442

M EGEBLAD, Z WERB (2002)

New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.

Nat Rev Cancer; Vol. 2(3): 161-174

SM ELLIS, K NABESHIMA, C BISWAS (1989)

Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor.

Cancer Res; 49(12): 3385-3391

G EMILIEN, JM MALOTEAUX, K BEYREUTHER, CL MASTERS (2000)

Alzheimer Disease: mouse models pave the way for therapeutic opportunities.

Arch Neurol; 57(2): 176-181

E FALK, PK SHAH, V FUSTER (1995)

Coronary plaque disruption.
Circulation; 92(3): 657-671

QW FAN, K KADOMATSU, K UCHIMURA, T MURAMATSU (1998)

Embigin/basigin subgroup of the immunoglobulin superfamily: Different modes of expression during mouse embryogenesis and correlated expression with carbohydrate antigenic markers.
Dev Growth Differ; 40(3): 277-286

LJ FELDMAN, M MAZIGHI, A SCHEUBLE, JF DEUX, E DE BENEDETTI, C BADIÉ-COMMANDER, E BRAMBILLA, D HENIN, PG STEG, MP JACOB (2001)

Differential expression of matrix metalloproteinases after stent implantation and balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit.
Circulation; 103(25): 3117-3122

M FERRELL, V FUSTER, HK GOLD, JH CHESEBRO (1992)

A dilemma for the 1990s. Choosing appropriate experimental animal model for the prevention of restenosis.
Circulation; 85(4): 1630-1631

P FERRONI, S BASILI, F MARTINI, CM CARDARELLO, F CECI, M DI FRANCO, G BERTAZZONI, PP GAZZANIGA, C ALESSANDRI (2003)

Serum metalloproteinase 9 levels in patients with coronary artery disease: a novel marker of inflammation.
J Investig Med; 51(5): 295-300

J FINGERLE, R JOHNSON, AW CLOWS, MW MAJESKY, MA REIDY (1989)

Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery.
Proc natl Acad Sci U S A; 86(21): 8412-8416

G FISCHER, H BANG, C MECH (1984)

Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides.
Biomed Biochim Acta; 43(10):1101-1111

G FISCHER, P Gallay, S Hopkins (2010)

Cyclophilin inhibitors for the treatment of HCV infection.
Curr Opin Investig Drugs; 11(8): 911-918

DL FISCHMAN, MB LEON, DS BAIM, RA SCHATZ, MP SAVAGE, I PENN, K DETRE, L VELTRI, D RICCI, M NOBUYOSHI, M CLEMAN, R HEUSER, D ALMOND, PS TEIRSTEIN, RD FISH, A COLOMBO, J BRINKER, J MOSES, A SHAKNOVICH, J HIRSHFELD, S BAILEY, S ELLIS, R RAKE, S GOLDBERG (1994)

A Randomized Comparison of Coronary-Stent Placement and Balloon Angioplasty in the Treatment of Coronary artery Disease. Stent Restenosis Study Investigators.
N Engl J of Med; 331(8): 496-501

S FOSSUM, S MALLETT, AN BARCLAY (1991)

The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence.

Eur J Immunol; 21(3): 671-679

EE GABISON, T HOANG-XUAN, A MAUVIEL, S MENASHI (2005)

EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair.

Biochemie; 87(3-4): 361-368

A GALAT (1993)

Peptidylproline cis-trans-isomerase: immunophilins.

Eur J Biochem; 216(3): 689-707

ZS GALIS, M MUSZYNSKI, GK SUKHOVA, E SIMON-MORRISSEY, EN UNEMORI, MW LARK, E AMENTO, P LIBBY (1994)

Cytokine-Stimulated Human Vascular Smooth Muscle Cells Synthesize a Complement of Enzyme Required for Extracellular Matrix Digestion.

Circ Res; Vol 75(1): 181-189

ZS GALIS, GK SUKHOVA, MW LARK, P LIBBY (1994)

Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques.

J Clin Invest; 94(6): 2493-2503

ZS GALIS, GK SUKHOVA, R KRANZHÖFER, S CLARK, P LIBBY (1995)

Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases.

Proc Natl Acad Sci USA; 92(2): 402-406

ZS GALIS, R KRANZHÖFER, JW FENTON 2nd, P LIBBY (1997)

Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells.

Arterioscler Thromb Vasc Biol; 17(3): 483-489

ZS GALIS, JJ KHATRI (2002)

Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling and Atherogenesis: The Good, the Bad, and the Ugly.

Circ Res; 90(3): 251-262

ZS GALIS, C JOHNSON, D GODIN, R MAGID, JM SHIPLEY, RM SENIOR, E IVAN (2002)

Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling.

Circ Res; 91(9): 852-859

M GAWAZ (2004)

Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium.

Cardiovasc Res; 61(3): 498-511

M GAWAZ, H LANGER, AE MAY (2005)

Platelets in inflammation and atherogenesis.

J Clin Invest; 115(12): 3378-3384

B DE GEEST, Z ZHAO, D COLLEN, P HOLVOET (1997)

Effects of adenovirus-mediated human Apo A-I gene transfer on neointima formation after endothelial denudation in Apo E-deficient mice.

Circulation; 96(12): 4349-4356

P GOLINO, G AMBROSIO, M RAGNI, P CIRILLO, N ESPOSITO, JT WILLERSON, R ROTHLEIN, L PETRUCCI, M CONDORELLI, M CHIARIELLO M, LM BUJA (1997)

Inhibition of leukocyte and platelet adhesion reduces intimal hyperplasia after arterial injury.

Thromb Haemost; 77(4): 783-788

SF GÖTHEL, MA MARAHIEL (1999)

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts.

Cell Mol Life Sci; 55(3): 423-436

PJ GOUGH, IG GOMEZ, PT WILLE, EW RAINES (2006)

Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice.

J Clin Invest; 116(1): 59-69

K GREENOW, NJ PEARCE, DP RAMJI (2005)

The key of apolipoprotein E in atherosclerosis.

J Mol Med (Berl); 83(5): 329-342

S GUPTA, AM PABLO, XC JIANG, N WANG, AR TALL, C SCHINDLER (1997)

IFN- γ Potentiates Atherosclerosis in ApoE Knock-out Mice.

J Clin Invest; 99(11): 2752-2761

H GUO, R LI, S ZUCKER, BP TOOLE (2000)

EMMPRIM (CD147), an Inducer of Matrix Metalloproteinase Synthesis, Also Binds Interstitial Collagenase to the Tumor Cell Surface.

Cancer Res; 60(4):888-891

WM GWINN, JM DAMSKER, R FALAHATI, I OKWUMABUA, A KELLY-WELCH, AD KEEGAN, C VANPOUILLE, JJ LEE, LA DENT, D LEITENBERG, MI BUKRINSKY, SL CONSTANT (2006)

Novel Approach to Inhibit Asthma-Mediated Lung Inflammation Using Anti-CD147 Intervention.

J Immunol; 177(7): 4870-4879

R HAFNER (2011)

Einfluss von Progenitorzellen auf die vaskuläre Regeneration im Mausmodell. VVB

Dissertation; Laufersweiler Verlag, Giessen

I HALPERT, UI SIRES, JD ROBY, S POTTER-PERIGO, TN WIGHT, SD SHAPIRO, HG WELGUS, SA WICKLINE, WC PARKS (1996)

Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophage at site of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme.

Proc Natl Acad Sci USA; 93(18): 9748-9753

LH MBYE, IN SINGH, KM CARRICO, KE SAATMAN, ED HALL (2009)

Comparative neuroprotective effects of cyclosporine A and NIM811, a nonimmunosuppressive cyclosporine A analog, following traumatic brain injury.

J Cereb Blood Flow Metab; 29(1): 87-97

D HARRISON, KK GRIENGLING, U LANDMESSER, B HORNIG, H DREXLER (2003)

Role of oxidative stress in atherosclerosis.

Am J Cardiol; 91(3A): 7A-11A

KW HASEL, JR GLASS, M GODBOUT, JG SUTCLIFFE (1991)

An endoplasmic reticulum-specific cyclophilin.

Mol Cell Biol; 11(7): 3484-3491

AH HASTY, MF LINTON, SJ BRANDT, VR BABAEV, LA GLEAVES, S FAZIO (1999)

Retroviral gene therapy in apoE-deficient mice: ApoE expression in the artery wall reduces early foam cell lesion formation.

Circulation; 99(19): 2571-2576

C HAUG, C LENZ, F DÍAZ, MG BACHEM (2004)

Oxidized low-density lipoproteins stimulates extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) release by coronary smooth muscle cells.

