

**Zur Rolle von Cyclophilin B in der Pathogenese der Atherosklerose:
Eine experimentelle Untersuchung zu seiner Expression in murinen
atherosklerotischen Plaques, zu seiner Wirkung auf das
Migrationsverhalten von Monozyten und deren Matrix
Metalloproteinasen-Aktivität, auf das Adhäsionsverhalten von
Thrombozyten sowie auf das Migrationsverhalten von Leukozyten**

von Carolin Christine Sommer-Kralj

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

**Zur Rolle von Cyclophilin B in der Pathogenese der Atherosklerose:
Eine experimentelle Untersuchung zu seiner Expression in murinen
atherosklerotischen Plaques, zu seiner Wirkung auf das
Migrationsverhalten von Monozyten und deren Matrix
Metalloproteinasen-Aktivität, auf das Adhäsionsverhalten von
Thrombozyten sowie auf das Migrationsverhalten von Leukozyten**

von Carolin Christine Sommer-Kralj
aus Heilbronn-Neckargartach

München 2016

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

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. vet. Manfred Stangassinger

Angefertigt an der III. Medizinischen Klinik für Kardiologie
und Kreislauferkrankungen,
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Mentor: PD Dr. Peter Seizer

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Manfred Stangassinger

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Kaspar Matiasek

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

gewidmet
meinem Mann Tomi,
meinen Kindern Adrian und Mayla
und meinen Eltern

Ein beidarmig zu umfassender Baum
wächst aus des Sprösslings feinstem Flaum,
ein Turm, der einmal neunstöckig werde,
erhebt sich aus einem Häufchen Erde.

Eine Reise, tausend Meilen lang,
mit einem ersten Schritt fing sie an!

~ Laotse ~

INHALTSVERZEICHNIS

I	Einleitung.....	1
II	Schrifttum.....	3
1	Atherosklerose.....	3
1.1	Definition und histologische Klassifikation der Atherosklerose.....	3
1.2	Die Pathogenese der Atherosklerose.....	6
1.2.1	Endotheliale Dysfunktion.....	6
1.2.2	Die frühe atherosklerotische Läsion.....	7
1.2.3	Progression der atherosklerotischen Plaque - <i>intermediate lesion</i> und <i>fibrous plaque</i>	9
1.2.4	Komplexe Läsion und Thrombusbildung.....	11
1.3	Atherosklerose im Tierreich.....	15
1.4	Die Rolle von Monozyten und Makrophagen in der Atherosklerose...	17
1.5	Thrombozyten.....	19
1.5.1	Hämostase: Die physiologische Funktion von Thrombozyten.....	19
1.5.2	Zur Rolle der Thrombozyten in der Atherosklerose.....	19
1.5.3	Zur Rolle der Thrombozyten in der Atherothrombose.....	21
1.5.4	Interaktionen von Thrombozyten mit dysfunktionellem Endothel.....	22
1.5.5	Interaktionen von Thrombozyten mit Leukozyten.....	23
2	Matrix Metalloproteinasen (MMPs).....	25
2.1	Struktur der MMPs.....	25
2.2	Einteilung der MMPs.....	26
2.3	Regulation der MMP-Aktivität.....	28
2.4	MMPs in der Atherosklerose.....	28
3	Der <i>Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer</i> (CD147, EMMPRIN).....	31
4	Cyclophiline.....	32
4.1	Struktur und Vorkommen der Cyclophiline.....	33
4.2	Cyclophiline und Cyclosporin A.....	34
4.3	Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase-Aktivität der Cyclophiline.....	35
4.4	Weitere Funktionen der Cyclophiline.....	36
4.5	Biologische Effekte von Cyclophilin B.....	36
4.6	Cyclophilin B und CD147 (EMMPRIN).....	38
4.7	Die Rolle von Cyclophilin A und B in der Atherosklerose.....	39

INHALTSVERZEICHNIS

5 Cyclosporin A (CsA) bei entzündlichen Erkrankungen.....	41
5.1 Das nicht immunsuppressive Cyclosporin A-Derivat NIM 811 (N-methyl-4-isoleucin-Cyclosporin, (Me-Ile ⁴)-Cyclosporin).....	42
5.2 Das rein extrazelluläre wirkende Cyclosporin A-Derivat MM284 ([(4R)-4-[(6-carboxy-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-methyl]-4-methyl-l-threonine](1)-CsA).....	43
III Eigene Untersuchungen.....	45
1 Zielsetzung.....	45
2 Material und Methoden.....	47
2.1 Material.....	47
2.1.1 Geräte.....	47
2.1.1.1 Allgemein benötigte Geräte für die <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Versuche.....	47
2.1.1.2 Verwendete Geräte für die mikroskopische Auswertung der immunhistologischen Färbungen und der Immunfluoreszenzfärbungen.....	48
2.1.1.3 Verwendete Geräte für die durchflusszytometrischen Untersuchungen an Thrombozyten sowie für die Thioglykolat-induzierte Peritonitis.....	48
2.1.1.4 Verwendete Geräte für die SDS-Gelatine-Zymographie.....	48
2.1.1.5 Verwendete Geräte für den Chemotaxis-Assay.....	48
2.1.1.6 Verwendete Geräte für die Flusskammerversuche.....	49
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	49
2.1.3 Lösungen, Medien, Reagenzien.....	51
2.1.4 Rezepte für Puffer, Kulturmedien und Färbelösungen.....	53
2.1.5 Proteine.....	55
2.1.6 Antikörper.....	55
2.1.7 Zellen und Zelllinien.....	56
2.1.8 Mäusestämme.....	56
2.1.9 Narkose und Schmerztherapie.....	56

2.2 Methoden.....	57
2.2.1 Allgemeines zur Zellkultur.....	57
2.2.2 Isolationsprotokolle und Zellkulturprotokolle für die in den Versuchen verwendeten Zellen.....	57
2.2.2.1 Thrombozytenisolation.....	57
2.2.2.2 Monozytenisolation.....	58
2.2.2.3 Differenzierung zu Makrophagen.....	59
2.2.2.4 Differenzierung zu Schaumzellen.....	59
2.2.2.5 Kultivierung von <i>human umbilical vein endothelial cells</i> (HUVECs).....	60
2.2.3 Nachweismethoden für Cyclophilin B.....	61
2.2.3.1 Immunhistochemische Vorgehensweise.....	61
2.2.3.2 Zum Nachweis von Cyclophilin B in atherosklerotischen Plaques von ApoE- <i>knockout</i> -Mäusen mittels indirekter Immunhistochemie.....	61
2.2.3.3 Zum Nachweis von Cyclophilin B in und auf Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung.....	64
2.2.3.4 Zum Nachweis von Cyclophilin B auf der Oberfläche von Thrombozyten mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie.....	67
2.2.4 Wirkung von Cyclophilin B auf Monozyten.....	69
2.2.4.1 Zum Nachweis der veränderten enzymatischen Aktivität von Matrix Metalloproteinasen mittels SDS-PAGE (<i>Sodium-dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)-Gelatine-Zymographie.....	69
2.2.4.2 Zum Nachweis der Migrationswirkung von Cyclophilin B mittels Chemotaxis-Assay.....	70
2.2.5 Wirkung von Cyclophilin B auf Thrombozyten.....	73
2.2.5.1 Zum Nachweis der Interaktionen von Thrombozyten mit Gefäßwandkomponenten mittels Flusskammerversuch.....	73
2.2.5.1.1 Aufbau der Flusskammer.....	73
2.2.5.1.2 Beschichtung der Deckgläschen.....	75
2.2.5.1.3 Durchführung des Flusskammerversuchs mit kollagen- bzw. endothelzellbeschichteten Deckgläschen.....	76
2.2.5.1.4 Durchführung des Flusskammerversuchs mit proteinbeschichteten Deckgläschen.....	77

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.6 In vivo-Versuch.....	78
2.2.6.1 Versuchstiere, Haltungsbedingungen, Tierversuchsantrag.....	78
2.2.6.2 Zum Nachweis der Cyclophilin B-Wirkung auf die Migration von inflammatorischen Zellen mittels einer Peritonitis-Induktion bei Wildtypmäusen (C57BL/6J).....	78
2.2.6.2.1 Prinzip des Versuchs.....	78
2.2.6.2.2 Versuchsdurchführung.....	79
2.2.6.2.3 Auswertung.....	80
2.2.7 statistische Berechnungen.....	80
 IV Ergebnisse.....	 81
1 Zur Cyclophilin B- Expression in murinen atherosklerotischen Plaques.	81
2 Expression von Cyclophilin B in Monozyten.....	83
3 Expression von Cyclophilin B in Makrophagen.....	86
4 Expression von Cyclophilin B in Schaumzellen.....	89
5 Cyclophilin B wird auf der Zelloberfläche von thrombinstimulierten Thrombozyten verstärkt exprimiert.....	92
6 Einfluss von Cyclophilin B auf das Migrationsverhalten und die Matrix Metalloproteinasen-Aktivität von Monozyten <i>in vitro</i>.....	93
6.1 Cyclophilin B induziert eine gesteigerte Sekretion von MMP-9 durch Monozyten.....	93
6.2 Zur chemotaktischen Wirkung von Cyclophilin B auf Monozyten <i>in vitro</i>	95
6.2.1 Einfluss von Cyclophilin B sowie der Cyclosporin A-Derivate NIM811 und MM284 in Kombination mit Cyclophilin B auf die Migration von Monozyten.....	95
6.2.2 Einfluss verschiedener Konzentrationen von Cyclophilin B auf die Migration von Monozyten.....	97
7 Einfluss von Cyclophilin B auf das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten <i>in vitro</i>.....	98
7.1 ADP-stimulierte Thrombozyten binden verstärkt an immobilisiertes Cyclophilin A und Cyclophilin B.....	98
7.2 Die durch Cyclophilin B gesteigerte Adhäsion von Thrombozyten auf Kollagen wird durch die Cyclosporin A-Derivate NIM811 und MM284 reduziert.....	101

INHALTSVERZEICHNIS

7.3 Die durch Cyclophilin B gesteigerte Adhäsivität von Thrombozyten auf aktivierten humanen Endothelzellen wird durch die Cyclosporin A -Derivate NIM811 und MM284 reduziert.....	104
8 Einfluss von Cyclophilin B auf das Migrationsverhalten von Leukozyten <i>in vivo</i> mittels Thioglykolat-induzierter Peritonitis.....	107
V Diskussion.....	110
1 Diskussion der Versuchsmethoden.....	110
1.1 Diskussion der <i>in vitro</i> -Methoden.....	110
1.1.1 Immunhistologie	110
1.1.2 Immunfluoreszenzfärbung.....	111
1.1.3 Durchflusszytometrie.....	112
1.1.4 Zymographie.....	113
1.1.5 Chemotaxis-Assay.....	114
1.1.6 Flusskammer.....	115
1.2 Diskussion der <i>in vivo</i> -Methoden.....	117
1.2.1 Tiermodelle in der Atheroskleroseforschung und Gründe für die Wahl der Maus als Versuchstier.....	117
1.2.2 Peritonitis-Modell.....	120
2 Diskussion der Ergebnisse.....	123
2.1 Pathophysiologische Relevanz der Cyclophilin B-Expression in der atherosklerotischen Plaque, auf Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen sowie auf aktivierten Thrombozyten.....	127
2.2 Bedeutung von Cyclophilin B für die proteolytische Aktivität in der atherosklerotischen Plaque.....	129
2.3 Einfluss von Cyclophilin B auf das Migrationsverhalten von Monozyten <i>in vitro</i>	132
2.4 Einfluss von Cyclophilin B auf das Migrationsverhalten von Leukozyten <i>in vivo</i>	134
2.5 Aktivierte Thrombozyten weisen eine gesteigerte Adhärenz auf immobilisiertem CyPA und CyPB auf.....	136
2.6 Die Wirkung der nicht immunsuppressiven Cyclophilin-Inhibitoren NIM811 und MM284 auf das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	138
2.7 Verknüpfung der hier gewonnenen Erkenntnisse mit den bisher bekannten Abläufen bei der Atherosklerose.....	142

INHALTSVERZEICHNIS

3	Schlussfolgerung.....	153
VI	Zusammenfassung.....	155
VII	Summary.....	157
VIII	Literaturverzeichnis.....	159
IX	Appendix.....	194
1	Abkürzungsverzeichnis.....	194
2	Abbildungsverzeichnis.....	200
3	Tabellenverzeichnis.....	204
X	Danksagung.....	205

1 Einleitung

Herz-Kreislauferkrankungen sind seit vielen Jahren die häufigste Krankheits- und Todesursache des Menschen in der westlichen Welt und gewinnen auch in den Entwicklungsländern zunehmend an Bedeutung.¹ Im Jahr 2012 starben laut Angaben der *World Health Organization* (WHO) weltweit rund 17,5 Millionen Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen, das entspricht etwa 30% aller Todesfälle.² In Deutschland waren es gemäß statistischem Bundesamt im Jahr 2013 mit 354.493 Toten sogar fast 40% der Todesfälle.³ Der Großteil dieser Todesfälle ist auf atherosklerotische Gefäßveränderungen und den daraus resultierenden Erkrankungen zurückzuführen.^{4,5}

Im Tierreich spielt die Atherosklerose nur eine untergeordnete Rolle. Sie kommt lediglich beim Vogel regelmäßig vor. Bei Säugetieren ist sie deutlich seltener. Sie findet sich bisweilen bei alternden Schweinen sowie bei Hunden, die infolge einer Hypothyreose eine Hypercholesterinämie entwickeln, und führt nur selten zu klinischen Manifestationen.^{6,7,8}

Die Atherosklerose ist eine komplexe, multifaktorielle, progressive Erkrankung der mittleren und großen Arterien, mit protrahiertem Verlauf, die mit Veränderungen der Intima einhergeht.^{4,9} Grundlage für das Entstehen und Fortschreiten der atherosklerotischen Veränderungen stellen chronische Entzündungsvorgänge dar.¹⁰ Hierbei wirken verschiedene Entzündungszellen und -mediatoren zusammen, die sich wechselseitig beeinflussen.