Arterioscler Thromb Vasc Biol; 24(10): 1823-1829

MJ HOBEIKA, RW THOMPSON, BE MUHS, PC BROOKS, PJ GAGNE (2007)

Matrix metalloproteinases in peripheral vascular disease.

J Vasc Surg; Vol 45(4); 849-857

MH HOFKER, BJ VAN VLIJMEN, LM HAVEKES (1998)

Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis.

Atherosclerosis; 137(1): 1-11

Y HOJO, U IKEDA, TA KATSUKI, O MIZUNO, H FUJIKAWA, K SHIMADA (2002)

Matrix metalloproteinase expression in the coronary circulation induced by coronary angioplasty.

Atherosclerosis; 161(1): 185-192

YM HONG (2010)

Atherosclerotic Cardiovascular Disease Beginning in Childhood.

Korean Circ J; 40(1): 1-9

K HORI, N KATAMYAMA, S KACHI, M KONDO, K KADOMATSU, J USUKURA, T MURAMATSU, S MORI, Y MIYAKE (2000)

Retinal Dysfunction in Basigin Deficiency.

Invest Ophthalmol Vis Sci; 41(10):3128-3133

F HORN, G LINDENMEIER, I MOC, C GRILLHÖSEL, S BERGHOLD, N SCHNEIDER, B MÜNSTER (2002)

Biochemie des Menschen.

Thieme; 2. Auflage; S. 556

DY HUI (2008)

Intimal Hyperplasia in Murine Models.

Curr Drug Targets; 9 (3): 251-260

KT IACONO, AL BROWN, MI GREENE, SJ SAOUAF (2007)

CD147 Immunoglobulin Superfamily Receptor Function and Role in Pathology.

Exp Mol Pathol; 83(3): 283-295

T IGAKURA, K KADOMATSU, T KANAME, H MURAMATSU, QW FAN, T MIYAUCHI, Y TOYAMA, N KUNO, S YUASA, M TAKAHASHI, T SENDA, O TAGUCHI, K YAMAMURA, K ARIMURA, T MURAMATSU (1998)

A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis.

Dev Biol; 194(2): 152-165

T INOUE, K NODE (2009)

Molecular Basis of Restenosis and Novel Issues of Drug-Eluting Stents.

Circ J; 73(4): 615-621

W Jr INSULL (2009)

The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment.

Am J Med; 122(1):3-14

J JAWIEŃ, P NASTALEK, R KORBUT (2004)

Mouse models of experimental atherosclerosis.

J Physiol Pharmacol; 55(3): 503-517

GM JENKINS, MT CROW, C BILATO, Y GLUZBAND, WS RYU, W SETLER-STEVENSON, C NATER, JP FROEHLICH, EG LAKATTA, L CHENG (1998)

Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries.

Circulation; 97(1): 82-90

JL JIANG, J TANG (2007)

CD147 and its interacting proteins in cellular functions.

Sheng Li Xue Bao; 59(4): 517-523

- ZG JIN, MG MELARAGNO, DF LIAO, C YAN, J HAENDELER, YA SUH, JD LAMBETH, BC BERK (2000)**
Cyclophilin A Is a Secreted Growth Factor Induced by Oxidative Stress.
Circ Res; 87(9):789-796
- ZG JIN, AO LUNGU, L XIE, M WANG, C WONG, BC BERK (2004)**
Cyclophilin A Is a Proinflammatory Cytokine that Activates Endothelial Cells.
Arterioscler Thromb Vasc Biol; 24(7): 1186-1191
- CB JONES, DC SANE, DM HERRINGTON (2003)**
Matrix metalloproteinases: A review of their structure and role in acute coronary syndrome.
Cardiovasc Res; 59(4): 812-823
- M KAARTINEN, A PENTTILÄ, PT KOVANEN (1994)**
Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture.
Circulation; 90(4): 1669-1678
- H KAI, H IKEDA, H YASUKAWA, M KAI, Y SEKI, F KUWAHARA, T UENO, K SUGI, T IMAIZUMI (1998)**
Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes.
J Am Coll Cardiol; 32(2): 368-72
- T KANEKURA, T MIYAUCHI, M TASHIRO, T MURAMATSU (1991)**
Basigin, a new member of the immunoglobulin superfamily: genes in different mammalian species, glycosylation changes in the molecule from adult organs and possible variation in the N-terminal sequences.
Cell Struct Funct; 16(1): 23-30
- H KATAOKA, R DECASTRO, S ZUCKER, C BISWAS (1993)**
Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kda gelatinase.
Cancer Res; 53(13): 3154-3158
- H KIM, WJ KIM, ST JEON, EM KOH, HS CHA, KS AHN, WH LEE (2005)**
Cyclophilin A may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages.
Clin Immunol; 116(3): 217- 224
- P KIRK, MC WILSON, C HEDDLE, MH BROWN, AN BARCLAY, AP HALESTRAP (2000)**
CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression.
EMBO J; 19(15) 3896-3904
- C KOCH, G STAFFLER, R HÜTTINGER, I HILGERT, E PRAGER, J CERNÝ, P STEINLEIN, O MAJDIC, V HOREJSÍ, H STOCKINGER (1999)**
T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density.
Int Immunol; 11(5):777-786

YT KONTTINEN, TF LI, J MANDELIN, M LILJESTRÖM, T SORSA, S SANTAVIRTA, I VIRTANEN (2000)

Increased Expression Of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer In Rheumatoid Synovium.

Arthritis Rheuma; 43(2): 275-280

R KORNOWSKI, MK HONG, FO TIO, O BRAMWELL, H WU, MB LEON (1998)

In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia.

J Am Coll Cardiol; 31(1): 224-230

N KUNO, K KADOMATSU, QW FAN, M HAGIHARA, T SENDA, S MIZUTANI, T MURAMATSU (1998)

Female sterility in mice lacking the basigin gene, which encodes a transmembrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily.

FEBS Lett; 425(2): 191-194

M KUZUYA, S KANDA, T SASAKI, N TAMAYA-MORI, XW CHENG, T ITOH, S ITOHARA, A IGUCHI (2003)

Deficiency of gelatinase a suppresses smooth muscle cell invasion and development of experimental intimal hyperplasia.

Circulation; 108(11): 1375-1381

KE KYPREOS, I KARAGIANNIDES, EH FOTIADOU, EA KARAVIA, MS BRINKMEIER, SM GIAKOUMI, EM TSOMPANIDI (2009)

Mechanisms of obesity and related pathologies: Role of apolipoprotein E in the development of obesity.

FEBS J; 276(20): 5720-5728

SE LEE, SH JOHN, JH LIM, JY RHEW (2008)

Very Late Thrombosis Associated With Multiple Stent Fractures and Peri-Stent Aneurysm Formation After Sirolimus-Eluting Stent Implantation.

Circ J; 72(7): 1201-1204

JE LEIDENFROST, MF KHAN, KP BOC, BR VILLA, ET COLLINS, WC PARKS, DR ABENDSCHEIN, ET CHOI (2003)

Animal model a model of primary atherosclerosis and post-angioplasty restenosis in mice.

Am J Pathol; 163(2): 773-778

Z LI, L LI, HR ZIELKE, L CHENG, R XIAO, MT CROW, WG SETTLER-STEVENSON, J FROEHLICH, EG LAKATTA (1996)

Increased expression of 72-kd Type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions.

Am J Pathol; 148(1): 121-128

YY LI, AM FELDMAN, Y SUN, CF MCTIERNAN (1998)

Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart. *Circulation*; 98(17): 1728-1734

R LI, L HUANG, H GUO, BP TOOLE (2001)

Basigin (murine EMMPRIN) stimulates matrix metalloproteinase production by fibroblasts. *J Cell Physiol*; 186(3): 371-379

C LI, WJ CANTOR, N NILI, R ROBINSON, L FENKELL, YL TRAN, HA WHITTINGHAM, W TSUI, AN CHEEMA, JD SPARKES, K PRITZKER, DE LEVY, BH STRAUSS (2002)

Arterial repair after stenting and the effects of GM6001, a matrix metalloproteinase inhibitor. *J Am Coll Cardiol*; 39(11): 1852-1858

W LI, N ALFAIDY, JR CHALLIS (2004)

Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human placenta and fetal membranes at term labor.

J Clin Endocrinol Metab; 89(6): 2897-2904

P LIBBY, YJ GENG, GK SUKHOVA, DI SIMON, RT LEE (1997)

Molecular determinants of atherosclerotic plaque vulnerability.