Insbesondere Monozyten sowie die daraus entstehenden Makrophagen und Schaumzellen, stellen wichtige Entzündungszellen im Rahmen der Entstehung atherosklerotischer Veränderungen dar.^{11,12} Daneben fungieren auch Thrombozyten als Entzündungszellen. Dieser Funktion wird eine immer bedeutender werdende Rolle zugesprochen.^{13,14,15}

Zur Entstehung der Atherosklerose beim Menschen tragen zahlreiche genetische und umweltbedingte Risikofaktoren bei.⁴ Zu den prädisponierenden genetischen Faktoren zählt beispielsweise das männliche Geschlecht, Hypertonie, Hypercholesterinämie, erhöhte Homocystein-Serumkonzentrationen, Diabetes mellitus, Adipositas und das metabolische Syndrom. Zu den Umweltfaktoren zählen unter anderem eine fettreiche Diät, Nikotinabusus, ein schlechter körperlicher Trainingszustand und Infektionen mit Erregern wie *Chlamydia pneumoniae* oder Herpesviren.^{4,9,16}

An Prädilektionsstellen bildet sich eine sogenannte atherosklerotische Plaque. Sie besteht aus Zellen, in erster Linie aus Entzündungszellen, des Weiteren aus Endothelzellen und glatten Muskelzellen, Bindegewebelementen, Lipiden und Zelldebris und ist in einem späteren Stadium bedeckt von einer fibrösen, kollagenreichen Kappe, deren Matrix von den glatten Muskelzellen sezerniert wird.¹⁷

Die größte Gefahr, die von einer atherosklerotischen Veränderung ausgeht, liegt in ihrem thrombogenen Potential.¹⁰ Meist, das heißt in etwa 60-70% der Fälle, ist es die Ruptur der fibrösen Kappe einer Plaque, die verantwortlich für die Entstehung einer Thrombose ist.^{18,19,20,21,22} Eine entscheidende Rolle hierfür spielen Matrix Metalloproteinasen (MMPs).^{23,24} Dabei handelt es sich um Enzyme, die in erster Linie von Entzündungszellen sezerniert werden und das Kollagen in der fibrösen Kappe proteolytisch spalten können.²⁵ Dadurch kann die Kappe destabilisiert werden.^{25,26}

I EINLEITUNG

Bei einer Ruptur der fibrösen Kappe kommt das hochthrombogene Material der Plaque in Kontakt mit Blutbestandteilen, was eine mehr oder weniger ausgedehnte Thrombose mit entsprechenden klinischen Symptomen nach sich zieht.^{18,19,20,23} Dies wiederum führt in vielen Fällen zu ischämischen Reaktionen oder Infarkten im Versorgungsgebiet des Gefäßes distal des Thrombus.⁹

Spielen sich diese Vorgänge an den Koronararterien ab, so kann, in Abhängigkeit des Ausmaßes und der Dauer der Ischämie, sowie in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Kollateralgefäßen, ein akuter Myokardinfarkt entstehen.^{24,27} Dieser stellt eines der häufigsten Krankheitsbilder im Rahmen von Herz-Kreislaufkrankungen des Menschen dar und war im Jahr 2013 die zweithäufigste Todesursache in Deutschland.^{28,29} Andere häufige Folgen der Atherosklerose neben dem Myokardinfarkt sind Schlaganfälle, die periphere arterielle Verschlusskrankheit und Aorten-Aneurysmen.¹

Da die Pathomechanismen, die der Entzündungsreaktion der Atherosklerose zugrunde liegen, noch immer nicht vollständig geklärt sind, ist es von immenser Bedeutung, das Wechselspiel der beteiligten Zellen und Entzündungsmediatoren weiter zu erforschen, um neue Behandlungsmöglichkeiten entwickeln zu können, die das Entstehen atherosklerotischer Prozesse verhindern oder ihr Fortschreiten verzögern können.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Entzündungsmediatoren beschrieben, die an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sind. Ein wichtiger Mediator in diesem Zusammenhang stellt das Immunophilin Cyclophilin A (CyPA) dar, für das in den letzten Jahren eine Beteiligung an der Entstehung atherosklerotischer Prozesse belegt wurde.^{30,31,32}

Einen weiteren Vertreter der Immunophiline stellt Cyclophilin B (CyPB) dar. Es zeigt eine enge strukturelle Verwandtschaft zu CyPA und ist ebenso wie CyPA ein starker proinflammatorischer Mediator.^{33,34,35}

Über die Beteiligung von CyPB an atherosklerotischen Prozessen konnten in der Literatur keine Hinweise gefunden werden. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Funktionen von CyPB bei der Entstehung atherosklerotischer Veränderungen näher zu definieren. Zu diesem Zweck wurde in der nachfolgend dargestellten experimentellen Untersuchung zunächst die Expression von CyPB in murinen atherosklerotischen Plaques sowie bei Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen nachgewiesen. Darüber hinaus wurde der Effekt von CyPB auf das Migrationsverhalten von Monozyten und deren Matrix Metalloproteinasen-Aktivität sowie auf das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten *in vitro* untersucht und der Einfluss von CyPB auf das Migrationsverhalten von Leukozyten *in vivo* charakterisiert.

II Schrifttum

1 Atherosklerose

1.1 Definition und histologische Klassifikation der Atherosklerose

Der Begriff „Atherosklerose“ leitet sich aus dem Griechischen ab (*athära* = Grütze, *scleros* = hart) und wurde im Jahr 1904 von Marchand eingeführt.³⁶ Es handelt sich dabei um eine progressive, entzündliche Erkrankung, die hauptsächlich die mittleren und großen Arterien des muskulär/elastischen Typs betrifft und durch eine Dysfunktion des Endothels initiiert wird.^{9,11}

Sie wurde von der WHO folgendermaßen definiert: „Die Atherosklerose ist eine variable Kombination von Veränderungen der Intima von Arterien, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“.

Die *American Heart Association* (AHA) hat eine histologische Klassifikation für atherosklerotische Läsionen des Menschen aufgestellt.^{17,37,38} Es werden dabei folgende Stadien unterschieden:

Typ I-Läsion: Initialläsion

Dieses Stadium ist durch mikroskopisch erkennbare Lipidablagerungen in der Intima mit sporadischen Schaumzellherden gekennzeichnet. Diese Läsionen sind bereits bei Babys und Kleinkindern zu finden.

Typ II-Läsion: Fettstreifen bzw. *fatty streak*

Es bilden sich multiple Lagen von Schaumzellen aus. Diese Läsionen sind makroskopisch als gelb gefärbte Fettstreifen erkennbar und sind bis zum 25. Lebensjahr bei beinahe allen Individuen vorhanden.¹⁶

Typ III-Läsion: Präatherom oder *intermediate lesion*

Hier finden sich Herde von mikroskopisch sichtbaren, extrazellulären Lipidtröpfchen unterhalb der Lagen von Schaumzellen, die die extrazelluläre Matrix und glatte Muskelzellen verdrängen.

Typ IV-Läsion: Atherom

Eine dichte Ansammlung von extrazellulären Lipiden, der sogenannte *lipid core*, entsteht. Dies führt zu einer deutlichen Desorganisation der Intima, in deren Rahmen glatte Muskelzellen und extrazelluläre Matrix verdrängt und durch Lipidansammlungen ersetzt werden. Meist besteht noch keine Lumeneinengung.

Typ V-Läsion: Fibroatherom

Kennzeichnend für dieses Stadium ist die Proliferation glatter Muskelzellen und die Ausbildung einer sogenannten *fibrous cap*, die durch eine Zubildung von Kollagenfasern entsteht. Dies führt zu einer beginnenden Lumeneinengung.

Typ VI-Läsion: komplizierte Läsion - *complicated lesion*

Dabei handelt es sich um Typ IV- oder Typ V-Läsionen, auf deren Oberfläche sich Erosionen oder Fissuren, Hämatome oder Thromben gebildet haben.

II SCHRIFTTUM

Typ VII-Läsion: verkalkte Läsion

Das wichtigste Kennzeichen dieser Läsion besteht in der Mineralisation. Die Kalkablagerungen können den gesamten *lipid core* und Zelldetritus ersetzen.

Typ VIII-Läsion: fibröse Läsion

Hier dominieren fibröse Gewebsveränderungen. Lipidansammlungen sind nur minimal oder fehlen sogar ganz.

Die Läsionen vom Typ I – III sind dadurch gekennzeichnet, dass sie klinisch inapparent sind. Bei den fortgeschrittenen Läsionen ab Typ IV können plötzliche Komplikationen auftreten. Dadurch kommt ihnen eine wichtige klinische Bedeutung zu.¹⁷

Je nach Lokalisation der atherosklerotischen Veränderungen ergeben sich unterschiedliche Krankheitsbilder. Die drei bedeutendsten klinischen Manifestationen der Atherosklerose sind die koronare Herzkrankheit (mit möglichen Folgeerscheinungen wie Angina pectoris oder akutem Myokardinfarkt), die periphere arterielle Verschlusskrankheit sowie die zerebrale Ischämie (die eine vaskuläre Demenz oder sogar einen Schlaganfall nach sich ziehen kann). Weitere Lokalisationen mit entsprechenden Symptomen sind möglich. Hierzu zählen beispielsweise die Aorta (mit atherosklerotischen Aneurysmen), die Mesenterialgefäße (mit Angina abdominalis und hämorrhagischer Kolitis), die Nierenarterien (mit Hypertonie und Niereninsuffizienz) und die Beckengefäße (mögliche Impotenz bei Männern).^{39,40}

In Abbildung 1 sind die bedeutendsten pathologischen Veränderungen, die während der Atherogenese entstehen, schematisch dargestellt.

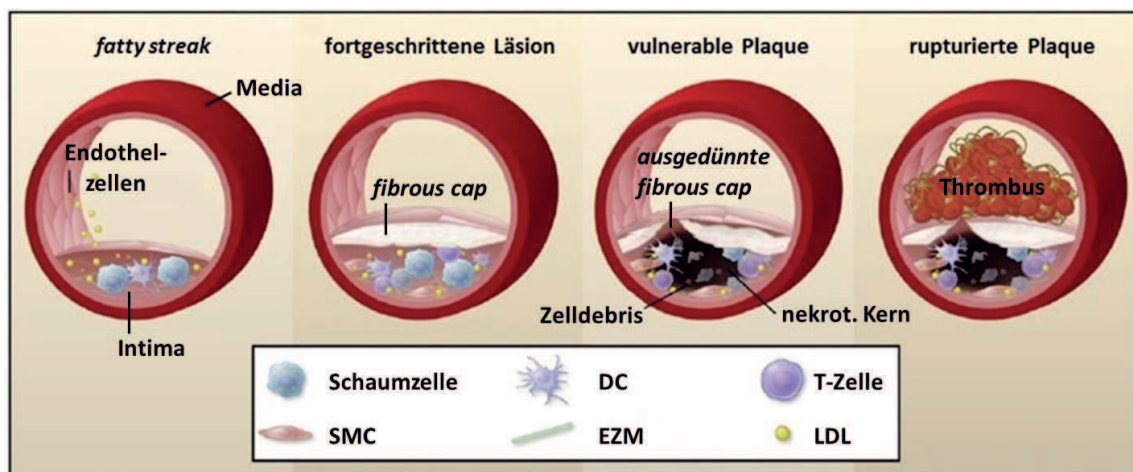


Abbildung 1: Die wichtigsten Stadien bei der Entstehung einer atherosklerotischen Läsion in der Arterienwand (Abb. modifiziert nach Moore und Tabas 2011⁵⁷)

Frühe *fatty streaks* zeichnen sich durch die subendotheliale Einlagerung von Lipoproteinen aus, die die Einwanderung von dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen nach sich zieht. Mit fortschreitender Entwicklung der Plaque wird die Intima auch von T-Lymphozyten und glatten Muskelzellen (SMC) infiltriert und die Retention von Lipoproteinen ist verstärkt. Ein Charakteristikum vulnerabler Plaques ist die Ansammlung apoptotischer Zellen und ein gestörter phagozytotischer Abtransport, was zur Bildung des nekrotischen Kerns führt. Das Ausdünnen der fibrösen Schutzkappe mindert die Stabilität der Läsion und führt letztlich zur Plaqueruptur und Thrombusbildung. DC = dendritische Zelle, SMC = glatte Muskelzelle, EZM = extrazelluläre Matrix, LDL = *low density lipoprotein*;

II SCHRIFTTUM

Für das Tierreich existiert eine histologische Einteilung der atherosklerotischen Veränderungen in Stadien analog zu derjenigen des Menschen lediglich für die Taube (*Columba livia*) sowie für das Huhn (*Gallus domesticus*).^{41,42}

Die Veränderungen bei der Taube werden in 5 Stadien eingeteilt:⁴¹

Stadium 1 ist gekennzeichnet durch die Ausbildung von lipidhaltigen Vakuolen in endothelialen und subendothelialen Zellen und durch die Proliferation der glatten Muskelzellen der Gefäßwand.

Stadium 2 zeichnet sich durch eine Zunahme des Lipidgehaltes in der Plaque aus. Es bilden sich amorphe Lipidansammlungen in nekrotischen Zentren der Plaque.

Im Stadium 3 kommt es zur Einwanderung von glatten Muskelzellen in die Plaque und deren Proliferation.

Stadium 4 ist gekennzeichnet durch die Ausbildung einer fibrösen Kappe aus glatten Muskelzellen auf der Plaqueoberfläche. Außerdem kommt es zu einer fettigen Degeneration der mit Cholesterinestern beladenen Zellen der Plaque und Ausbildung von Cholesterinspalten in den histologischen Präparaten der Plaque. Diese entstehen durch die fettige Degeneration der Zellen in der Plaque und der damit einhergehenden Auskristallisation des reinen Cholesterins. Dieses wird bei der histologischen Präparation herausgelöst und hinterlässt dabei die charakteristischen, nadelförmigen Spalträume.⁴³

Stadium 5 zeichnet sich durch eine massive Fibrosierung der Plaque, durch die Einlagerung von sauren Mukopolysacchariden und Lipiden, sowie durch Ossifikation und Ulzerationen aus. In der Plaque sind nur sehr wenige Lymphozyten und Makrophagen vorhanden.

Die atherosklerotischen Veränderungen beim Huhn sind in 6 Stadien eingeteilt:⁴²

Stadium 1 ist gekennzeichnet durch Endotheldegeneration und die Entstehung von Ödemen in der Intima.

Stadium 2 zeichnet sich durch Veränderungen des Phänotyps der glatten Muskelzellen aus: die Zellen sind klein und weisen ein eosinophiles Zytoplasma auf.

Im Stadium 3 bildet sich eine zelluläre Plaque aus dicht gepackten glatten Muskelzellen.

Im Stadium 4 kommt es durch die Einlagerung von Kollagen zur Entstehung einer zellulär-fibrösen Plaque.

Im Stadium 5 bildet sich eine fibröse Plaque: es kommt zu einer Zunahme der kollagenen Fasern, die sich um die glatten Muskelzellen in Bündeln ansammeln.

Im Stadium 6 entsteht eine atheromatöse Plaque: oberflächlich finden sich kollagene Fasern, in der Tiefe Schaumzellen und Lipidansammlungen.

1.2 Die Pathogenese der Atherosklerose

1.2.1 Endotheliale Dysfunktion

Das Endothel stellt die wichtigste Regulationsstelle für die Aufrechterhaltung zahlreicher homöostatischer Zustände im Blutgefäß dar.⁴⁴ Im physiologischen Zustand reguliert es den Gefäßtonus, fungiert als selektiv permeable Barriere zwischen Blut und Gewebe, kontrolliert Thrombusbildung und Thrombolysen und ist an der Regulierung von Entzündungsprozessen beteiligt.^{4,45}

In der Pathogenese der Atherosklerose kommt dem Endothel ebenfalls eine wichtige Rolle zu. Gemäß der *response-to-injury*-Hypothese nach Ross führt eine Schädigung des Endothels durch bestimmte Reize zu einer endothelialen Dysfunktion.⁹ Dies führt zu einer kompensatorischen Reaktion des Endothels in Form eines inflammatorischen Prozesses, welcher die Basis für die Entstehung der Atherosklerose darstellt.⁹

Hämodynamische Kräfte können die Funktion des Endothels beeinflussen.⁴⁶ An spezifischen Stellen wie Bifurkationen, Aufzweigungen oder Bögen von Arterien kommt es zu Veränderungen der Blutflusseigenschaften.⁹ Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung von Endothelzellen. Dabei werden Gene induziert, die für bestimmte Adhäsionsmoleküle kodieren.⁹ Außerdem besteht in diesen Bereichen eine erhöhte Permeabilität für Blutzellen und atherogene Makromoleküle wie *low density lipoprotein* (LDL), die durch eine längere Verweildauer dieser Stoffe in diesen Regionen zustande kommt.⁴⁷ Diese Bereiche sind demzufolge Prädispositionsstellen für atherosklerotische Läsionen.^{4,47}

Durch die erhöhte Permeabilität für Makromoleküle kommt es zur Ansammlung von Lipoproteinen (vornehmlich LDL, aber auch β -very low density lipoprotein (β -VLDL) und Lipoprotein a) in der subendothelialen Matrix der Arterie.⁴ Dieser Vorgang findet unter physiologischen Bedingungen nur in geringem Maße statt und ist bei erhöhten Plasma-Lipoprotein-Konzentrationen verstärkt.³⁷

In der subendothelialen Matrix bindet das LDL an Proteoglykane, wodurch es dort immobilisiert und anschließend oxidativ modifiziert oder enzymatisch verändert wird.^{22,48,49,50} Die oxidative Veränderung des LDL erfolgt beispielsweise über die Einwirkung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die von Endothelzellen und Makrophagen in der Intima produziert werden.¹ Hierzu gehören unter anderem Superoxid-Anionen ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxyl-Radikale (HO^{\cdot}), Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}), Lipid-Radikale, Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$) und Hypochlorsäure ($HOCl$).⁵¹ Die modifizierten Lipide nehmen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose ein, indem sie zu einer zusätzlichen inflammatorischen Aktivierung des Endothels führen.^{22,52,53}

Weitere Auslöser für das Entstehen einer endothelialen Dysfunktion können neben den oben erwähnten Faktoren beispielsweise auch erhöhte Plasma-LDL-Level, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, erhöhte Plasma-Homocysteinkonzentrationen sowie Infektionen mit *Chlamydia pneumoniae* und mit Herpesviren sein.⁴

1.2.2 Die frühe atherosklerotische Läsion

Die aktivierten Endothelzellen produzieren chemotaktisch wirksame Zytokine, sogenannte Chemokine, die bewirken, dass Leukozyten, insbesondere Monozyten und in geringerem Umfang auch T-Zellen, Kontakt mit dem Endothel aufnehmen (*tethering*), an diesem entlangrollen (*rolling*) und schließlich fest adhärieren (*arrest*).^{22,54-57}

Das *rolling* wird dabei durch E- und P-Selektine vermittelt, die mit *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) auf Monozyten und T-Lymphozyten interagieren.^{53,58,59} Die feste Adhäsion der Leukozyten wird durch Integrine wie *intercellular cell adhesion molecule 1* (ICAM-1) und *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) vermittelt, die an die Integrine *very late antigen-4* (VLA-4) und *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) auf den Leukozyten binden.^{57,59-64}

Der festen Adhäsion der Leukozyten folgt deren Diapedese in den subendothelialen Raum.^{55,65} Die beiden wichtigsten Moleküle, die daran beteiligt sind, sind *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) und oxidativ modifiziertes LDL (oxLDL).⁵⁶

MCP-1 hat eine starke chemotaktische Wirkung auf Monozyten und T-Zellen.⁵⁶ Es wird sowohl von Endothelzellen, als auch von glatten Muskelzellen und Makrophagen in der atherosklerotischen Plaque gebildet.^{54,56,66-68} MCP-1 bindet an den Chemokinrezeptor CCR2 auf Monozyten und bewirkt so deren Migration entlang eines Konzentrationsgradienten.⁵⁴

Neben MCP-1 wird die Migration der Monozyten partiell auch durch oxidativ modifiziertes LDL hervorgerufen, welches chemotaktisch auf Monozyten wirkt.^{52,69} Außerdem führt es zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und der Sekretion von Chemokinen.¹

Unter dem Einfluss des Wachstumshormons *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), das sowohl von glatten Muskelzellen als auch von Endothelzellen gebildet wird, differenzieren die Monozyten in den Läsionen zu Makrophagen aus.^{4,57,68,70} Diese sind in der Lage, eine Reihe von hydrolytischen Enzymen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen zu bilden, die das Entzündungsgeschehen vorantreiben.^{9,10} Neben der Ausdifferenzierung der Monozyten bewirkt M-CSF auch die Proliferation von Makrophagen sowie die Induktion von *Scavenger*-Rezeptoren.^{55,67,68}

Das in der Intima akkumulierte, oxidativ veränderte LDL wird von den Makrophagen phagozytiert. Dieser Prozess wird über *Scavenger*-Rezeptoren gesteuert. In diesem Zusammenhang sind insbesondere der Typ-A *Scavenger*-Rezeptor (SRA) und CD36, ein Mitglied der Typ-B-Familie der *Scavenger*-Rezeptoren zu erwähnen.⁷¹

Die aufgenommenen Cholesterolester werden in Endosomen zu Cholesterol und freien Fettsäuren hydrolysiert und innerhalb der Makrophagen weitertransportiert, beispielsweise zur Plasmamembran oder dem endoplasmatischen Retikulum. Im endoplasmatischen Retikulum können sie wieder reesterifiziert werden. Die so entstandenen Cholesterolester sammeln sich in membrangebundenen, neutralen Lipidtröpfchen.⁷²

Die auf diese Art entstandenen lipidbeladenen Makrophagen werden aufgrund ihrer mikroskopisch schaumigen Erscheinung als Schaumzellen bezeichnet (siehe Abb. 2) und sind das Kennzeichen früher und fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen.^{10,55} Sie bilden eine Reihe proinflammatorischer

II SCHRIFTTUM

Zytokine, die die entzündlichen Prozesse in der Initialläsion und die Leukozyten-Rekrutierung weiter fördern.⁷³

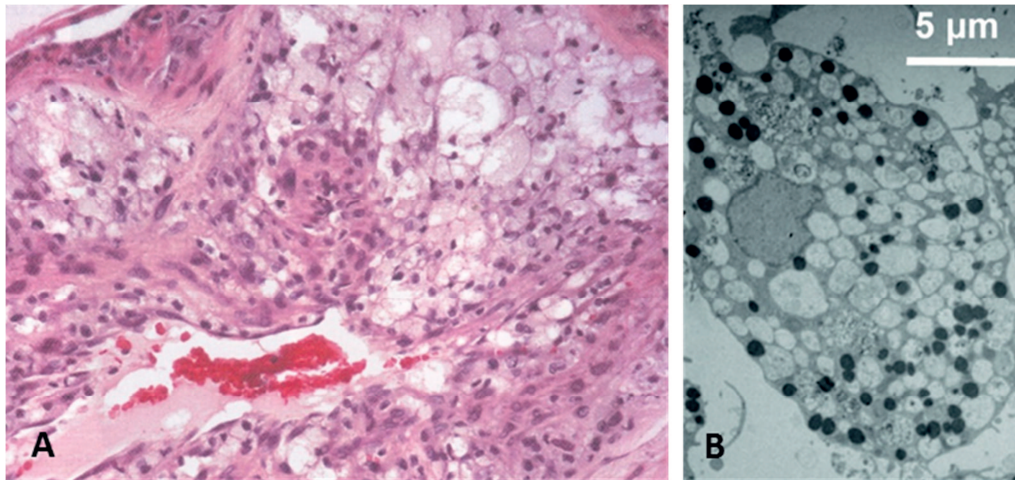


Abbildung 2: Mikroskopische Darstellung von Schaumzellen

A) Schaumzellen in der Media einer atherosklerotisch veränderten Meninxarterie eines Pferdes (HE-Färbung). Die Schaumzellen stellen sich mit deutlichen Vakuolen dar (Abbildung mit freundlicher Genehmigung des Urban & Fischer Verlags/Elsevier GmbH, aus Mc Gavin und Zachary 2009⁸). **B)** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Schaumzelle (Abbildung aus May et al. 2008¹²⁴)

Scavenger-Rezeptoren unterliegen im Vergleich zu nativen LDL-Rezeptoren keinem negativen Feedback-Mechanismus, sodass dieser Prozess nicht durch eine Cholesterol-Sättigung der Zellen gestoppt wird. Dies führt schließlich zum Absterben der Schaumzellen und trägt zur Bildung des Lipidkerns in späteren Läsionen bei.⁵⁶

In Abbildung 3 findet sich eine schematische Darstellung des Aufbaus einer unveränderten arteriellen Gefäßwand sowie der initialen Prozesse, die bei der Entstehung einer atherosklerotischen Läsion ablaufen.

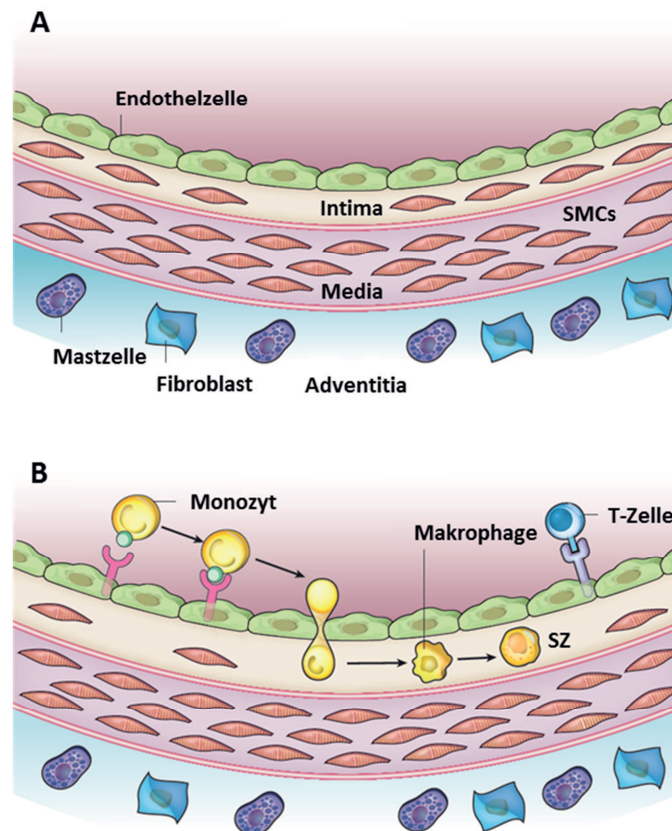


Abbildung 3: Aufbau einer unveränderten Arterienwand (A) und Initiation einer atherosklerotischen Läsion (B) (Abbildung modifiziert nach Libby et al. 2011⁷³)

A) Die *Tunica intima* ist von einer Endothelschicht ausgekleidet, die auf einer Basalmembran liegt. Die Intima enthält beim Menschen auch glatte Muskelzellen. Die *Tunica media* besteht aus glatten Muskelzellen und einer komplexen extrazellulären Matrix. Die *Tunica adventitia* enthält Mastzellen, Fibroblasten und freie Nervenendigungen. **B)** Die Initiation der Atherosklerose umfasst die Adhäsion von Leukozyten und deren Migration in die Intima, die Ausreifung von Monozyten zu Makrophagen, sowie die Aufnahme von Lipiden durch diese und die Bildung von Schaumzellen. SMCs = glatte Muskelzellen, SZ = Schaumzellen;

1.2.3 Progression der atherosklerotischen Plaque – *intermediate lesion* und *fibrous plaque*

Der Übergang vom *fatty streak* zu einer komplexeren Läsion, die symptomatisch werden kann, ist durch die Einwanderung glatter Muskelzellen in die Intima und deren Proliferation gekennzeichnet.⁵² Diese Prozesse werden unter anderem durch Interleukin 1 (IL-1), *platelet-derived growth factor* (PDGF) und *tumor necrosis factor* α (TNF- α) gesteuert. An der Proliferation ist zusätzlich *transforming growth factor* β (TGF- β) beteiligt.⁷⁴⁻⁷⁶

Glatte Muskelzellen können ebenso wie Makrophagen LDL aufnehmen und wie diese zu Schaumzellen werden.^{52,78} Jedoch geschieht dies nur in geringerem Ausmaß als bei Makrophagen.⁷⁹

II SCHRIFTTUM

Darüber hinaus produzieren glatte Muskelzellen extrazelluläre Matrix, die in erster Linie aus Kollagen, sowie aus elastischen Fasern und Proteoglykanen besteht.^{73,76,78,79} Als Stimulantien hierfür wirken PDGF, TGF- β 1 und in geringem Umfang auch IL-1. Diese werden von verschiedenen Zellen in der Läsion, insbesondere von Makrophagen, gebildet.^{55,76}

Das hier beschriebene Stadium atherosklerotischer Läsionen, das sich durch eine Ansammlung von Schaumzellen, T-Zellen, glatten Muskelzellen und einer schwach entwickelten Bindegewebsmatrix auszeichnet, wird als *intermediate* oder *fibrofatty lesion* bezeichnet und ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.⁸⁰

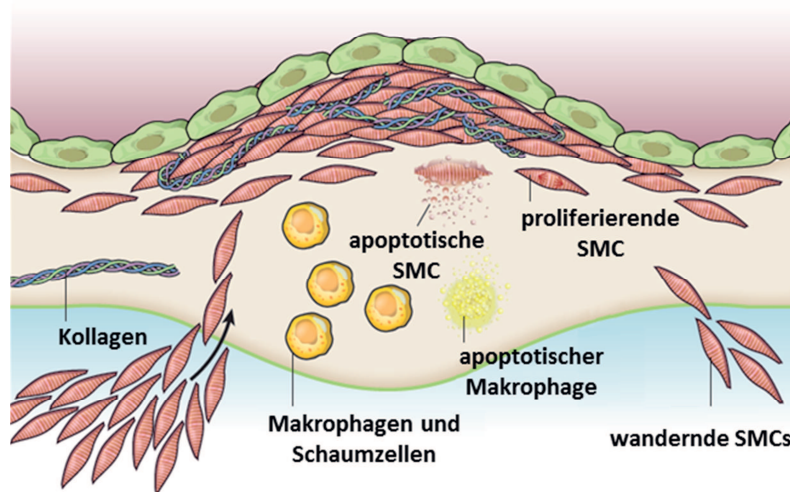


Abbildung 4: Progression der atherosklerotischen Läsion (Abbildung modifiziert nach Libby et al. 2011⁷³)