Ann N Y Acad Sci; 811: 134-142

P LIBBY (2000)

Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization.

Am J Cardiol; 86 (8B): 3J-8J

P LIBBY (2003)

Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art.

Am J Cardiol; Vol 91(3A): 3A-6A

P LIBBY (2008)

The molecular mechanisms of the thrombotic complication of atherosclerosis.

J Intern Med; 263(5): 517-527

P LIBBY, Y OKAMOTO, VZ ROCHA, E FOLCO (2009)

Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice.

Circ J; 74(2): 213-20

HR LIJNEN, B VAN HOEF, F LUPU, L MOONS, P CARMELIET, D COLLEN (1998)

Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes.

Arterioscler Thromb Vasc Biol; 18(7): 1035-1045

HR LIJNEN (2003/2004)

Metalloproteinases in development and progression of vascular disease.

Pathophysiol Haemost Thromb; 33(5-6): 275-281

V LINDNER, J FINGERLE, MA REIDY (1993)

Mouse model of arterial injury.

Circ Res; 73(5): 792-796

P LIU, M RUDICK, RG ANDERSON (2002)

Multiple function of caveolin-1.

J Biol Chem; 277(44): 41295-41298

H LIU, L YANG, R GUO, G ZHU, Y SHI, X WANG, F QI, C GUO, J YE, Z YANG, X LIANG (2013)

Functional blockage of EMMPRIN ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.

Int J Cardiol; S0167-5273(13)00788-2

CA LOWELL, TN MAYADAS (2012)

Overview: studying integrins in vivo.

Methods Mol Biol; 757: 369-397

AJ LUSIS (2000)

Atherosclerosis.

Nature; 407(6801):233-241

S MA, JE BOERNER, C TIONG YIP, B WEIDMANN, NS RYDER, MP COOREMAN, K LIN (2006)

NIM811, a cyclophilin inhibitor, exhibits potent in vitro activity against hepatitis c virus alone or in combination with alpha interferon.

Antimicrob Agents Chemother; 50(9): 2976-2982

RW MAHLEY (1988)

Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology.

Science; 240(4852): 622-630

CJ MALEMUD (2006)

Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview.

Front Biosci; 11: 1696-1701

MW MAJESKY (1994)

Neointima Formation after Acute Vascular Injury.

Tex Heart Inst J; 21(1): 78-85

TC MAJOR, L LIANG, X LU, W ROSEBURY, TM BOCAN (2002)

Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is induced upon monocyte differentiation and expressed in human atheroma.

Arteriocler Thromb Vasc Biol; 22(7): 1200-1207

JE MATHY, S MA, T COMPTON, K LIN (2008)

Combinations of Cyclophilin Inhibitor NIM811 with Hepatitis C Virus NS3-4A Protease or NS5B Polymerase Inhibitors Enhance Antiviral Activity and Suppress the Emergence of Resistance.

Antimicrob Agents Chemother; 52(9): 3267-3275

CM MATTER, L MA, T VON LUKOWICZ, P MEIER, C LOHMANN, D ZHANG, U KILIC, E HOFMAN, SW HA, M HERSBERGER, DM HERMANN, TF TÜSCHER (2006)

Increased balloon-induced inflammation, proliferation, and neointima formation in Apolipoprotein E (ApoE) knockout mice.

Stroke; 37(10): 2625-2632

KS MEIR, E LEITERSDORF (2004)

Atherosclerosis in the Apolipoprotein E-deficient mouse: a decade of progress.

Arterioscler Thromb Vasc Biol; 24(6): 1006-1014

DG MEURER, STEFANIE WOLF (2006)

Allgemeine Pathologie

Kompodium für Tiermediziner; 2. Auflage Schattauer. S. 67

V MIKOL, J KALLEN, MD WALKINSHAW (1994)

X-ray structure of a cyclophilin B/cyclosporine complex: Comparison with cyclophilin A and delineation of its calcineurin-binding domain.

Proc Natl Acad Sci USA; 91(11):5183-5186

AM MILLER, AR MCPHADEN, RM WADSWORTH, CL WAINWRIGHT (2001)

Inhibition by leukocyte depletion of neointima formation after balloon angioplasty in a rabbit model of restenosis.

Cardiovasc Res; 49(4): 838-850

T MIYAUCHI, T KANEKURA, A YAMAOKA, M OZAWA, S MIYAZAWA, T MURAMATSU (1990)

Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homolog with both the immunoglobulin v domain and the β -chain of major histocompatibility complex class II antigen.

J Biochem; 107(2): 316-323

T MIYAUCHI, Y MASUZAWA, T MURAMATSU (1991)

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; 110(5): 770-774

MH MOGHADASIAN (2002)

Minireview: experimental atherosclerosis a historical overview.

Life Sci; 70(8):855-865

PR MORENO, E FALK, IF PALACIOS, JB NEWELL, V FUSTER, JT FALLON (2003)
Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture.
Circulation; 90(2): 775-778

JW MOSES, MB LEON, JJ POPMA, PJ FITZGERALD, DR HOLMES, C O'SHAUGHNESSY, RP CAPUTO, DJ KEREIAKES, DO WILLIAMS, PS TEIRSTEIN, JL JAEGER, RE KUNTZ (2003)
Sirolimus-Eluting Stents versus Standard Stents in Patients with Stenosis in a Native Coronary Artery.
N Engl J Med; 349 (14): 1315-1323

T MURAMATSU, T MIYAUCHI (2003)
Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion.
Histol Histopathology; 18(3): 981-987

K NABESHIMA, H IWASAKI, K KOGA, H HOJO, J SUZUMIYA, M KIKUCHI (2006)
Emmprin (basigin/CD147): Matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression.
Pathol Int; 56(7): 359-367

H NAGASE, JF Jr WOESSNER (1999)
Matrix metalloproteinases.
J Biol Chem; 274(31): 21491-21494

M NAKAI, L CHEN, RA NOWAK (2006)
Tissue distribution of basigin and monocarboxylate transporter 1 in the adult male mouse: a study using the wild-type and basigin gene knockout mice.
Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol; 288(5): 527-535

Y NAKASHIMA, AS PLUMP, EW RAINES, JL BRESLOW, R ROSS (1994)
ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree.
Arterioscler Thromb; 14(1):133-140

K NARUHASHI, K KADOMATSU, T IGAKURA, QW FAN, N KUNO, H MURAMATSU, T MIYAUCHI, T HASEGAWA, A ITOH, T MURAMATSU, T NABESHIMA (1997)
Abnormalities of sensory and memory functions in mice lacking Bsg gene.
Biochem Biophys Res Commun; 236(3): 733-737

AC NEWBY, AB ZALTSMAN (2000)
Molecular mechanisms in intimal hyperplasia.
J Pathol; 190(3): 300-309

AC NEWBY (2005)

Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture.

Physiol Rev; 85(1): 1-31

KM NEWMAN, Y OGATA, AM MALON, E IRIZARRY, RH GANDHI, H NAGASE, MD TILSON (1994)

Identification of matrix metalloproteinases 3 (stromelysin-1) and 9 (gelatinase B) in abdominal aortic aneurysm.

Arterioscler Thromb; 14(8): 1315-1320

P NIGRO, K SATOH, MR O`DELL, NN SOE, Z CUI, A MOHAN, J ABE, JD ALEX, JD SPARKS, BC BERK (2011)

Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.

J Exp Med; 208: 53-66

M NODA, J OH, R TAKAHASHI, S KONDO, H KITAYAMA, C TAKAHASHI (2003)

RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling.

Cancer Metastasis Rev; 22(2-3): 167-175

Y NOGUCHI, T SATO, M HIRATA, T HARA, K OHAMA, A ITO (2003)

Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human endometrium during the menstrual cycle in vivo and in vitro.

J Clin Endocrinol Metab; 88(12):6063-6072

C OCHMANN (2010)

CD147 (EMMPRIN) und dessen Ligand Cyclophilin A bestimmen das Ausmaß des myokardialen Schadens nach Ischämie/Reperfusion im Mausmodell.

Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät

AT ONG, PW SERRUYS (2005)

Drug-Eluting Stents Current Issue.

Tex Heart Inst J; 32 (3): 372-377

RR PAULY, A PASSANITI, C BILATO, R MONTICONE, L CHENG, N PAPADOPOULOS, YA GLUZBAND, L SMITH, C WEINSTEIN, EG LAKATTA (1994)

Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation.

Circ Res; 75(1): 41-54

J PHILLIPS-HUGHES, K KANDARPA (1996)

Restenosis: Pathophysiology and Preventive Strategies.

J Vasc Interv Radiol; 7(3): 321-333

NJ PHILP, JD OCHRIETOR, C RUDOY, T MURAMATSU, PJ LINSER (2003)
Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5a11/basigin-null mouse.
Invest Ophthalmol Vis Sci; 44(3):1305-1311

JA PIEDRAHITA, SH ZHANG, JR HAGAMAN, PM OLIVER, N MAEDA (1992)
Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells.
Proc Natl Acad Sci USA; 89(10): 4471-4475

AS PLUMP, JD SMITH, T HAYEK, K AALTO-SETÄLÄ, A WALSH, JG VERSTUYFT, EM RUBIN, JL BRESLOW (1992)
Severe Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice Created by Homologous Recombination in ES Cells.
Cell; 71(2): 343-353

PSCHYREMBEL

De Gruyter Klinisches Wörterbuch; 259. Auflage: S. 78, 1584

T PUSHKARSKY, V YURCHENKO, C VANPOUILLE, B BRICHACEK, I VAISMAN, S HATAKEYAMA, KL NAKAYAMA, B SHERRY, MI BUKRINSKY (2005)
Cell Surface Expression of CD147/EMMPRIN Is Regulated by Cyclophilin 60.
J Biol Chem; 280(30):27866-27871

S RAJAGOPALAN, XP MENG, S RAMASAMY, DG HARRISON, ZS GALIS (1996)
Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro.
J Clin Invest; 98(11): 2572-2579

TB RAJAVASHISTH, XP XU, S JOVINGE, S MEISEL, XO XU, NN CHAI, MC FISHBEIN, S KAUL, B CERCEK, B SHARIFI, PK SHAH (1999)
Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators.
Circulation; 99(24): 3103-3109

CA READON, GS GETZ (2001)
Mouse models of atherosclerosis.
Curr Opin Lipidol; 12(2): 167-173

RL REDDICK, SH ZHANG, N MAEDA (1994)
Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesion development and progression.
Arterioscler Thromb; 14(1): 141-147

BH REED, R WILK, F SCHÖCK, HD LIPSHITZ (2004)
Integrin-Dependent Apposition of Drosophila Extraembryonic Membranes Promotes Morphogenesis and Prevents Anoikis.
Curr Biol; 14(5): 372-380

H REHMAN, VK RAMSHESH, TP THERUVATH, I KIM, RT CURRIN, S GIRI, JJ LEMASTER, Z ZHONG (2008)

NIM811 (N-Methyl-4-isooleucine Cyclosporine), a Mitochondrial Permeability Transition Inhibitor, Attenuates Cholestatic Liver Injury but Not Fibrosis in Mice.
J Pharmacol Exp Ther; 327(3): 699-706

M ROQUE, JT FALLON, JJ BADIMON, WX ZHANG, MB TAUBMAN, ED REIS (2000)
Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils.
Arterioscler Thromb Vasc Biol; 20(2): 335-342

ME ROSENFELD, S BUTLER, VA ORD, BA LIPTON, CA DYER, LK CURTISS, W PALINSKI, JL WITZTUM (1993)
Abundant expression of Apoprotein E by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions.
Arterioscler Thromb; 13(9): 1382-1389

ME ROSENFELD, P POLINSKY, R VIRMANI, K KAUSER, G RUBANYI, SM SCHWARTZ (2000)
Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the Apo E knock-out mouse.
Arterioscler Thromb Vasc Biol; 20(12): 2587-2592

B ROSENWIRTH, A BILLICH, R DATEMA, P DONATSCH, F HAMMERSCHMID, R HARRISON, P HIESTAND, H JAKSCHE, P MAYER, P PEICHL (1994)
Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replikation by SDZ NIM811, a Nonimmunosuppressive Cyclosporine Analog.
Antimicrob Agents Chemother; 38(8): 1763-1772

R ROSS AND J GLOMSET (1973)
Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell.
Science; 180(4093):1332-1339

R ROSS, TN WIGHT, E STRANDNESS, B THIELE (1984)
Human atherosclerosis. I. Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery.
Am J Pathol; 114(1):79-93

R ROSS (1993)
The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.
Nature; 362(6423): 801-809

R ROSS (1995)
Cell biology of atherosclerosis.
Annu Rev Physiol; 57:791-804

R ROSS (1999)
Atherosclerosis-an inflammatory disease.
N Engl J Med; 340(2):115-126

M ROUIS, C ADAMY, N DUVERGER, P LESNIK, P HORELLOU, M MOREAU, F EMMANUEL, JM CAILLAUD, PM LAPLAUD, C DACHET, MJ CHAPMAN (1999)
Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 reduces atherosclerotic lesions in apolipoproteinase E-deficient mice.
Circulation; 100(5):533-540

B RYFFEL, G WOERLY, B GREINER, B HAENDLER, MJ MIHATSCH, BM FOXWELL (1991)
Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissue.
Immunology; 72(3): 399-404

P SHASHKIN, B DRAGULEV, K LEY (2005)
Macrophage differentiation to foam cells.
Curr Pharm De;: 11(23): 3061-3072

FV SALOMON, H GEYER, U GILLE (2005)
Anatomie für die Tiermedizin.
Enke; S. 405-409

T SAMESHIMA, K NABESHIMA, BP TOOLE, YOKOGAMI, Y OKADA, T GOYA, M KOONO, S WAKISAKA (2000)
Glioma cell extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRN) (CD147) stimulates production of membrane-type matrix metalloproteinases and activated gelatinase A in co-cultures with brain-derived fibroblasts.
Cancer Lett; 157(2): 177-184

AC SAPHIRE, MD BOBARDT, PA GALLAY (1999)
Host cyclophilin A mediates HIV-1 attachment to target cells via heparins.
EMBO J; 18(23): 6771-6785

K SATOH, T MATOBA, J SUZUKI, MR O´DELL, P NIGRO, Z CUI, A MOHAN, S PAN, L LI, ZG JIN, C YAN, J ABE, BC BERK (2008)
Cyclophilin A Mediates Vascular Remodeling by Promoting Inflammation and Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation.
Circulation; 117(24): 3088-3098

K SATOH, P NIGRO, T MATOBA, MR O´DELL, Z CUI, X SHI, A MOHAN, C YAN, J ABE, KA ILLIG, BC BERK (2009)
Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms.
Nat Med; 15(6): 649-656

DK SAXENA, T OH-OKA, K KADOMATSU, T MURAMATSU, K TOSHIMORI (2002)
Behaviour of a sperm surface transmembrane glycoprotein basigin during epididymal maturation and its role in fertilization in mice.
Reproduction; 123(3): 435-444

M SCHACHTER (1997)
The pathogenesis of atherosclerosis.
Int J Cardiol; 62(2): 3-7

EJ SCHAEFER, RE GREGG, G GHISELLI, TM FORTE, JM ORDOVAS, LA ZECH, HB Jr BREWER (1986)

Familial Apolipoprotein E Deficiency.

J Clin Invest; 78(5): 1206-1219

RA SCHATZ, JC PALMAZ, FO TIO, F GARCIA, O GARCIA, SR REUTER (1987)

Balloon-expandable intracoronary stents in the adult dog.

Circulation; 76 (2): 450-457

R SCHMIDT, A BÜLTMANN, M UNGERER, N JOGHETAELI, O BÜLBÜL, S THIEME, T CHAVAKIS, BP TOOLE, M GAWAZ, A SCHÖMIG, AE MAY (2006)

Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer Regulates Matrix Metalloproteinase Activity in Cardiovascular Cells: Implications in Acute Myocardial Infarction.

Circulation; 113(6): 834-841

R SCHMIDT, A BÜLTMANN, S FISCHER, A GILLITZER, P CULLEN, A WALCH, P JOST, M UNGERER, ND TOLLEY, S LINDEMANN, M GAWAZ, A SCHÖMIG, AE MAY (2008)

Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor kappaB-dependent inflammation in monocytes.

Circ Res; 102(3): 302-309

U SCHÖNBECK, F MACH, GK SUKHOVA, E ATKINSON, E LEVESQUE, M HERMAN, P GRABBER, P BASSET, P LIBBY (1999)

Expression of stromelysin-3 in atherosclerotic lesions: regulation via CD40-CD40 ligand signaling in vitro and in vivo.

J Exp Med; 189(5): 843-853

VL SCHUSTER, R LU, N KANAI, Y BAO, S ROSENBERG, D PRIÉ, P RONCO, ML JENNINGS (1996)

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; 1311(1): 13-19

RS SCHWARTZ (1994)

Neointima and arterial injury: dogs, rats, pigs, and more.