Bei der Plaqueprogression kommt es zur Migration glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima und zur Proliferation derselben, sowie zur vermehrten Produktion extrazellulärer Matrix und Ausbildung eines nekrotischen Kerns. Es finden sich außerdem Cholesterolkristalle und einsprossende Mikrogefäße. SMC = glatte Muskelzelle;

Schreitet die Matrixproduktion weiter fort, kommt es zu einer Verdickung der Arterienwand, die zunächst durch eine graduelle Vasodilatation kompensiert wird, sodass das Gefäßlumen bis zu einem gewissen Stadium unverändert bleibt. Dieses Phänomen wird als *remodeling* bezeichnet. Ab einem bestimmten Punkt kann die Arterie die Verdickung der Gefäßwand nicht mehr durch weitere Dilatation kompensieren und es kommt zur Vorwölbung der Läsion ins Gefäßlumen, die mit einer Veränderung der Blutflusseigenschaften einhergeht.⁹

Im weiteren Verlauf entsteht eine *fibrous plaque* oder auch Fibroatherom.^{17,80,81} Dabei kommt es zur Ausbildung einer fibrösen Schutzkappe, die aus zahlreichen glatten Muskelzellen, einer dichten Matrix aus Kollagen und etwas Elastin besteht und auch eine variierende Anzahl von Makrophagen und T-Zellen enthalten kann.^{80,82} Diese *fibrous cap* bedeckt einen nekrotischen Kern (Synonym: *lipid core* oder Lipidkern, siehe Abb. 5). Dieser besteht aus einer Mischung von extrazellulären Lipiden und Zelldebris, der von einem Wall von Schaumzellen umgeben ist; lebende Zellen fehlen in ihm nahezu gänzlich.⁸³ Er enthält außerdem prothrombotisch wirkende Substanzen, wie den aus Makrophagen

II SCHRIFTTUM

freigesetzten *tissue factor*, wodurch er für die Thrombogenität einer Läsion maßgeblich verantwortlich ist.⁸⁵⁻⁸⁷ T-Lymphozyten können Makrophagen über die Expression von CD40L (CD154) zu einer verstärkten Produktion von *tissue factor* anregen und hierdurch die Thrombogenität der Plaque zusätzlich verstärken.^{86,121}

Die fibröse Schutzkappe stellt also einen wichtigen Schutzmechanismus dar, indem sie die Läsion vom Gefäßlumen abschirmt und kann als Heilungsversuch des Körpers angesehen werden.⁸⁸

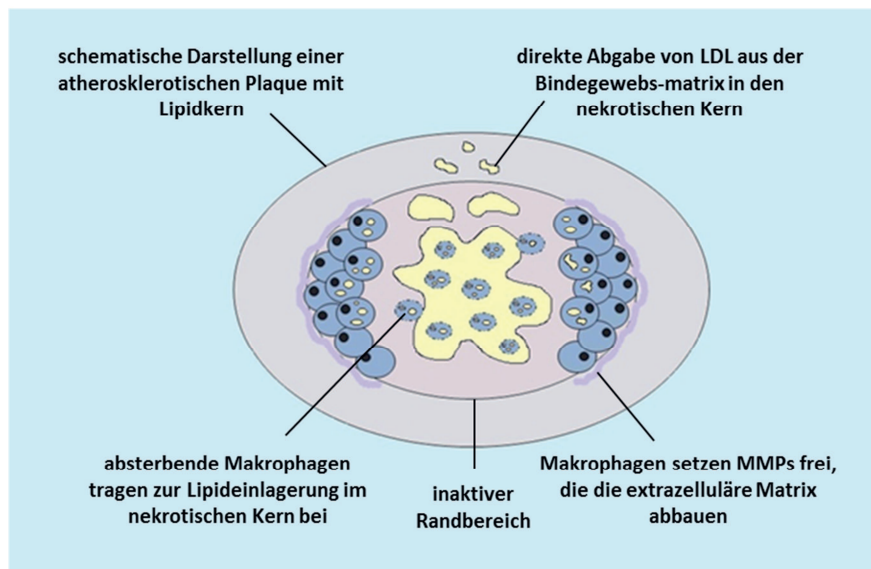


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des nekrotischen Kerns einer atherosklerotischen Plaque (Abbildung modifiziert nach Davies 1996⁸⁴)

Die Lipide des Kerns stammen teils aus abgestorbenen Makrophagen, teils von LDL, das direkt an Proteoglykane gebunden wurde, ohne eine intrazelluläre Passage durchlaufen zu haben. Einige Randbereiche des Lipidkerns werden von aktivierten Makrophagen gesäumt, die MMPs exprimieren, andere Bereiche des Randes sind zellfrei und reaktionslos.

1.2.4 Komplexe Läsion und Thrombusbildung

Die Entstehung solcher fortgeschrittener Läsionen dauert viele Jahre während derer die Läsionen asymptomatisch bleiben.^{21,55,76} Allerdings kann es zu plötzlich auftretenden schwerwiegenden Komplikationen wie einem Myokardinfarkt oder einem Schlaganfall kommen, wenn der Blutfluss beeinträchtigt und die Sauerstoffversorgung in den Versorgungsgebieten eingeschränkt wird.^{1,16,80}

Nur selten liegt die Ursache hierfür darin, dass eine Läsion so groß wird, dass sie den Blutfluss im Gefäß blockiert.⁴ Vielmehr resultieren die meisten Myokardinfarkte aus milden bis moderaten Stenosen, die weniger als 50% des Lumens verlegen.⁸⁹ Sie sind auf gefäßverschließende Thromben zurückzuführen.⁴ Aber auch nicht gänzlich okkludierende Thromben können zu klinischen Symptomen führen.⁸³

II SCHRIFTTUM

Etwa ein Viertel bis ein Drittel der Thrombosen wird durch eine oberflächliche Erosion der Plaque ausgelöst (siehe Abb. 6B).^{16,90} Hierbei kommt es zu Apoptose oder Abschilferung des Endothels, woraufhin Thrombozyten mit subendotheliale Kollagen und von Willebrand Faktor (vWF) in Kontakt kommen. Dies führt zur Aktivierung der Thrombozyten und zieht ihre Adhäsion nach sich.^{90,91} Derartige Veränderungen sind vorwiegend bei jüngeren Menschen und Frauen, sowie bei Diabetikern zu finden.^{83,91,92}

Mit etwa zwei Drittel bis drei Viertel der Fälle werden die meisten Thrombosen allerdings durch ein Aufreißen der fibrösen Schutzkappe ausgelöst (siehe Abb. 6A).^{21,90} Diese sogenannte Plaqueruptur stellt die häufigste Ursache für einen Myokardinfarkt dar.²¹ Dabei kommt das thrombogene Material des nekrotischen Kerns in Kontakt mit Blutbestandteilen, aktiviert die Gerinnungskaskade und löst die Thrombusbildung aus.⁵²

Die Festigkeit der Schutzkappe, die wiederum von ihrer Dicke und ihrem Kollagengehalt abhängig ist, bestimmt demzufolge die Stabilität der Plaque maßgeblich mit.^{9,93}

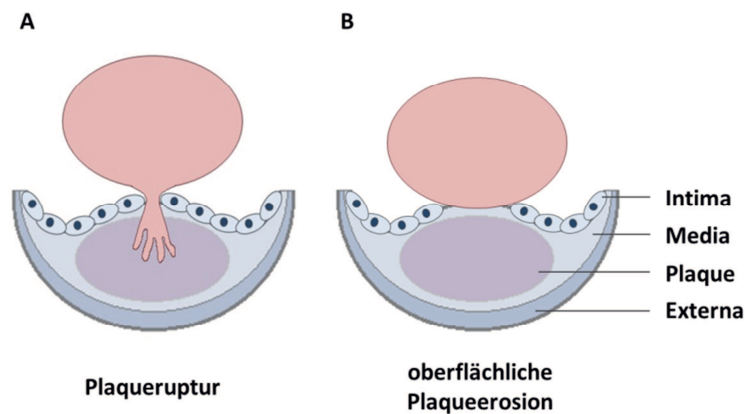


Abbildung 6: Vergleichende schematische Darstellung von Plaqueruptur (A) und Plaqueerosion (B) (Abbildung modifiziert nach Libby 2009⁹¹)

A) Der Thrombus ist in der Plaque verankert. **B)** Der Thrombus sitzt auf der Oberfläche der Plaque.

Neben diesen beiden Faktoren wird die Stabilität der Plaque noch von der Größe und Zusammensetzung des nekrotischen Kerns, dem Inflammationszustand in der Schutzkappe sowie Ermüdungserscheinungen der Schutzkappe mitbestimmt.²¹

So macht ein großer Lipidkern (>40% der Läsion) mit einem hohen Anteil an Cholesterolestern, die den Kern erweichen, die Läsion vulnerabler.²¹ Auch eine geringe Anzahl glatter Muskelzellen - die Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix - verringert die Stabilität der Plaque.^{94,95} Außerdem wird die Plaque durch eine hohe Anzahl inflammatorischer Makrophagen und T-Lymphozyten destabilisiert.⁴ Zusätzlich können biomechanische Faktoren wie Blutdruck, Scherkräfte etc. die Kappe mechanisch schwächen.²¹

Eine Plaqueruptur tritt bevorzugt dort auf wo die Schutzkappe am dünnsten und am stärksten von Schaumzellen infiltriert ist.²¹ In ca. 60% der Fälle ist dies an der Schulterregion der Plaque, der Verbindungsstelle der Plaque mit der Gefäßwand.^{21,96}

II SCHRIFTTUM

Die Plaqueschulter sowie andere rupturgefährdete Bereiche sind von einer großen Zahl von Makrophagen, T-Lymphozyten und Mastzellen infiltriert.^{21,85,97} Die Zahl kollagensynthetisierender glatter Muskelzellen hingegen ist vermindert.⁹⁸

Die aktivierten T-Zellen produzieren Interferon γ (IFN- γ).^{85,91,99} Dieses Zytokin hemmt sowohl die Proliferation glatter Muskelzellen als auch ihre Kollagensynthese, sodass sie nicht mehr in der Lage sind, die Kollagenmenge, die für die Integrität der Kappe verantwortlich ist, aufrecht zu erhalten (siehe Abb. 7, linke Bildhälfte).^{93,99}

Der Kollagengehalt der Schutzkappe kann außer über eine verminderte Synthese auch durch einen verstärkten Abbau reduziert werden. So können Makrophagen von CD40L-exprimierenden T-Zellen zur Produktion von Proteinasen, den sogenannten Matrix Metalloproteinasen (MMPs), angeregt werden, die den Kollagenabbau der Schutzkappe bewirken.¹⁰⁰ Die Kollagenasen MMP-1, MMP-8 und MMP-13 katalysieren das initiale Aufbrechen der Kollagenfibrillen. Gelatinasen wie MMP-2 und MMP-9 übernehmen den weiteren Abbau des Kollagens (siehe Abb. 7, rechte Bildhälfte).¹⁰⁰

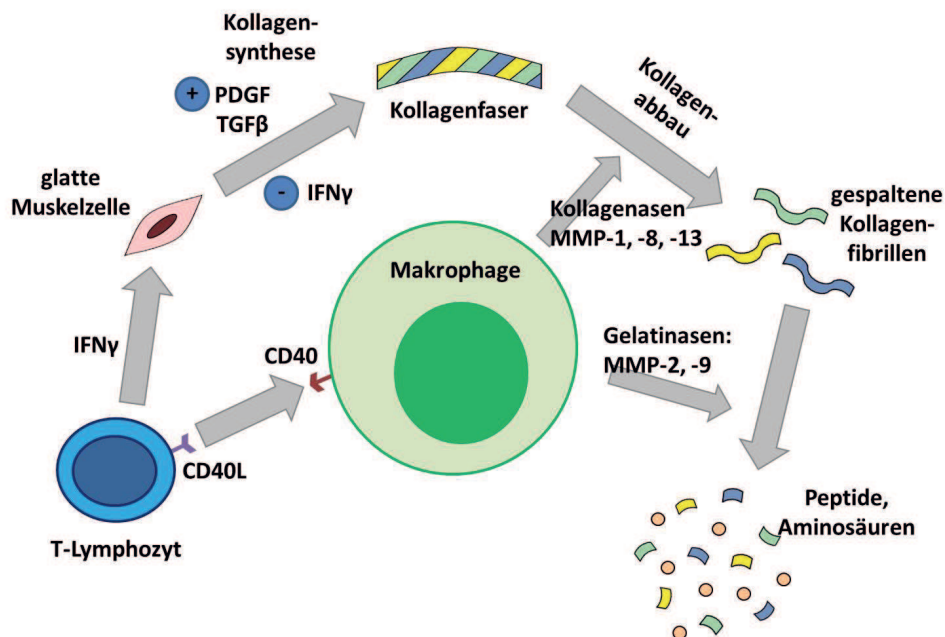


Abbildung 7: Regulationsschritte im Auf- und Abbau des Kollagens in der atherosklerotischen Plaque (Abbildung modifiziert nach Libby 2009⁹¹)

Das Entzündungsgeschehen steuert den Kollagenaufbau und -abbau. T-Zellen produzieren IFN- γ . Dieses hemmt die Proliferation der glatten Muskelzellen sowie ihre Kollagensynthese, durch welche die *fibrous cap* vor Ruptur geschützt wird. Durch die Bindung von CD40L auf T-Zellen und CD40 auf Makrophagen werden letztere zur Bildung interstitieller Kollagenasen wie MMP-1, -8 und -13 angeregt, die die Spaltung von Kollagenfibrillen katalysieren. Diese werden im Anschluss durch Gelatinasen weiter gespalten. Durch diese Mechanismen kann die Stabilität der atherosklerotischen Plaque beeinträchtigt werden.

Auch Mastzellen sind am Kollagenabbau beteiligt. Sie enthalten Enzyme (Tryptase und Chymase), die die Zymogenformen der Matrix Metalloproteinasen aktivieren können.⁹⁷

II SCHRIFTTUM

Die verminderte Kollagensynthese in Kombination mit verstärktem Abbau führt zu einer Ausdünnung der *fibrous cap*.⁹¹ Je dünner die Kappe wird, desto vulnerabler wird die Plaque.

Rupturiert die Plaque schließlich, kommt es in der Folge zu einer Trombusbildung (siehe Abb. 8). Diese wird auf verschiedenen Wegen hervorgerufen: einerseits führt der Kontakt der Thrombozyten mit der extrazellulären Matrix der Plaque zu deren Aktivierung. Andererseits wird die Gerinnungskaskade über *tissue factor*, der von Makrophagen und glatten Muskelzellen produziert wird, initiiert.¹⁰¹ *Tissue factor* findet sich außerdem auf apoptotischen Zellen und seine höchste Konzentration lässt sich im nekrotischen Kern nachweisen.⁴⁹

Diese thrombotischen Prozesse führen dann zur Okklusion oder Subokklusion des betreffenden Gefäßes.¹⁶ In Abhängigkeit von Ausmaß und Dauer des Gefäßverschlusses kommt es zu klinischen Symptomen wie dem Myokardinfarkt.^{24,27} Bei nur wandständigen Thromben in Koronargefäßen können plötzliche Symptome wie Angina pectoris auftreten, bei okkludierenden Thromben akute Symptome wie ein Myokardinfarkt, instabile Angina pectoris und plötzlicher Herztod.⁴⁹

Wandständige Thromben können bindegewebig organisiert werden. Auf diese Weise kann es zu einer raschen Weiterentwicklung von kleineren Läsionen zu raumfordernden stenotischen oder okkludierenden fibrotischen Läsionen kommen.¹⁰²

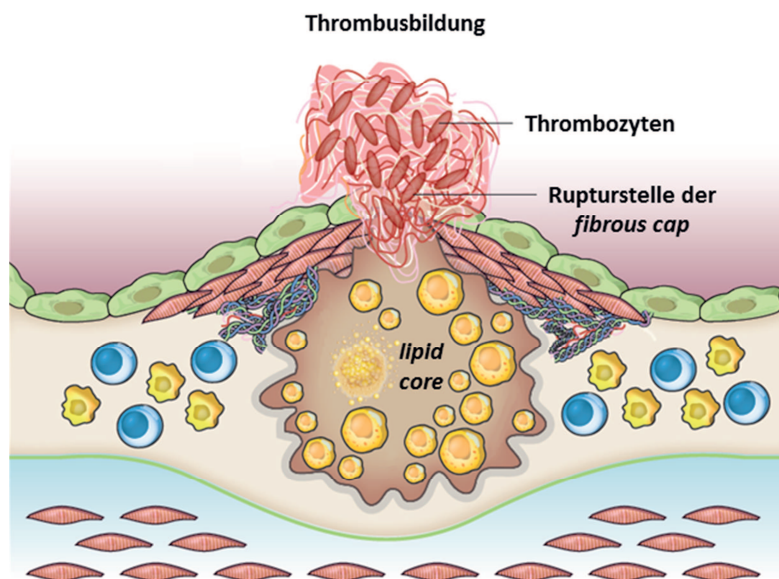


Abbildung 8: Plaqueruptur und Thrombose (Abbildung modifiziert nach Libby et al. 2011⁷³)

Durch die Ruptur kommen Gerinnungsfaktoren des Blutes in Kontakt mit *tissue factor* im Inneren der Plaque und lösen thrombotische Ereignisse aus, durch die der Blutstrom behindert werden kann.

1.3 Atherosklerose im Tierreich

Die Atherosklerose tritt im Tierreich nur gelegentlich auf und führt nur selten zu klinischen Erscheinungen wie Infarkten von Herz oder Gehirn. Natürlicherweise kann sie bei Vögeln und alternden Schweinen sowie bei Hunden mit Hypothyreoidismus, die eine Hypercholesterinämie entwickeln, vorkommen.⁸ Auch Stoffwechselstörungen wie Diabetes mellitus oder die idiopathische Hyperlipidämie des Zwergschnauzers können gelegentlich zur Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen bei Hunden führen.¹⁰³ Bei herbivoren Tieren spielen Lipideinlagerungen und atheromatöse Arterienwandnekrosen keine Rolle.⁷

Als limitierender Faktor spielt zudem die kurze Lebensdauer, insbesondere von Nutztieren, eine entscheidende Rolle.⁷ So lassen sich beim Hausschwein und Wildschwein etwa im Alter von 10 Jahren komplexe atherosklerotische Veränderungen nachweisen. Da diese Zeitspanne die Nutzungsdauer der Tiere überschreitet, findet man bei Schlachttieren im Allgemeinen nur Frühstadien, insbesondere in der Abdominalaorta und in Zerebralarterien.⁷

Bei den Vögeln sind insbesondere *Psittaciden* prädisponiert, atherosklerotische Veränderungen zu entwickeln. Bei ihnen sind vor allem die großen Gefäße an der Herzbasis betroffen. Klinisch manifeste Erkrankungen werden gehäuft bei Graupapageien, Nymphensittichen und Amazonen gefunden, insbesondere bei älteren und weiblichen Tieren.¹⁰⁴ Aber auch andere Vogelordnungen wie die *Anseriformes* (Schwan, Gans, Ente etc.), *Columbriformes* (Taube etc.) oder *Galliformes* (Huhn, Fasan etc.) sind empfänglich für Atherosklerose.¹⁰⁵

Atherosklerose bei Hunden (siehe Abb. 9) und Katzen ist für gewöhnlich eine Folge anderer Erkrankungen wie Hypothyreose, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie oder Hypertriglyceridämie.¹⁰⁶ Bei einer Untersuchung von 12.384 Hunden innerhalb einer Periode von 14 Jahren zeigten nur 21 Tiere atherosklerotische Veränderungen. Myokardfibrosen sowie Myokardinfarkte wurden ebenfalls beobachtet. 85% der betroffenen Tiere waren männlich, nur 15% weiblich. Zudem zeigten Hunde der Rasse Zwergschnauzer, Dobermann sowie Labrador Retriever eine höhere Rasseprävalenz.¹⁰⁷ Eine Verbindung von Chlamydieninfektion und Atherosklerose, wie sie beim Menschen häufig zu finden ist, konnte nicht gefunden werden.¹⁰⁸

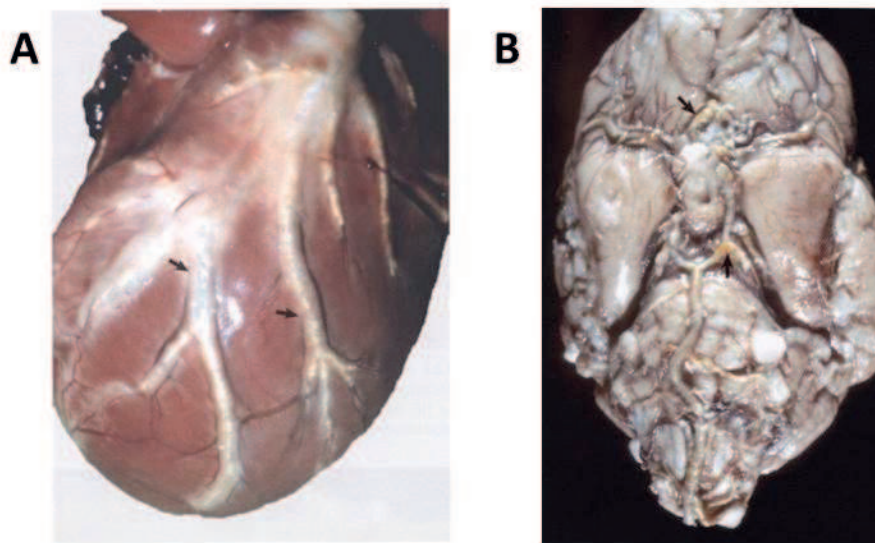


Abbildung 9: Fotografische Darstellung atherosklerotischer Gefäßabschnitte in den Koronararterien (A) und zerebralen Arterien (B) bei einem Hund mit Hypothyreoidismus (Abbildung mit freundlicher Genehmigung des Urban & Fischer Verlags/Elsevier GmbH, aus Mc Gavin und Zachary 2009 ⁸⁾

A) Die betroffenen Koronararterien am Ventrikel des linken Herzens treten deutlich als Stränge (Pfeile) mit verdickten Wänden hervor. **B)** Ventralseite des Gehirns eines Hundes mit Hypothyreose. Die zerebralen Arterien zeigen segmentale, gelbe, verdickte und granuläre Atherome (Pfeile).

Herzerkrankungen sind auch bei Menschenaffen weit verbreitet. Jedoch sind die zugrundeliegenden Ursachen bei Mensch und Affe unterschiedlicher Natur. Atherosklerotische Veränderungen sind bei Primaten nur äußerst selten vorliegende Befunde, obwohl sie häufig Blut-Lipidprofile haben, bei denen der Mensch als Risikopatient eingestuft werden würde.¹⁰⁹

So können bei in Gefangenschaft lebenden Schimpansen und Gorillas trotz einer relativ gesunden Zusammensetzung ihrer Futterration (diese enthält nur geringe Cholesterol-Mengen und wenig ungesättigte Fettsäuren) schon relativ früh in ihrem Leben hohe Serum-Cholesterolspiegel gemessen werden. Und auch die Cholesterol-Profile von Schimpansen haben ähnliche HDL- und LDL-Komponenten wie diejenigen des Menschen. Darüber hinaus kommen auch prädisponierende Faktoren, die das Risiko für die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen beim Menschen erhöhen, wie beispielsweise eine durch zu hohe Salzaufnahme ausgelöste Hypertension oder Übergewicht bei Tieren in Gefangenschaft regelmäßig vor.^{109,110}

Aus diesem Grund ist es sehr wahrscheinlich, dass die erhöhte Neigung des Menschen zur Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen auch auf andere Gründe (genetische Faktoren und/oder Umweltfaktoren) zurückzuführen ist.^{109,110}

Für die Erforschung der Pathogenese der Atherosklerose kamen im Laufe der Zeit verschiedene Tiermodelle zum Einsatz, bei denen atherosklerotische Läsionen entweder von selbst entstehen oder durch verschiedene Stimuli herbeigeführt werden können.^{111,112} Diese sind in der Diskussion im Kapitel 1.2.1 näher beschrieben.

1.4 Die Rolle von Monozyten und Makrophagen in der Atherosklerose

Monozyten und Makrophagen nehmen eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Atherosklerose ein.^{9,14,113} Die Auswanderung von Monozyten aus dem zirkulierenden Blut in die Intima von Arterien (siehe Abb. 10) wird als entscheidender Schritt in der Pathogenese dieser Erkrankung angesehen.^{9,52,57,115}

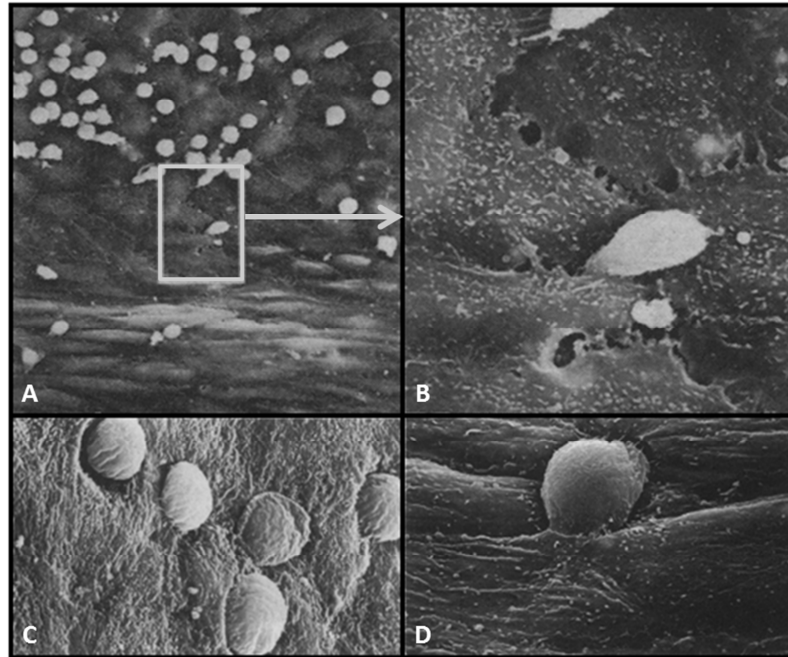


Abbildung 10: Adhäsion von Leukozyten am Endothel einer Arterie beim Menschen (Abbildungen aus Davies et al. 1988¹¹⁴)

A) Leukozyten adhären an intaktem Endothel über einer atherosklerotischen Plaque. Im Vordergrund ist ein Endothelbezirk mit normal angeordneten Zellen, auf dem keine Leukozyten adhären (407-fache Vergrößerung). **B)** Vergrößerter Ausschnitt aus Bildteil A: Ein Leukozyt (wahrscheinlich ein Monozyt) beim Durchdringen des Endothels (Bildausschnitt aus A, 2035-fache Vergrößerung). **C)** Adhärenente Leukozyten auf Endothelzellen (2200-fache Vergrößerung). **D)** Ein Leukozyt, der sich bereits unter den Rand einer Endothelzelle geschoben hat (3870-fache Vergrößerung).

Man geht davon aus, dass die Monozyten in der Folge in der Intima und Subintima zu Makrophagen ausdifferenzieren.¹¹ Makrophagen machen den größten Teil der Leukozyten in der atherosklerotischen Plaque aus.^{11,116,117} Sie spielen eine Rolle bei der Phagozytose, sind antigen-präsentierende Zellen und sezernieren Zytokine, Chemokine, wachstumsregulierende Moleküle, Matrix Metalloproteinasen und andere hydrolytische Enzyme.⁹

Insbesondere durch ihre Fähigkeit Zytokine, proteolytische Enzyme und Wachstumsfaktoren zu produzieren, nehmen sie entscheidenden Einfluss auf die Gewebeschädigung und Reparaturprozesse, die im Rahmen der Progression atherosklerotischer Läsionen auftreten.⁹

Im Anschluss an die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen in den Atherosklerose-Prädilektionsstellen und ihrer Aktivierung kommt es zur Aufnahme von Lipoproteinen. Diese

II SCHRIFTTUM

Vorgänge führen zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, wodurch sie Einfluss auf die Migration und Proliferation von Zellen nehmen.^{80,113}

Makrophagen stellen außerdem die Hauptquelle für Schaumzellen dar, welche charakteristisch für atherosklerotische Plaques sind.^{55,80} Sie sind in der Lage, eine verstärkte Nachbildung ihres eigenen Zelltyps auszulösen, indem sie zur Oxidation von LDL beitragen, welches dann von Makrophagen phagozytiert wird.⁸⁰ Die Oxidation von LDL bewerkstelligen sie auf unterschiedliche Arten: zum einen enzymatisch (vermittelt durch Lipoxygenase, Sphingomyelinase, Myeloperoxidase und sekretorische Phospholipase A₂) und zum anderen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS).^{80,88,118}

Über die Sekretion von *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) und *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) können sie die Proliferation von Monozyten induzieren, und durch die Freisetzung von PDGF, IL-1, TNF- α und TGF- β bewirken sie die Proliferation glatter Muskelzellen.^{76,80} Neben Wachstumsfaktoren können auch Wachstumsinhibitoren sezerniert werden.⁸⁰

Eine weitere Funktion von Makrophagen liegt in der Verstärkung der Leukozyten-Rekrutierung in atherosklerotische Plaques über TNF- α und IL-1 sowie durch Sekretion von MCP-1.^{88,119} Die Auswanderung von Monozyten in die Gefäßwand wird unter anderem über M-CSF, GM-CSF, MCP-1 und oxLDL gesteuert.⁸⁰

Des Weiteren produzieren Makrophagen auch chemotaktisch wirksame Moleküle für glatte Muskelzellen (wie beispielsweise TGF- β und PDGF) und fördern ihre Einwanderung in die atherosklerotische Plaque.⁸⁰

Durch Sekretion dieser proinflammatorischen Mediatoren werden Makrophagen somit zum Hauptmediator von Zellmigration und -proliferation. Demzufolge stellt die Zahl, der Aktivierungszustand und die Lokalisation von Makrophagen einen bedeutenden Faktor dar, der bestimmt, ob eine Läsion weiter fortschreitet oder nicht.⁸⁰

Makrophagen fördern außerdem die Destabilisierung der fibrösen Schutzkappe und steigern damit das Risiko für eine Plaqueruptur. Dies wird hauptsächlich über die Sekretion Matrix Metalloproteinasen (MMPs) vermittelt, die die extrazelluläre Matrix degradieren.⁹⁰ MMPs werden im Kapitel 2.2 beschrieben.