Lab Invest; 71(6): 789-791

Y SEKO, T FUJIMURA, H TAKA, R MINEKI, K MURAYAMA, R NAGAI (2004)

Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes.

Res Commun; 317(1): 162-168

P SEIZER, O BORST, H LANGER, A BÜLTMANN, G MÜNCH, Y HEROUY, K STELLOS, B KRÄMER, B BIGALKE, B BÜCHELE, MG BACHMAN, D VESTWEBER, T SIMMET, M GAWAZ, AE MAY (2009)

EMMPRIN (CD147) is a novel receptor for platelet GPVI and mediates platelet rolling via GPVI-EMMPRIN interaction.

Thromb Haemost; 101(4): 682-686

P SEIZER, T SCHÖNBERGER, M SCHÖTT, MR LANG, HF LANGER, B BIGALKE, BF KRÄMER, O BORST, K DAUB, O HEIDENREICH, R SCHMIDT, S LINDEMANN, Y HEROUY, M GAWAZ, AE MAY (2010)

EMMPRIN and its ligand Cyclophilin A regulate MT1-MMP, MMP-9 and M-CSF during foam cell formation.

Atherosclerosis; 209(1): 51-57

P SEIZER, C OCHMANN, T SCHÖNBERGER, S ZACH, M ROSE, O BORST, K KLINGEL, R KANDOLF, HR MACDONALD, RA NOWAK, S ENGELHARDT, F LANG, M GAWAZ, AE MAY (2011)

Disruption the Emmprin (CD147)-Cyclophilin A interactionn reduces infarct size and preserves systolic function after myocardial ischemia and reperfusion.

Arterioscler Thromb Vasc Biol; 31(6): 1377-1386

P SEIZER, K KLINGEL, M SAUTER, D WESTERMANN, C OCHMANN, T SCHÖNBERGER, R SCHLEICHER, K STELLOS, EM SCHMIDT, O BORST, B BIGALKE, R KANDOLF, H LANGER, M GAWAZ, AE MAY (2012)

Cyclophilin A affects inflammation, virus elimination and myocardial fibrosis in coxsackievirus B3-induced myocarditis.

J Mol Cell Cardiol; 53(1): 6-14

P SEIZER, T GEISLER, B BIGALKE, M SCHNEIDER, K KLINGEL, R KANDOLF, K STELLOS, J SCHREIECK, M GAWAZ, AE MAY (2013)

EMMPRIN and ist ligand Cyclophilin A as novel diagnostic markers in inflammatory cardiomyopathy.

Int J Cardiol; 163(3): 299-304

PW SERRUYS, P DE JAEGERE, F KIEMENEIJ, C MACAYA, W RUTSCH, G HEYNDRIKX, H EMANUELSSON, J MARCO, V LEGRAD, P MATERNE (1994)

A comparisation of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease.

N Engl J Med; 331(8): 389-495

H SEULBERGER, CM UNGER, W RISAU (1992)

HT7, Neurothelin, Basigin, gp42 and OX-47- many names for one developmentally regulated immune-globulin-like surface glycoprotein on blood-brain barrier endothelium, epithelial tissue barriers and neurons.

Neurosci Lett; 140(1): 93-97

NA SHACKEL, PH MCGUINNESS, CA ABBOTT, MD GORRELL, GW MCCAUGHAN (2002)

Insight into the pathobiology of hepatitis c virus-associated cirrhosis: analysis of intrahepatic differential gene expression.

Am J Pathol; 160(2): 641-654

B SHERRY, N YARLETT, A STRUPP, A CERAMI (1992)

Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages.

Proc Natl Acad Sci USA; 89(8): 3511-3515

H SHIMANO, N YAMADA, M KATSUKI, M SHIMADA, T GOTODA, K HARADA, T MURASE, C FUKAZAWA, F TAKAKU, Y YAZAKI (1992)

Overexpression of apolipoprotein E in transgenic mice: Marked reduction in plasma lipoproteins except high density lipoprotein and resistance against diet-induced hypercholesterolemia.

Proc Natl Acad Sci USA; 89(5): 1750-1754

H SHIMANO, J OHSUGA, M SHIMADA, Y NAMBA, T GOTODA, K HARADA, M KATSUKI, Y YAZAKI, N YAMADA (1995)

Inhibition ad diet-induced atheroma formation in transgenic mice expression apolipoprotein e in the arterial wall.

J Clin Invest; 95(2): 469-476

J SILENCE, F LUPU, D COLLEN, HR LIJNEN (2001)

Persistence of atherosclerotic plaque but reduced aneurysm formation in mice with stromelysin-1 (MMP-3) gene inactivation.

Arteriosler Thromb Vasc Biol; 21(9): 1440-1445

J SILENCE, D COLLEN, HR LIJNEN (2002)

Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with interaction of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) Gene.

Circ Res; 90(8): 897-903

JP SLUIJTER, DP DE KLEIJN, G PASTERKAMP (2006)

Vascular remodeling and protease inhibition-bench to bedside.

Cardiovasc Res; 69(3): 595-603

BJGL DE SMET, D DE KLEIJN, R HANEMAAIJER, JH VERHEIJEN, L ROBERTUS, YJ VAN DER HELM, C BORST, MJ POST (2000)

Metalloproteinases inhibition reduces constrictive arterial remodeling after balloon angioplasty a study in the atherosclerotic yucatan micropig.

Circulation; 101(25): 2962-2967

JE SOUSA, MA COSTA, AG SOUSA, AC ABIZAID, AC SEIXAS, AS ABIZAID, F FERES, LA MATTOS, R FALOTICO, J JAEGER, JJ POPMA, PW SERRUYS (2003)

Two-Year Angiographic and Intravascular Ultrasound Follow-Up After Implantation of Sirolimus-Eluting Stents in Human Coronary Arteries.

Circulation; 107(3): 381-383

KM SOUTHGATE, M FISHER, AP BANNING, VJ THURSTON, AH BAKER, RP FABUNMI, PH GROVES, AC NEWBY (1996)
Upregulation of basement membrane-degrading metalloproteinase secretion after balloon injury of pig carotid arteries.
Circ Res; 79(6):1177-1187

KM SOUTHGATE, D MEHTA, MB IZZAT, AC NEWBY, GD ANGELINI (1999)
Increased secretion of basement membrane-degrading metalloproteinases in pig saphenous vein into carotid artery interposition grafts.
Arterioscler Thromb Vasc Biol; 19(7): 1640-1649

TH SPAET, MB STEMERMAN, FJ VEITH, I LEJNIEKS (1975)
Intimal injury and regrowth in the rabbit aorta. Medial smooth muscle cells as a source of neointima.
Circ Res; 36(1): 58-70

C SPAULDING, J DAEMEN, E BOERSMA, DE CUTLIP, PW SERRUYS (2007)
A Pooled Analysis of Data Comparing Sirolimus-Eluting Stents with Bare-Metal Stents.
N Engl J Med; 356(10): 989-997

G SPIK, B HAENDLER, O DELMAS, C MARILLER, M CHAMOUX, P MAES, A TARTAR, J MONTREUIL, K STEDMAN, HP KOCHER (1991)
A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP).
J Biol Chem; 266(17): 10735-10138

FG SPINALE, ML COKER, LJ HEUNG, BR BOND, HR GUNASINGHE, T ETOH, AT GOLDBERG, JL ZELLNER, AJ CRUMBLEY (2000)
A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure.
Circulation; 102(16): 1944-1949

GW STONE, SE ELLIS, DA COX, J HERMILLER, C O'SHAUGHNESSY, JT MANN, M TURCO, R CAPUTO, P BERGIN, J GREENBERG, JJ POPMA, ME RUSSELL (2004)
A Polymer-Based, Paclitaxel-Eluting Stent in Patients with Coronary Artery Disease.
N Engl J Med; 350(3):221-231

BH STRAUSS, RJ CHISHOLM, FW KEELEY, AI GOTLIEB, RA LOGAN, PW ARMSTRONG (1994)
Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty in a rabbit model.
Circ Res; 75(4): 650-658

A STEINKASSERER, R HARRISON, A BILLICH, F HAMMERSCHMID, G WERNER, B WOLFF, P PEICHL, G PALFI, W SCHNITZEL, E MLYNAR (1995)
Mode of action of SDZ NIM811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): interference with early and late events in HIV-1 replication.
J Virol; 69(2): 814-824

- GK SUKHOVA, U SCHÖNBECK, E RABKIN, FJ SCHOEN, AR POOLE, RC BILLINGHURST, P LIBBY (1999)**
Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenase-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques.
Circulation; 99(19): 2503-2509
- J SUN, ME HEMLER (2001)**
Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD 147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interaction.
Cancer Res; 61(5):2276-2281
- K TANAKA, M SATA, Y HIRATA, R NAGAI (2003)**
Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries.
Circ Res; 93(8): 783-790
- Y TANG, P KESAVAN, MT NAKADA, L YAN (2004)**
Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN.
Mol Cancer Res; 2(2): 73-80
- W TANG, ME HEMLER (2004)**
Caveolin-1 Regulates Matrix Metalloproteinases-1 Induction and CD147/EMMPRIN Cell Surface Clustering.
J Biol Chem; 279(12):11112-11118
- S TAKAHASHI, H KANEDA, S TANAKA, Y MIYASHITA, T SHIONO, Y TAKETANI, H DOMAE, J MATSUMI, S MIZUNO, Y MINAMI, K SUGITATSU, S SAITO (2007)**
Late Angiographic Stent Thrombosis After Sirolimus-Eluting Stent Implantation.
Circ J; 71(2): 226-228
- D TEDESCO, L Haragsim (2012)**
Cyclosporine: A Review.
J Transplant; 2012(230386): 1-7
- I TEGEDER, A SCHUMACHER, S JOHN, H GEIGER, G GEISLINGER, H BANG, K BRUNE (1997)**
Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis.
J Clin Immunol; 17(5): 380-386
- FE THORNGATE, LL RUDEL, RL WALZEM, DL WILLIAMS (2000)**
Low Levels of Extrahepatic Nonmacrophage ApoE Inhibit Atherosclerosis Without Correcting Hypercholesterolemia in ApoE-Deficient Mice.
Arterioscler Thromb Vasc Biol; 20(8): 1939-1945

T TOMITA, T NAKASE, M KANEKO, K SHI, K TAKAHI, T OCHI, H YOSHIKAWA (2002)

Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis.

Arthritis Rheum; 46(2): 373-378

K TSUKAMOTO, R TANGIRALA, SH CHUN, E PURÉ, DJ RADER (1999)

Rapid regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of ApoE in ApoE-deficient mice.

Arterioscler Thromb Vasc Biol; 19(9): 2162-2170

SC TYAGI, SE CAMPBELL, HK REDDY, E TIAHJA, DJ VOELKER (1996)

Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts.

Mol Cell Biochem; 155(1): 13-21

H UZUI, A HARPF, M LIU, TM DOHERTY, A SHUKLA, NN CHAI, PV TRIPATHI, S JOVINGE, DJ WILKIN, K ASOTRA, PK SHAH, TB RAJAVASHISTH (2002)

Increased Expression of Membrane Type 3-Matrix Metalloproteinase in Human Atherosclerotic Plaque-Role of Activated Makrophages and Inflammatory Cytokines.

Circulation; 106(24): 3024:3030

R VIRCHOW

Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin. Meidinger Sohn, Frankfurt-am-Main

rezitiert in

R Ross and JA Glomset (1973)

Atherosclerosis and the Arterial Smooth Muscle Cell.

Science; 180(4093):1332-1339

R VISSE, H NAGASE (2003)

Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structur, Function, and Biochemistry.

Circ Res; 92(8): 827-839

TH VU, Z WERB (2000)

Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology.

Genes Dev; 14(17): 2123-2133

CL WAINWRIGHT, AM MILLER, RM WADSWORTH (2001)

Inflammation as a key event in the development of neointima following vascular balloon injury.

Clin Exp Pharmacol Physiol; 28(11): 891-895

- AC VAN DER WAL, AE BECKER, CM VAN DER LOOS, PK DAS (1994)**
Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*; 89(1): 36-44
- X WANG, H CHAI, PH LIN, AB LUMSDEN, Q YAO, C CHEN (2006)**
Mouse models of neointimal hyperplasia: Techniques and applications. *Med Sci Monit* 12(9): RA177-185
- HE VAN WART, H BIRKEDAL-HANSEN (1990)**
The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87(14): 5578-5582
- EJ WASSERMANN, NM SHIPLEY (2006)**
Atherothrombosis in acute coronary syndromes: mechanisms, markers, and mediators of vulnerability. *Mt Sinai J Med*; 73(1):431-439
- WS WEBSTER, SP BISHOP, JC GEER (1974)**
Experimental aortic intimal thickening. I. Morphology and source of intimal cells. *Am J Pathol*; 76(2): 245-264
- J WEISS, K BECKER, E BERNSMANN, ET AL. (2008)**
Tierpflege in Forschung und Klinik.
3. Überarbeitete Auflage; Enke Verlag; S. 349
- J WESTERMARCK, VM KÄHÄRI (1999)**
Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*; 13(8): 781-792
- Q XU, MC LEIVA, SA FISCHKOFF, RE HANDSCHUMACHER, CR LITTLE (1992)**
Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J Biol Chem*; 267(17): 11968-11971
- XP XU, SR MEISEL, JM ONG, S KAUL, B CERCEK, TB RAJAVASHISTH, B SHARIFI, PK SHAH (1999)**
Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*; 99(8):993-998
- Q XU (2004)**
Review Mouse Models of Arteriosclerosis From Arterial Injuries to Vascular Grafts. *Am J Pathol*; 165(1): 1-10
- L YAN, S ZUCKER, BP TOOLE (2005)**
Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. *Thromb Haemost*; 93(2):199-204

- Y YANG, N LU, J ZHOU, ZN CHEN, P ZHU (2008)**
Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis.
Rheumatology (Oxford); 47(9): 1299-1310
- YW YOON, HM KWON, KC HWANG, EY CHOI, BK HONG, D KIM, SH CHO, KS SONG, G SANGIORGI (2005)**
Upstream regulation of matrix metalloproteinase by EMMPRIN; extracellular matrix metalloproteinase inducer in advanced atherosclerotic plaque.
Atherosclerosis; 180(1): 37-44
- S YOSHIDA, M SHIBATA, S YAMAMOTO, M HAGIHARA, NA ASAI, M TAKAHASHI, S MIZUTANI, T MURAMATSU, K KADOMATSU (2000)**
Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its N-terminal immunoglobulin domain.
Eur J Biochem; 267(14): 4372-4380
- V YURCHENKO, M O'CONNOR, WW DAI, H GUO, B TOOLE, B SHERRY, M BUKRINSKY (2001)**
CD147 Is a signaling receptor for Cyclophilin B.
Biochem Biophys Res Commun; 288(4): 786-788
- V YURCHENKO, G ZYBARTH, M O'CONNOR, WW DAI, G FRANCHIN, T HAO, H GUO, HC HUNG, B TOOLE, P GALLAY, B SHERRY, M BUKRINSKY (2002)**
Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activation via CD147.
J Biol Chem; 277(25): 22959-22965
- V YURCHENKO, S CONSTANT, M BUKRINSKY (2006)**
Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins.
Immunology; 117(3): 301-309
- K ZANDER, MP SHERMAN, U TESSMER, K BRUNS, V WRAY, AT PRECHTEL, E SCHUBERT, P HENKLEIN, J LUBAN, J NEIDLEMAN, WC GREENE, U SCHUBERT (2003)**
Cyclophilin A Interacts with HIV-1 Vpr and Is Required for Its Functional Expression.
J Biol Chem; 278(44): 43202-43213
- J ZANG, L NIE, M RAZAVIAN, M AHMED, LW DOBRUCKI, A ASADI, DS EDWARDS, M AZURE, AJ SINUSAS, MM SADEGHI (2008)**
Molecular imaging of activated matrix metalloproteinases in vascular remodeling.
Circulation; 118(19): 1953-1960
- VI ZANNIS, JL BRESLOW (1980)**
Characterization of a unique human Apolipoprotein A variant associated with type III hyperlipoproteinemia.
J Biol Chem; 255(5): 1759-1762
- N ZEMPO, RD KENAGY, YP AU, M BENDECK, MM CLOWES, MA REIDY, AW CLOWES (1994)**
Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery.
J Vasc Surg; 20(2): 209-217