Ein weiteres Charakteristikum von Makrophagen ist die Expression von *tissue factor* auf der Zelloberfläche. Dieser aktiviert nach Plaqueruptur die Koagulationskaskade und initiiert somit die Thrombusbildung.^{86,120} Die Expression von *tissue factor* auf Makrophagen kann durch T-Lymphozyten verstärkt werden. Letztere exprimieren CD154 (CD40L). Dieses bindet an CD40 auf der Oberfläche von Makrophagen und verstärkt so deren Expression von *tissue factor*.^{86,121}

1.5 Thrombozyten

1.5.1 Hämostase: Die physiologische Funktion von Thrombozyten

Die physiologische Funktion der Thrombozyten besteht darin, blutende Wunden durch Thrombusbildung zu verschließen.¹²² Kommt es durch traumatische Einwirkungen zu einer Verletzung der Gefäßwand, wird durch Thrombozyten die Hämostase eingeleitet.¹²³

Bei der primären Hämostase wird zuerst ein noch fragiler, weißer Thrombus gebildet. Die Plättchen heften sich zunächst an subendotheliale Strukturen an (Adhärenz) und lagern sich dann mit weiteren Thrombozyten zusammen (Aggregation). Bei der sekundären Hämostase wird die Gerinnungskaskade aktiviert und es wird ein roter Thrombus gebildet, der durch Fibrin stabilisiert wird. Dies ermöglicht schließlich die Wundheilung.¹²³

1.5.2 Zur Rolle der Thrombozyten in der Atherosklerose

Eine weitere Zellart, die neben Makrophagen eine bedeutende Rolle in der Initiation und Progression der Atherosklerose spielt, ist der Thrombozyt.^{9,14}

Die Interaktionen von Thrombozyten mit Endothelzellen und Leukozyten (siehe Abb. 11) können entzündliche und atherogene Prozesse an der Gefäßwand auslösen.¹²⁴ Ein wichtiger Aspekt in diesem Zusammenhang ist, dass Thrombozyten die Rekrutierung von Leukozyten in die Gefäßwand bewirken können.¹³ Die Mechanismen der daran beteiligten Zellinteraktionen umfassen dabei sowohl autokrine als auch parakrine Signalwege, sowie direkte Rezeptor-Interaktionen und führen zu einer sich gegenseitig verstärkenden Aktivierung der beteiligten Zellen.^{124,125}

Die Interaktionen von Thrombozyten mit Endothelzellen werden im Kapitel 1.5.4 beschrieben, diejenigen von Thrombozyten mit Leukozyten in Kapitel 1.5.5.

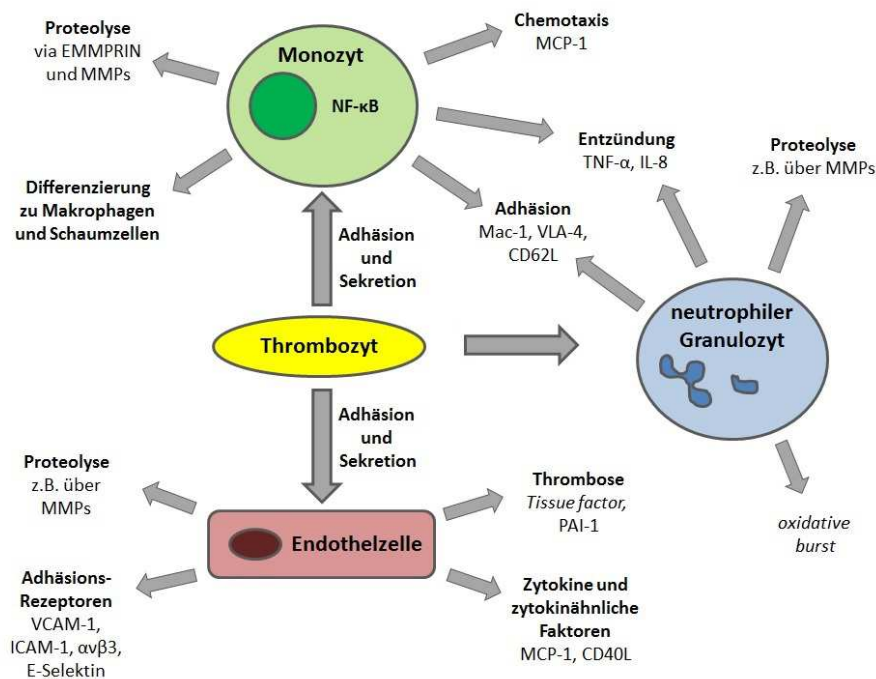


Abbildung 11: Interaktionsmöglichkeiten von Thrombozyten mit anderen Zellen während der Atherogenese (Abbildung modifiziert nach May et al. 2008 ¹²⁴)

Blutplättchen können entzündliche Prozesse bei Monozyten, neutrophilen Granulozyten oder Endothelzellen hervorrufen, die in der Folge wiederum Reaktionen wie Zelladhäsion, Chemotaxis und Zellmigration, Proteolyse, Thrombose und Zelldifferenzierung zu Makrophagen und Schaumzellen auslösen. Damit wird ein atherogenes Milieu in der Gefäßwand geschaffen, das die Plaquebildung begünstigt. VCAM-1 = *vascular cell adhesion molecule 1*, ICAM-1 = *intercellular cell adhesion molecule 1*, PAI-1 = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1, Mac1 = *macrophage-1 antigen*, VLA-4 = *very late antigen-4*, CD62L = L-Selektin, NF-κB = *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*, IL-8 = Interleukin 8;

Des Weiteren sind Thrombozyten in der Lage, die Proliferation glatter Muskelzellen zu stimulieren (über TGF-β, PDGF und Serotonin) sowie durch Sekretion von MMP-2 zum Abbau der extrazellulären Matrix beizutragen.¹²⁶

Auch bei der Plaqueruptur oder -erosion spielen Thrombozyten eine bedeutende Rolle, da sie nach ihrer Aktivierung eine Thrombusbildung und ischämische Krankheitsbilder auslösen können.¹²⁷ Diese Prozesse werden im Kapitel 1.5.3 beschrieben.

Obwohl Thrombozyten keinen Zellkern besitzen, sind sie trotzdem zu einer begrenzten Proteinsynthese fähig.^{124,128} Außerdem enthalten sie verschiedene Speichergranula (α-Granula, Lysosomen und dichte Granula) sowie ein komplexes Membransystem, wodurch sie in der Lage sind, eine Vielzahl von Stoffen wie Adhäsionsproteine (P-Selektin, vWF etc.), Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF-β), Chemokine (RANTES, SDF-1, PF4 etc.) sowie zytokinähnliche Faktoren (CD40L, IL1β etc.) zu speichern und bei Bedarf schnell freizusetzen.^{124,129} Durch diese Stoffe werden Prozesse wie zum Beispiel die Zelladhäsion und -aggregation, Chemotaxis, Zellproliferation, Gerinnung und Proteolyse gesteuert, die wiederum entzündliche Prozesse beschleunigen.¹²⁴

1.5.3 Zur Rolle der Thrombozyten in der Atherothrombose

Dieselben Prozesse wie bei der physiologischen Hämostase laufen auch nach der Ruptur einer atherosklerotischen Plaque ab.¹²⁷

Durch die Plaqueruptur wird die darunterliegende Bindegewebsmatrix freigelegt, wodurch die Thrombusbildung initiiert wird.¹²⁷ Die Adhäsion der Thrombozyten an die extrazelluläre Matrix wird dabei über Glykoproteine auf der Plättchenoberfläche vermittelt.¹²² Es kommt zu Interaktionen zwischen vWF und dem Glykoprotein Ib/IX/V (GPIb/IX/V) sowie Kollagen und dem Glykoprotein VI (GPVI).¹²⁷ Durch diese Bindung kommt es (wie in Abb. 12 rechts dargestellt) zur Aktivierung und Formveränderung der Thrombozyten mit der Ausbildung von Pseudopodien.^{122,123,126} Diese aktivierten Thrombozyten werden als Echinospherozyten bezeichnet.¹³⁰

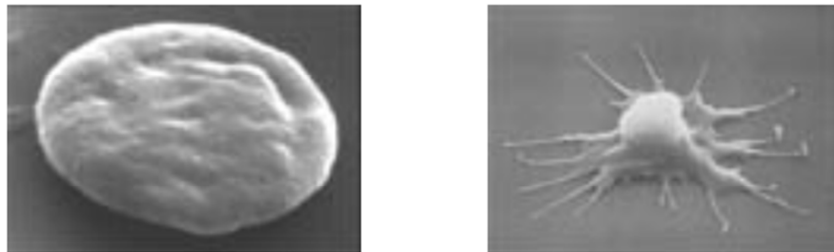


Abbildung 12: Vergleich der Morphologie eines ruhenden Thrombozyten (links) und eines aktivierten Thrombozyten (rechts) (Abbildung mit freundlicher Genehmigung des Platelet Research Laboratory, Barcelona, Spanien^{130b})

Links: elektronenmikroskopische Aufnahme eines ruhenden Thrombozyten mit diskoider Form (10.000fache Vergrößerung). **Rechts:** adhärenter Thrombozyt mit Formveränderung und Pseudopodien (3.000fache Vergrößerung).

Die Aktivierung führt zudem zu einer Konformationsänderung der Integrinrezeptoren $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa, Fibrinogenrezeptor) und $\alpha_2\beta_1$ (Kollagenrezeptor), die eine feste Bindung an die extrazelluläre Matrix vermitteln.^{126,131,132,133,134}

Außerdem kommt es zur Degranulation, was zur Verstärkung der Plättchenaktivierung führt und die Stabilisierung des Thrombus durch Fibrin einleitet.¹²³

Wie bereits beschrieben, kommt es durch diese Prozesse zu einer (Sub-)Okklusion des betreffenden Gefäßes (siehe Abb. 13) und möglichen Folgeerscheinungen wie dem akuten Myokardinfarkt, instabiler Angina pectoris und plötzlichem Herztod.^{16,27,49,102}

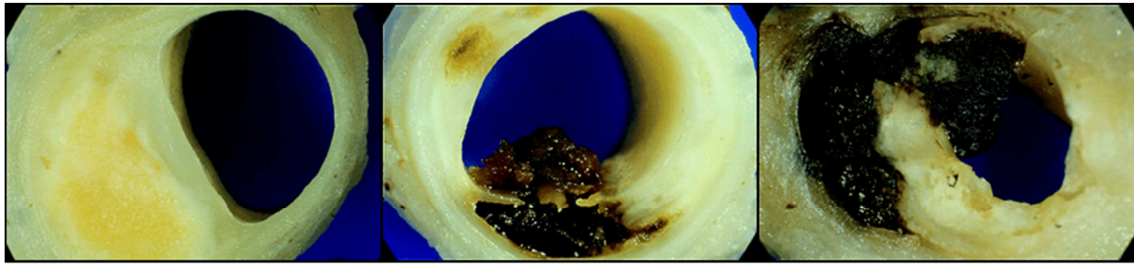


Abbildung 13: Atherosklerotische Plaque in drei verschiedenen Stadien (Abbildungen aus Davies 1996 ⁸⁴)

Links: atherosklerotische Plaque mit einem gelben Lipidkern und einer fibrösen Schutzkappe. **Mitte:** atherosklerotische Plaque mit rupturierter fibrous cap und einem Thrombus, der sich teils innerhalb der Plaque und teils im Gefäßlumen befindet. **Rechts:** Infarzierte Arterie nach Plaqueruptur an der Plaqueschulter mit einem großen Thrombus, der einen großen Anteil des Gefäßdurchmessers verlegt.

1.5.4 Interaktionen von Thrombozyten mit dysfunktionellem Endothel

Zusätzlich zur Interaktion von Thrombozyten mit subendothelialer Matrix können Thrombozyten auch an ein intaktes und aktiviertes und somit dysfunktionelles Endothel adhären.^{127,135} Entzündlich aktivierte Endothelzellen exprimieren Moleküle wie Fibronektin, ICAM-1, P-Selektin, E-Selektin, Integrin $\alpha_v\beta_3$ und vWF, die die Plättchenadhäsion fördern.¹³⁵⁻¹³⁷

Ähnlich wie bei Gefäßverletzungen wird die Adhäsion von Thrombozyten an intaktes Endothel durch einen mehrstufigen Prozess gesteuert, der die Kontaktaufnahme (*tethering*), das Rollen (*rolling*) und die feste Adhäsion (*adhesion*) beinhaltet (siehe Abb. 14).¹²⁶

Das Entlangrollen der Plättchen am Endothel wird durch Selektine vermittelt.^{126,138} P-Selektin wird nach inflammatorischer Aktivierung von Endothelzellen innerhalb von Sekunden auf der Zelloberfläche exprimiert.¹²⁶ Die Bindung der Thrombozyten an P-Selektin wird über PSGL-1 und den GP-Ib/IX/V-Rezeptor (von Willebrand-Rezeptor) vermittelt.^{139,140,141} GP-Ib/IX/V vermittelt also sowohl die Plättchenadhäsion an die subendotheliale Matrix als auch an intaktes Endothel.¹⁴⁰ Auch das auf Endothelzellen exprimierte E-Selektin erlaubt einen losen Kontakt mit den Blutplättchen.^{126,137}

Integrine vermitteln schließlich die feste Adhäsion von Thrombozyten.^{122,126} Dabei kommt es zu Interaktionen zwischen dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) und verschiedenen Brückenproteinen wie vWF, Fibronektin oder Fibrinogen, die dann an den Gegenrezeptor auf der Endothelzelle binden.¹³⁶ Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf der Oberfläche der Endothelzellen stellt einen gemeinsamen Rezeptor für alle Brückenproteine dar.^{136,143}