- N ZEMPO, N KOYAMA, RD KENAGY, HJ LEA, AW CLOWES (1996)**
Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor.
Arterioscler Thromb Vasc Biol; 16(1): 28-33
- SH ZHANG, RL REDDICK, JA PIEDRAHITA, N MAEDA (1992)**
Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking Apolipoprotein E.
Science; 258(5081): 468-471
- SH ZHANG, RL REDDICK, B BURKEY, N MAEDA (1994)**
Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for Apolipoprotein E gene disruption.
J Clin Invest; 94(3): 937-945
- JF ZHANG, H GE, C WANG, TB GUO, Q HE, Q SHAO, Y FAN (2007)**
Inhibitory effect of PPAR on the expression of EMMPRIN in macrophages and foam cells.
Int J Cardiol; 117(3):373-380
- Z ZHONG, TP THERUVATH, RT CURRIN, PC WALDMEIER, JJ LEMASTERS (2007)**
NIM811, a Mitochondrial Permeability Transition Inhibitor, Prevents Mitochondrial Depolarization in Small-for-Size Rat Liver Graft.
Am J Transplant; 7(5):1103-1111
- S ZHOU, H ZHOU, PJ WALIAN, BK JAP (2005)**
CD147 is a regulatory subunit of the γ -secretase complex in Alzheimer's disease amyloid β -peptide production.
Proc Natl Acad Sci U S A; 102(21): 7499-7504
- P ZHU, J DING, J ZHOU, WJ DONG, CM FAN, ZN CHEN (2005)**
Expression of CD147 on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis: its potential role in monocyte accumulation and matrix metalloproteinase production.
Arthritis Res Ther; 7(5): 1023-1033
- Bundeszentrale politischer Bildung
www.bpb.de/wissen/6G93DG,0,0,Gesundheitsausgaben.html
- Statistisches Bundesamt in Wiesbaden
www.destatis.de

9. Tabellenverzeichnis

- Tab.1: Einteilung der MMPs (modifiziert nach C Busti et al. 2009)
- Tab.2: Übersicht über die Versuchsdurchführung
- Tab.3: Übersicht der Inhaltsstoffe des Tierfutters
- Tab.4: Auflistung der verwendeten Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper
- Tab.5: Übersicht über die Erfolgsrate bei der Drahtdenudation der A. carotis communis
- Tab.6: Einzelwerte der Fläche der Media nach Injektion von NIM811 bzw. der Lösungsmittelkontrolle in C57BL/6J-Mäusen
- Tab.7: Einzelwerte der Fläche der Neointima nach Injektion von NIM811 bzw. der Lösungsmittelkontrolle in C57BL/6J-Mäusen
- Tab.8: Einzelwerte des Stenosegrades in Prozent nach Injektion von NIM811 bzw. der Lösungsmittelkontrolle in C57BL/6J-Mäusen
- Tab.9: Einzelwerte der Fläche der Media nach Injektion des anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in C57BL/6J-Mäusen
- Tab.10: Einzelwerte der Fläche der Neointima nach Injektion des anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in C57BL/6J-Mäusen
- Tab.11: Einzelwerte der Stenose in Prozent nach Injektion des anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in C57BL/6J-Mäusen
- Tab.12: Einzelwerte der Fläche der Media nach Injektion des anti-CD147-AKs bzw. Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen
- Tab.13: Einzelwerte der Fläche der Neointima nach Injektion des anti-CD147-AKs bzw. Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen
- Tab.14: Einzelwerte der Stenose in Prozent nach Injektion des anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen
- Tab.15: Einzelwerte der Zellzahl/mm² von MAC3-positiven Zellen in der Media nach Injektion von anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen
- Tab.16: Einzelwerte der Zellzahl/mm² von MAC3-positiven Zellen in der Neointima nach Injektion von anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen

9. Tabellenverzeichnis

- Tab.17: Einzelwerte der Plaqueflächen in Prozent im Aortenbogen nach Applikation des anti-CD147-AKs bzw. des Isotyps in ApoE^{-/-}-Mäusen
- Tab.18: Einzelwerte der Plaqueflächen in Prozent von der Aortenklappe nach Applikation des anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen
- Tab.19: Einzelwerte der Plaqueflächen in Prozent von der Aortenwurzel nach Applikation des anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen
- Tab.20: Einzelwerte der Plaqueflächen in μm^2 der Aortenklappe nach Applikation des anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen
- Tab.21: Einzelwerte der Plaqueflächen in μm^2 von der Aortenwurzel nach Applikation des anti-CD147-AKs bzw. der Isotyp-Kontrolle in ApoE^{-/-}-Mäusen

10. Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: Folgen der Atherosklerose. (modifiziert nach P Libby 2000)
- Abb.2: Schematische Darstellung der „*response to injury*“-Hypothese. (modifiziert nach R Ross et al. 1993)
- Abb.3: Gefäßsystem der ApoE^{-/-}-Maus. (aus Y Nakashima et al. 1994)
- Abb.4: Alter der ApoE^{-/-}-Mäuse in Wochen beim Auftreten der Läsionen im Vergleich zwischen Western-Typ-Diät und Chow-Diät. (modifiziert nach Y Nakashima et al. 1994)
- Abb.5: Schematischer Aufbau der humanen Matrixmetalloproteinasen. (modifiziert nach J Westermarck et al. 1999)
- Abb.6: Schematische Darstellung der Regulation der MMP-Aktivität. (modifiziert nach JPG Sluijter et al. 2006)
- Abb.7: Aufbau einer typischen atherosklerotischen Plaque. (modifiziert nach P Libby et al. 1997)
- Abb.8: Plaqueruptur. (modifiziert nach MJ Hobeika et al. 2007)
- Abb.9: Lumenverkleinerung nach Angioplastie. (modifiziert nach MJ Hobeika et al. 2007)
- Abb.10: Schematische Darstellung der Phasen der Stenosierung. (modifiziert nach G Bauriedel et al. 1994)
- Abb.11: Aufbau von CD147. (modifiziert nach Muramatsu aus EE Gabison et al. 2005)
- Abb.12: Interaktion zwischen Cyclophilin und CD147. (aus V Yurchenko et al. 2006)
- Abb.13: Struktur von NIM811 und Cyclosporin. (modifiziert nach S Ma et al. 2006)
- Abb.14: Übersicht anatomischer Strukturen des Halssitus.
- Abb.15: Schematische Darstellung der Operationsmethode.
- Abb.16: (A) Instrumente für die Drahtdenudation; (B) Stereomikroskop mit fixierter Maus; (C) Angioplastieführungsdraht; (D) Position der Maus während der OP
- Abb.17: Drahtdenudation der A. carotis communis bei einer Maus.
- Abb.18: A. carotis communis einer C57BL/6J-Maus drei Wochen nach durchgeführter Drahtdenudation; EvG gefärbt
- Abb.19: Schematische Darstellung der Auswertung der murinen Karotiden. (LEE=Lamina elastica externa, LEI=Lamina elastica interna)

- Abb.20: Aortenbogen *en face* einer ApoE^{-/-}-Maus mit markierten Plaques.
- Abb.21: Schematische Darstellung der indirekten Immunhistochemie.
(modifiziert nach T Boenisch et al. 2003)
- Abb.22: **Bei C57BL/6J-Mäusen wird die Neointimabildung durch die Applikation des CyPA-Inhibitors NIM811 nicht beeinflusst.**
Bei C57BL/6J-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit NIM811 (30mg/kg KG i.p.) oder mit der Lösungsmittelkontrolle therapiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Schnitte von HE- und EvG-Färbungen drei Wochen nach der Verletzung. (N=7)
- Abb.23: **Bei C57BL/6J-Mäusen wird die Fläche der Media durch die Applikation von NIM811 nicht signifikant beeinflusst.**
Bei C57BL/6J-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit NIM811 (30mg/kg KG i.p.) oder mit der Lösungsmittelkontrolle therapiert. Die Abbildung zeigt die Fläche der Media drei Wochen nach der Verletzung. (N=7; n.s. nicht signifikant)
- Abb.24: **Bei C57BL/6J-Mäusen wird die Fläche der Neointima durch die Applikation von NIM811 nicht signifikant beeinflusst.**
Bei C57BL/6J-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit NIM811 (30mg/kg KG i.p.) oder mit der Lösungsmittelkontrolle therapiert. Die Abbildung zeigt die Fläche der Neointima drei Wochen nach der Verletzung. (N=7; n.s. nicht signifikant)
- Abb.25: **Bei C57BL/6J-Mäusen wird der Stenosegrad durch die Applikation von NIM811 nicht signifikant beeinflusst.**
Bei C57BL/6J-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit NIM811 (30mg/kg KG i.p.) oder mit der Lösungsmittelkontrolle therapiert. Die Abbildung zeigt den Stenosegrad drei Wochen nach der Verletzung. (N=7; n.s. nicht signifikant)
- Abb.26: **Bei C57BL/6J-Mäusen wird die Neointimabildung durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht beeinflusst.**
Bei C57BL/6J-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Schnitte von HE- und EvG-Färbungen drei Wochen nach der Verletzung. (N=7)