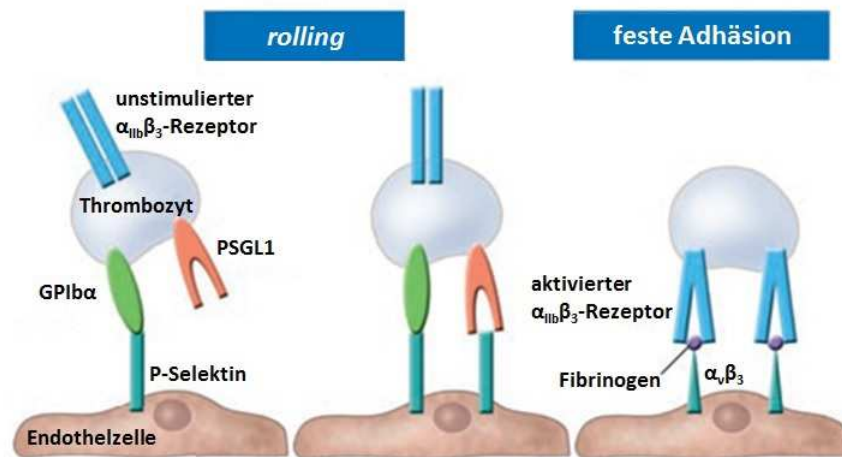


Abbildung 14: Interaktionen zwischen Thrombozyten und Endothelzellen in Form des *rolling* und der festen Adhäsion (Abbildung modifiziert nach Gawaz et al. 2005¹²⁶)

Aktivierte Endothelzellen exprimieren P-Selektin. Dieses interagiert mit GPIIb α und PSGL-1 auf der Thrombozytenoberfläche und vermittelt das *rolling* der Plättchen. Die feste Adhäsion wird durch Interaktion von $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_v\beta_3$ mit Fibrinogen als Brückenprotein vermittelt. PSGL-1 = P-Selektin Glykoprotein Ligand 1, $\alpha_{IIb}\beta_3$ = Glykoprotein IIb/IIIa, GPIIb α = Glykoprotein Iba α ;

In neueren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte GPVI als weiterer Rezeptor auf Thrombozyten identifiziert werden, der die Adhäsion von Thrombozyten an aktiviertes Endothel vermittelt.¹⁴³ GPVI ist als Hauptrezeptor für Kollagen auf Thrombozyten bekannt, der bei arteriellen Gefäßverletzungen die Aktivierung, Degranulation und somit die primäre Hämostase vermittelt.¹⁴³ Im Falle der Adhäsion an intaktes Endothel nutzt GPVI das Matrixprotein Vitronektin als Bindungspartner. Dieses wird von aktivierten Endothelzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (auf Endothelzellen diabetischer Mäuse mit atherosklerotischen Veränderungen) gebunden.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶

1.5.5 Interaktionen von Thrombozyten mit Leukozyten

Thrombozyten begünstigen die Anheftung von Leukozyten ans Gefäßendothel.^{124,126} Dies bewerkstelligen sie auf verschiedene Arten: Erstens durch die Bildung von Koaggregaten mit Leukozyten. Dabei unterstützen sie die Bindung an die Gefäßwand einerseits dadurch, dass sie Adhäsionsrezeptoren auf den Leukozyten aktivieren, andererseits können sie als Brückenglied zwischen Leukozyten und Endothelzellen fungieren.¹²⁴

Zweitens können sie nach Adhäsion am Endothel Leukozyten chemotaktisch anlocken und gleichzeitig ihre Adhäsion durch Ausbildung einer „klebrigen Oberfläche“ begünstigen.¹²⁴ Dabei kommt es durch Bindung von PSGL-1 auf Leukozyten und P-Selektin auf Thrombozyten zunächst zum *rolling* der Leukozyten.^{147,148} Anschließend wird über die Bindung von monozytärem Mac-1 (*Macrophage-1 antigen*, CD11b/CD18) an thrombozytäres GPIIb α und/oder anderen Rezeptoren der Plättchenoberfläche wie *junctional adhesion molecule 3* (JAM-3), *intercellular adhesion molecule 2* (ICAM-2) oder Brückenproteinen wie Fibrinogen (welches an GPIIb/IIIa bindet) oder Kininogen (das

II SCHRIFTTUM

an GPIIb α bindet), die feste Adhäsion vermittelt.¹⁴⁹⁻¹⁵⁴ Leukozyten binden dabei bevorzugt an Thrombozyten, da die Dichte von P-Selektin auf aktivierten Plättchen höher ist als auf Endothelzellen.¹³⁵

Drittens verändern Thrombozyten durch die bei der Degranulation freigesetzten Mediatoren die Eigenschaften von Endothelzellen in der Art, dass die Chemotaxis, Adhäsion und Transmigration von Monozyten unterstützt wird.¹²⁶ Eine wichtige Rolle spielt hier das von Thrombozyten sezernierte Zytokin IL-1 β , das die Expression von ICAM-1 und $\alpha_v\beta_3$ auf Endothelzellen verstärkt, was in der Folge zu einer gesteigerten Adhäsion von Monozyten führt.^{126,155} Außerdem verstärkt es die Sekretion von MCP-1 durch Endothelzellen und trägt so zur Leukozytenrekrutierung bei.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ Ein weiterer wichtiger Mediator, der zu Freisetzung von Chemokinen und zur Expression von Adhäsionsmolekülen führt, ist CD40-Ligand (CD40L, CD154). Durch Bindung an CD40 auf der Endothelzelloberfläche vermittelt er eine gesteigerte endotheliale Interleukin-8 (IL-8)- und MCP-1-Sekretion und verstärkt die Expression von E-Selektin-, VCAM-1- und ICAM-1 sowie die Expression von *tissue factor* durch Endothelzellen.^{158,159}

Überdies wird die Chemotaxis von Leukozyten durch Mediatoren wie *platelet-activating factor* (PAF) und *macrophage inflammatory protein-1 α* (MIP-1 α) gefördert.¹²⁶

Abbildung 15 gibt einen schematischen Überblick über die für die Atherogenese relevanten Interaktionen zwischen Thrombozyten und Monozyten.

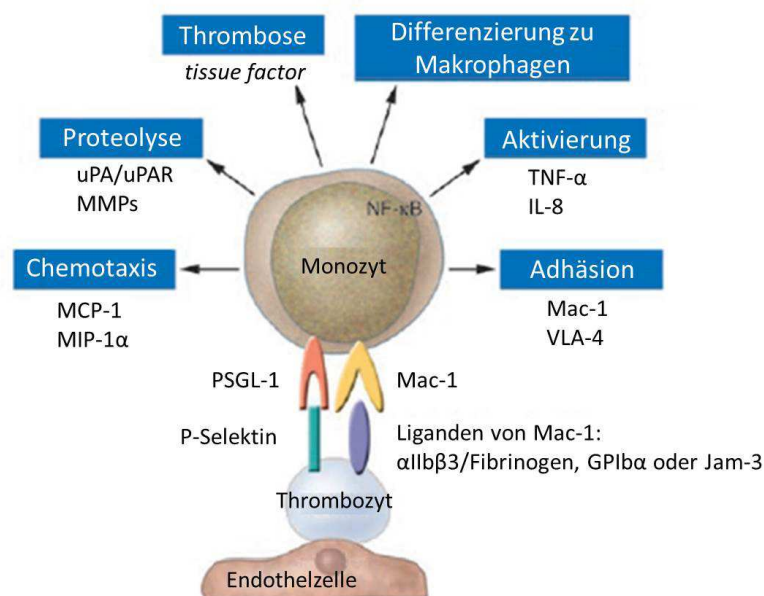


Abbildung 15: Am Endothel adhärierende Thrombozyten rekrutieren und aktivieren Monozyten (Abbildung modifiziert nach Gawaz et al. 2005¹²⁶)

Adhärenente Thrombozyten interagieren mit Monozyten vornehmlich über PSGL-1/P-Selektin-Bindung bzw. über Mac-1/ GPIIb bzw. Mac-1/ α IIb β 3 (plus Fibrinogen-Brücke). Dabei lösen sie bei Monozyten die Sekretion von Chemokinen, Cytokinen und prokoagulatorischem *tissue factor* aus, verstärken die Expression von Adhäsionsmolekülen und Proteasen und induzieren die Differenzierung zu Makrophagen. Dies schafft ein atherogenes Milieu und fördert die Plaqueprogression.

2 Matrix Metalloproteinasen (MMPs)

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) bilden eine Familie von Zink (Zn^{2+})- und Kalzium (Ca^{2+})-abhängigen Endopeptidasen, die in der Lage sind, die Bestandteile der extrazellulären Matrix abzubauen.^{160,161} Sie werden von vielen unterschiedlichen Zelltypen sezerniert und sind sowohl an physiologischen Gewebeumbauprozessen wie beispielsweise der Organentwicklung oder Wundheilung, als auch an pathologischen Gewebeumbauprozessen wie der Metastasierung von Tumoren, an entzündlichen Prozessen sowie an kardiovaskulären Krankheitsprozessen wie der Destabilisierung atherosklerotischer Plaques beteiligt.^{162,163} Mit Ausnahme von 6 membranständigen Vertretern werden alle anderen MMPs zunächst als Präproenzyme synthetisiert und nach ihrer Synthese im endoplasmatischen Retikulum als inaktive pro-MMPs konstitutiv in die extrazelluläre Matrix sezerniert.^{164,165}

2.1 Struktur der MMPs

Alle MMPs bestehen aus homologen Sequenz-Abschnitten, wodurch sie eine relativ konservierte Struktur besitzen (siehe Abb. 16).^{165,166}

Am aminoterminalen Ende befindet sich zuerst das sogenannte Signalpeptid (Prä-Domäne), das für die Sekretion des Enzyms von Bedeutung ist.^{165,167} Demnach sind die meisten MMPs sezernierte Proteine. Es finden sich allerdings auch einige membranständige Vertreter.¹⁶⁵

Im Anschluss daran befindet sich die ca. 80 Aminosäuren lange Propeptid-Domäne (oder Pro-Domäne), die bis zu ihrer Entfernung die Inaktivität des Enzyms gewährleistet.^{165,167} Sie wird bei der Aktivierung des Enzyms abgespalten.¹⁶⁷

Die katalytische Domäne ist für die proteolytische Aktivität des Enzyms verantwortlich.¹⁶⁷ Sie ist ca. 170 Aminosäuren lang und enthält ein Zink-Bindungsmotiv, ein Zink-Ion, sowie 2 bis 3 Calcium-Ionen, die zur Stabilität und Enzymaktivität benötigt werden.¹⁶⁴ Die Matrix Metalloproteinasen 2 und 9 besitzen zusätzlich drei zystinreiche Inserts, die zur Bindung und Spaltung von Kollagen und Elastin benötigt werden.^{168,169}

Bis auf MMP-7, MMP-23 und MMP-26 besitzen alle anderen MMPs noch eine Hämapexin-ähnliche Domäne, die mit der katalytischen Domäne über eine *hinge*- oder *linker*-Region verbunden ist.^{165,170} Die Hämapexin-ähnliche Domäne nimmt Einfluss auf die Bindung der TIMPs (*tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*, Inhibitoren der MMPs), die Substratbindung und auf proteolytische Eigenschaften.^{165,171} Die *hinge*-Region variiert zwischen den verschiedenen MMPs in ihrer Länge und Zusammensetzung und beeinflusst ebenfalls die Substratspezifität der MMPs.¹⁷²

Die membranständigen MMPs haben an ihrem carboxyterminalen Ende zusätzlich noch eine transmembranöse Domäne.¹⁶⁷

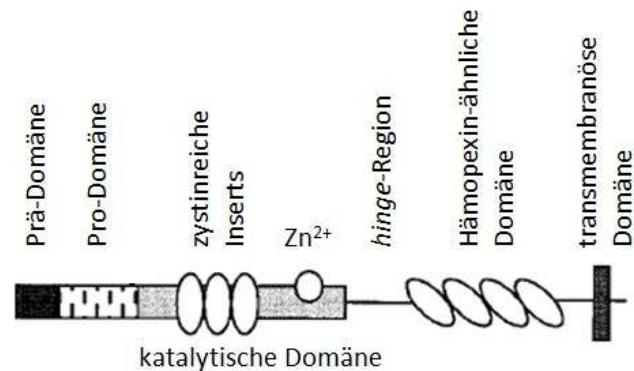


Abbildung 16: Grundstruktur der MMPs (Abbildung modifiziert nach Westermarck und Kähäri 1999¹⁷³)

Am aminoterminalen Ende findet sich zunächst das Signalpeptid bzw. die Prä-Domäne, danach folgt die Propeptid- bzw. Pro-Domäne. Im Anschluss daran findet sich die katalytische Domäne mit dem gebundenen Zink-Ion und den bei MMP-2 und -9 vorkommenden zystinreichen Inserts. Carboxyterminal davon findet sich die *hinge-* oder *linker-*Region, die die katalytische Domäne mit der Hämopepin-ähnlichen Domäne verbindet. Bei den membranständigen MMPs folgt schließlich die Transmembrandomäne.

2.2 Einteilung der MMPs

In Abhängigkeit von ihrer Struktur und Substratspezifität werden die MMPs in weitere Untergruppen unterteilt: die Kollagenasen (MMP-1, -8, -13 und -18), die Gelatinasen (MMP-2 und -9), die Stromelysine (MMP-3, -10 und -11) und membranständige MMPs (MMP-14, -15, -16, -17, -24 und -25).^{163,167,173}

Außerdem gibt es noch 7 weitere MMPs, die sich nicht in die oben genannten Gruppen einordnen lassen. Bei ihnen handelt es sich um MMP-7, -12, -19, -20, -21, -23 und -28.¹⁶³

Die für die Atherosklerose relevanten MMPs sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

II SCHRIFTTUM

Tabelle 1: Matrix Metalloproteinasen in atherosklerotisch veränderten Gefäßabschnitten (nach Dollery et al. 1995¹⁶⁰, Shah 1998²⁸, Westermarck und Kähäri 1999¹⁷³, Creemers et al. 2001¹⁶⁷, Galis und Khatri 2002¹⁶¹ und Visse und Nagase 2003¹⁶³)

Beschreibung von Gruppenzugehörigkeit, Substratspezifität, Stimuli und Vorkommen von MMPs in Zellen der atherosklerotischen Plaque. Molekulargewicht: Gewicht der enzymatisch aktiven Form in Klammern angegeben. kDa = Kilodalton, SMC = glatte Muskelzellen, oxLDL = oxidiertes LDL, eLDL = enzymatisch verändertes LDL.