- Abb.27: **Bei C57BL/6J-Mäusen wird die Fläche der Media durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.** Bei C57BL/6J-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit einem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Fläche der Media drei Wochen nach der Verletzung. (N=7; n.s. nicht signifikant)
- Abb.28: **Bei C57BL/6J-Mäusen wird die Fläche der Neointima durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.** Bei C57BL/6J-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Fläche der Neointima drei Wochen nach der Verletzung. (N=7; n.s. nicht signifikant)
- Abb.29: **Bei C57BL/6J-Mäusen wird der Stenosegrad durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.** Bei C57BL/6J-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt den Stenosegrad drei Wochen nach der Verletzung. (N=7; n.s. nicht signifikant)
- Abb.30: **Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Neointimabildung durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht beeinflusst.** Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Schnitte von HE- und EvG-Färbungen vier Wochen nach der Verletzung. (N=9)
- Abb.31: **Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Fläche der Media durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.** Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Fläche der Media vier Wochen nach der Verletzung. (N=9; n.s. signifikant)

- Abb.32: **Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Fläche der Neointima durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.**
Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Fläche der Neointima vier Wochen nach der Verletzung. (N=9; n.s. nicht signifikant)
- Abb.33: **Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird der Stenosegrad durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.**
Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt den Stenosegrad vier Wochen nach der Verletzung. (N=9; n.s. nicht signifikant)
- Abb.34: **Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Anzahl der MAC3-positiven Zellen in der Media und Neointima durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht beeinflusst.**
Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Schnitte von einer Immunhistochemie gegen MAC3-positive Zellen vier Wochen nach der Verletzung. (N=4)
- Abb.35: **Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Anzahl der MAC3-positiven Zellen in der Media durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.**
Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Anzahl MAC3-positiver Zellen in der Media vier Wochen nach der Verletzung. (N=4; n.s. nicht signifikant)
- Abb.36: **Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Anzahl der MAC3-positiven Zellen in der Neointima durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.**
Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Anzahl MAC3-positiver Zellen in der Neointima vier Wochen nach der Verletzung. (N=4; n.s. nicht signifikant)

- Abb.37: **Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird Die Anzahl der MAC3-positiven Zellen in der Media und Neointima durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.**
Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wurde die Intima der rechten A. carotis communis durch Drahtdenudation verletzt. Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Anzahl MAC3-positiver Zellen in der Media und Neointima vier Wochen nach der Verletzung. (N=4; n.s. nicht signifikant)
- Abb.38: **Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Plauefläche im Aortenbogen durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht beeinflusst.**
Die Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Aortenbögen nach Ölrot-Färbung *en face* einer gesunden C57BL/6J-Maus ohne Plaques und von ApoE^{-/-}-Mäusen vier Wochen nach der Denudation der A. carotis communis. (N=7)
- Abb.39: **Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Plauefläche im Aortenbogen durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.**
Die ApoE^{-/-}-Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Plauefläche im Aortenbogen vier Wochen nach der nach der Denudation der A. carotis communis. (N=7; n.s. nicht signifikant)
- Abb.40: **Die Abbildung zeigt repräsentative Schnitte der Gefrierschnitte von der Aortenwurzel und der Aortenklappe einer unbehandelten C57BL/6J-Maus.**
- Abb.41: **Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Plauefläche in der Aortenwurzel durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht beeinflusst.**
Die ApoE^{-/-}-Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Gefrierschnitte der Plaques in der Aortenwurzel in Ölrot-Färbungen vier Wochen nach der Denudation der A. carotis communis. (N=6)
- Abb.42: **Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Plauefläche an der Aortenklappe durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht beeinflusst.**
Die Mäuse ApoE^{-/-}-Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Gefrierschnitte der Plaques an der Aortenklappe in Ölrot-Färbungen vier Wochen nach der Denudation der A. carotis communis. (N=6)

- Abb.43: **Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Plaquefläche an der Aortenklappe und der Aortenwurzel durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.**
Die ApoE^{-/-}-Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Plaquefläche an der Aortenklappe und der Aortenwurzel vier Wochen nach der Denudation der A. carotis communis. (N=6; n.s. nicht signifikant)
- Abb.44: **Bei ApoE^{-/-}-Mäusen wird die Plaquefläche an der Aortenklappe und der Aortenwurzel durch die antikörperbasierte Blockade von CD147 nicht signifikant beeinflusst.**
Die Mäuse ApoE^{-/-}-Mäuse wurden entweder mit dem anti-CD147-AK RL73.2 (1µg/g KG i.p.) oder mit dem Kontroll-AK therapiert. Die Abbildung zeigt die Plaquefläche an der Aortenklappe und der Aortenwurzel in % zur Gesamtfläche vier Wochen nach der Denudation der A. carotis communis. (N=6; n.s. nicht signifikant)

11. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ApoE	Apolipoprotein E
AK	Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	albumin bovine serum
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD147	Bezeichnung für EMMPRIN
CD147 ^{-/-}	Basigin-knockout-Maus
C57BL/6J	Wildtyp-Labormaus (WT-Maus)
CyPA	Cyclophilin A
EvG	Elastica Van Gieson
ECM	extrazelluläre Matrix
EMMPRIN	extracellular matrix metalloproteinase inducer
EGF	epidermal growth factor
et al.	et altera
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Gp42	CD147 der Maus
ggf.	Gegebenenfalls
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HDL	high density lipoprotein
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
HT7	CD147 beim Huhn
hgr.	hochgradig
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin

11. Abkürzungsverzeichnis

IGF-1	insulin-like growth factor
i.p.	intraperitoneal
IL-1	Interleukin-1
IDL	intermediate density lipoprotein
KG	Körpergewicht
KO-Maus	Knockout-Maus
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
L	Liter
LDL	low density lipoprotein
min.	Minute
M.	Musculus
Mio.	Million
M6	CD147 beim Menschen
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MCT	Monocarboxylat-Transporter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MT-MMP	membrangebundene Matrix Metalloproteinase
MW	arithmetischer Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
N	Anzahl der Versuchstiere
NO	Stickstoffmonoxid
NIM811	N-methyl-4-isoleucine-cyclosporin
OP	Operation
Ox	Oxidation
OX47	CD147 der Ratte
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAK	Primärantikörper
PBS	phosphat bufferd saline

11. Abkürzungsverzeichnis

PDGF	platelet derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PMN	polymorphkernige Neutrophile
pH	pH-Wert; negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
RA	rheumatoid arthritis
ROS	reactive oxygen species
rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
s. Abb.	siehe Abbildung
s. Tab.	siehe Tabelle
SEK	Sekundärantikörper
SEM	standard error of mean
SMC	smooth muscle cells
sec.	Sekunde
s.c.	subkutan
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
TCSF	tumor cell-derived collagenase stimulatory factor
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TGF- β	transforming growth factor β
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VLDL	very low density lipoprotein
VSMC	vascular smooth muscle cells
WHO	world health organization
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

12. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. med. Dr. med. habil. F. Sinowatz für die Übernahme der Dissertation bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. med. M. Gawaz, dem Direktor des Institutes für Kardiologie und Kreislauferkrankungen des UKT Tübingen, für die Bereitstellung der Materialien und Gerätschaften. Des weiteren bedanke ich mich für die anregenden Diskussionen und Ideen.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Prof. Dr. med. A.E. May für die Vergabe des Themas, für die wissenschaftliche Beratung und die abschließende engagierte Durchsicht der Dissertation.

Bei Dr. med. P. Seizer möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. vet. T. Schönberger für die große Geduld bei der Einführung in die Operationstechnik und ihrer großen Ausdauer bei der Überarbeitung der Dissertation. Sie hatte stets ein offenes und freundliches Ohr für Fragen und auftretende Probleme.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Labors für das freundliche Arbeitsklima und für die Unterstützung bei der Arbeit bedanken.

An dieser Stelle möchte ich auch den Tierpflegern für die gute Betreuung der Versuchstiere danken. Des Weiterem möchte ich auch an die vielen Versuchstiere denken, die für meine Arbeit ihr Leben gaben.

Herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden. Mein besonderer Dank gilt dabei Gesine Sondermann, Ulrike Stein, Ralf Strophal, Ulrich Sondermann und Familie Mowinski für die Motivation und die große Mühe beim Korrekturlesen. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.