MMP	Trivialname	Untergruppe	Mol.-gew. (kDa)	Substrate	Stimulus für Freisetzung	Vorkommen in
MMP-1	Kollagenase 1, interstitielle Kollagenase	Kollagenasen	52 (41)	Kollagen Typ I, II, III, V, VII, VIII und X, Aggrecan, Serpine, α_2 -Makroglobulin	IL-1, TNF- α , Hypercholesterinämie	Monozyten, Makrophagen, Schaumzellen, SMCs, Endothelzellen
MMP-2	Gelatinase A	Gelatinasen	72 (67)	Gelatine, Kollagen Typ I, II, III, IV, V, VII und X, Elastin, Fibronectin, Laminin, Nidogen aktiviert proMMP-9 und -13	IL-1, TNF- α , Thrombin	Monozyten, Makrophagen, Schaumzellen, SMCs, Endothelzellen
MMP-3	Stromelysin 1	Stromelysine	57 (45)	Proteoglykane, Laminine, Fibronectin, Vitronectin, Nidogen und Kollagen Typ IV, V, IX, X Aktiviert einige proMMPs	IL-1, TNF- α , Plasmin, Mastzelldegranulation, Hypercholesterinämie	Makrophagen, Schaumzellen, SMCs
MMP-7	Matrilysin 1	Matri-lysine	28 (19)	Gelatine, Elastin, Laminin, Fibronectin, Versikan (Proteoglykan), Kollagen Typ IV	Hypercholesterinämie	Makrophagen, Schaumzellen
MMP-9	Gelatinase B	Gelatinasen	92 (82)	Gelatine, Laminin, Nidogen, Kollagen Typ I, II, III, IV, V, VII und X	oxLDL, eLDL, Scherkräfte	Monozyten, Makrophagen, Schaumzellen, SMCs
MMP-12	Metallo-elastase	andere MMPs	57 (45)	Elastin und diverse andere Proteine	Plasmin	Makrophagen
MMP-14	MT1-MMP	Membranständige MMPs	66	Kollagen Typ I, II und III, Gelatine, Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Aggrecan Aktivierung von Pro-MMP-2	IL-1, TNF- α , oxLDL, eLDL	Makrophagen, SMCs, Endothelzellen

2.3 Regulation der MMP-Aktivität

Die Regulation der MMP-Aktivität geschieht auf unterschiedlichen Wegen. Erstens auf Transkriptionsebene bei der de novo-Synthese der MMPs, zweitens durch die Aktivierung inaktiver Proenzyme (Zymogene) und drittens durch die Hemmung der MMP-Aktivität durch physiologischerweise exprimierte Inhibitoren der MMPs, den sogenannten TIMPs – *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*.¹⁷⁴

2.4 MMPs in der Atherosklerose

MMPs nehmen in der gesamten Entstehung der Atherosklerose eine wichtige Rolle ein, indem sie die Umbauvorgänge in den Blutgefäßen ermöglichen.^{160,161}

Entzündungszellen stellen eine wichtige Quelle für MMPs dar. Darüber hinaus können auch Zellen der Gefäßwand durch Entzündungszellen, wie beispielsweise Makrophagen, zur Produktion von MMPs angeregt werden.^{161,175}

Die Einwanderung von Leukozyten in die Intima als einleitender Schritt bei der Atherogenese, wird durch MMPs begünstigt. Dabei wird die Migration der Monozyten durch MMP-9 vermittelt, diejenige der T-Zellen durch MMP-2.^{176,177} Auch im späteren Verlauf, z.B. für die Einwanderung glatter Muskelzellen aus der *Tunica muscularis* in den Subintimalraum, spielen MMPs eine wichtige Rolle.¹⁷⁸

Weiterhin können auch T-Lymphozyten einen Einfluss auf die Expression von MMPs und den Abbau der fibrösen Schutzkappe nehmen. So kann die Expression von MMP-1 und -3 durch Makrophagen über eine Bindung von CD40L auf T-Zellen mit CD40 auf Makrophagen gesteigert werden.⁸⁶

Neben Entzündungszellen und glatten Muskelzellen können auch Thrombozyten eine regulierende Funktion für MMPs in der Atherosklerose einnehmen. Durch die Adhäsion der Thrombozyten an Endothelzellen (HUVECs) wird die endotheliale Expression von MT1-MMP, MMP-1, -2 und -9 gesteigert. Dieser Prozess wird über CD40 vermittelt.¹⁷⁹ Außerdem sind Thrombozyten über die Sekretion von MMP-2 selbst in der Lage, zum Abbau der extrazellulären Matrix beizutragen.¹²⁶

Die extrazelluläre Matrix atherosklerotischer Plaques besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I und III und zu geringeren Anteilen aus Elastin und Proteoglykanen.⁵ Insbesondere Kollagen Typ I ist eines der am häufigsten vorkommenden Proteine in der fibrösen Schutzkappe der Plaque.¹⁸⁰ Durch die Bindung von Monozyten an Kollagen Typ I wird die Transkription und Sekretion von MMP-9 stimuliert.¹⁸¹ Dieser Vorgang kann durch eine gemeinsame Inkubation mit Thrombozyten noch deutlich verstärkt werden.¹⁸⁰ Thrombozyten beeinflussen neben der MMP-Expression von Endothelzellen also auch die MMP-Aktivität bei Monozyten. Diese Zusammenhänge könnten die Überexpression von MMP-9 in vulnerablen Regionen atherosklerotischer Plaques erklären.^{180,182}

Auch an der Entstehung vulnerabler Plaques sind MMPs maßgeblich mitbeteiligt, indem sie nach Sekretion durch Makrophagen den Kollagenabbau in der fibrösen Schutzkappe vermitteln.²⁴ Das

II SCHRIFTTUM

MMP-Spektrum aktivierter Makrophagen umfasst MMP-1, -2, -3, -8, -9 und -14.^{119,183} Makrophagen sezernieren außerdem Zytokine, die Gefäßzellen zur MMP-Produktion anregen.¹⁶¹

Durch intrazelluläre Ansammlung von Lipiden, wie sie für Schaumzellen in atherosklerotischen Plaques charakteristisch ist, kommt es zu einer gesteigerten MMP-Expression durch diese Zellen.^{25,184} Die in instabilen Plaques charakteristischerweise vorkommenden Schaumzellen sind die Hauptproduzenten der MMPs-1, -2, -3, -7 und -9.^{25,161,182,185} Außerdem produzieren sie MMP-14.¹⁶¹ Insbesondere MMP-2, MMP-9 und MMP-14 werden mit der Entstehung vulnerabler, rupturgefährdeter Plaques in Verbindung gebracht.^{23,186,187} Die Freisetzung von MMP-1 und MMP-3 aus Schaumzellen erfolgt, ohne dass hierfür ein weiterer Stimulus nötig ist.²⁵

Auch reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies (wie z.B. NO^- und O^{2-}), die zu oxidativem Stress führen, können die Umbauvorgänge der Gefäßwand modulieren.¹⁶¹ Dabei wird das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs so verschoben, dass es zu einem gesteigerten Abbau der extrazellulären Matrix kommt.¹⁶¹ Auch für H_2O_2 konnte eine MMP-regulierende Wirkung nachgewiesen werden.¹⁸⁸ Die Ansammlung von Schaumzellen in der Plaque steigert die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, wodurch es zu einer weiteren Aktivierung inaktiver MMPs in der Gefäßwand kommen kann.^{161,188} Auch Mastzellen in der Schulterregion der Plaque können bei ihrer Degranulation zu einer ROS-vermittelten Aktivierung von MMPs beitragen.⁷⁰ Darüber hinaus kann auch eine Hypercholesterinämie über oxidativen Stress zu einer exzessiven Umstrukturierung der Gefäßwand führen.¹⁶¹

Neben oxidativem Stress sind auch mechanische Scherkräfte, die am Endothel angreifen, an der Regulation der MMPs beteiligt.^{174,189} Außerdem kommt es durch erhöhten transmuralen Druck zu einer gesteigerten Expression von MMP-2 und -9, was die Schlussfolgerung zulässt, dass MMPs auch an den initialen, durch Hypertension hervorgerufenen Umbauprozessen beteiligt sind.¹⁹⁰ Darüber hinaus führt auch eine Hyperlipidämie zu einer gesteigerten MMP-Expression in atheromatösen Läsionen.¹⁹¹

Diese Zusammenhänge erklären, weshalb die Inzidenz von akuten Koronarsyndromen durch Gabe von Lipidsenkern, Antioxidantien, β -Adrenorezeptorblockern und ACE-Hemmern reduziert werden kann.^{185,192-198} Dabei dürfte die Plaquestabilisierung durch eine direkte bzw. indirekte Hemmung der MMP-Aktivität in der vulnerablen Plaque ein wichtiger pathophysiologischer Mechanismus sein.^{25,174,184,191}

Die Rolle der MMPs in der Atherosklerose ist in Abbildung 17 schematisch dargestellt.

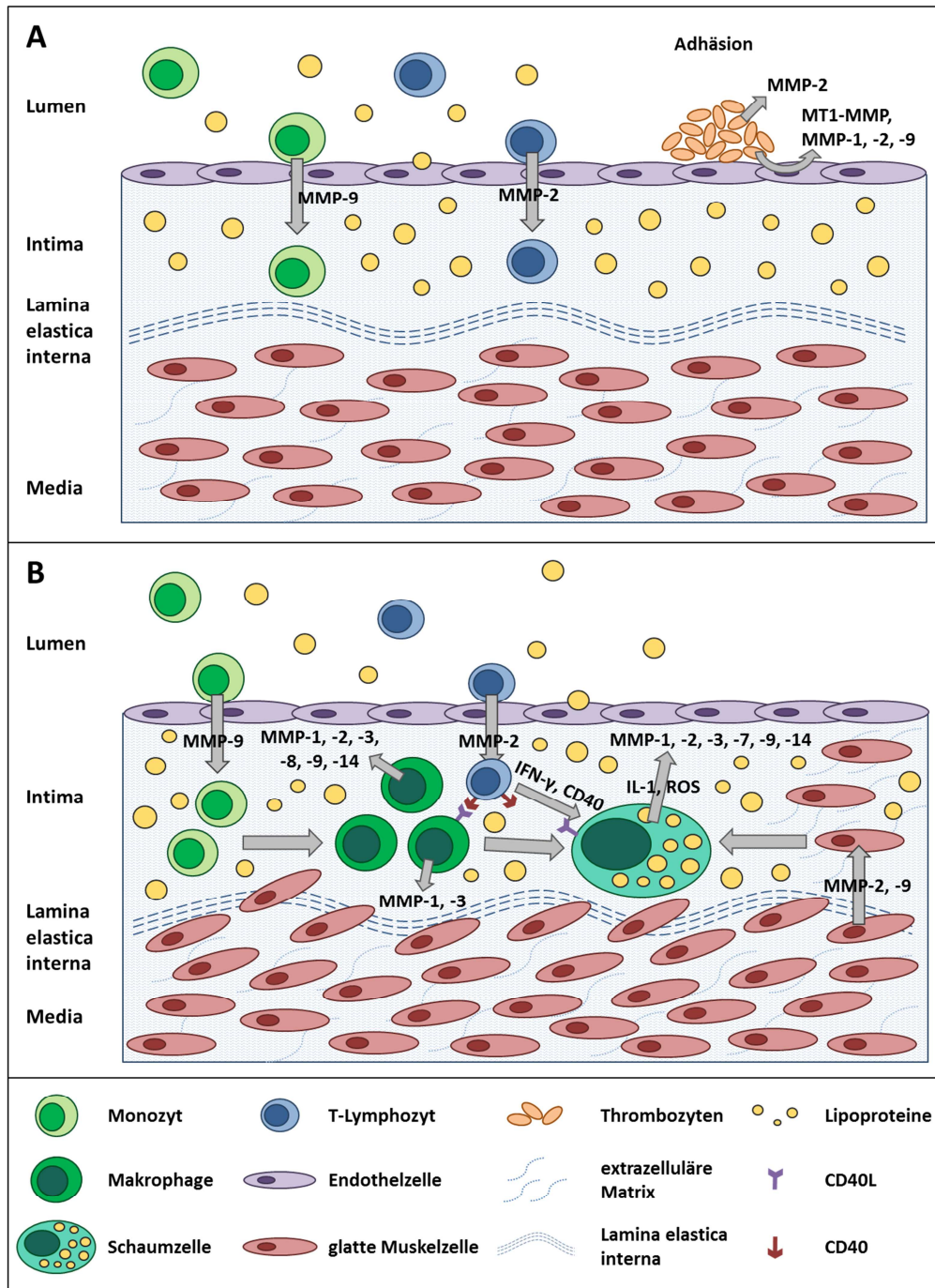


Abbildung 17: Zur Rolle der MMPs in der Atherosklerose (Abbildung modifiziert nach Galis und Khatri 2002¹⁶¹)

Zellen der Gefäßwand produzieren und sezernieren MMPs. In atherosklerotischen Läsionen ist die Expression von MMPs verstärkt und das Spektrum der MMPs ist durch das Vorhandensein von Entzündungszellen, löslichen Faktoren, Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen breit gefächert. Letztlich schwächen MMPs die Arterienwand und tragen somit zur Destabilisierung und Ruptur der Plaque bei.

A) Zunächst kommt es zur Einlagerung von Lipoproteinen in der Intima sowie zur MMP-vermittelten Einwanderung von Monozyten und T-Lymphozyten. Die Adhäsion von Thrombozyten fördert die endotheliale MMP-Sekretion. **B)** Im Rahmen der Plaqueprogression kommt es zur Einwanderung von glatten Muskelzellen aus der Media und zur Differenzierung von Monozyten und glatten Muskelzellen zu Schaumzellen. T-Zellen regen Makrophagen und Schaumzellen über die Bindung von CD40L und CD40 zur weiteren MMP-Produktion an. ROS = reaktive Sauerstoffspezies;

3 Der *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer* (CD147, EMMPRIN)

Die Erstbeschreibung des Glykoproteins CD147 (EMMPRIN) fand im Jahr 1982 durch Biswas statt.¹⁹⁹ Es wurde damals zunächst als ein von Tumorzellen sezernierter Faktor beschrieben, der umliegende Fibroblasten zur Produktion von Kollagenase anregt und daher als *tumor cell-derived collagenase stimulatory factor* (TCSF) bezeichnet.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Später konnte nachgewiesen werden, dass es neben der Kollagenase MMP-1 auch die Expression von MMP-3 und MMP-2 stimulieren kann.^{202,203} Dies führte zur Umbenennung des Proteins in *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer* (EMMPRIN), um seine Rolle bei der Induktion von MMPs hervorzuheben.²⁰⁴ Inzwischen weiß man, dass es neben MMP-1, -2 und -3 auch an der Stimulierung und Aktivierung weiterer MMPs wie beispielsweise MMP-14 und MMP-15 sowie MMP-9 beteiligt ist.²⁰⁵⁻²⁰⁹

CD147 (EMMPRIN) ist ein ubiquitär exprimiertes Protein.²¹⁰ Abgesehen von seinem Vorkommen bei diversen neoplastischen Zellarten, wird es von vielen weiteren Zellarten exprimiert.²¹¹ Neben seiner Expression im Endometrium und auf glatten Muskelzellen, wird es auch auf epithelialen, endothelialen und hämatopoetischen Zellen sowie in Leukozyten in variierenden Mengen exprimiert.²¹²⁻²¹⁶ Auf Monozyten wird es konstitutiv exprimiert. Seine Expression auf Granulozyten und Lymphozyten hingegen ist abhängig von deren Aktivierungszustand.²¹⁷

Neben seiner Funktion als *MMP-Inducer*, spielt CD147 (EMMPRIN) eine bedeutende Rolle bei einer Reihe von physiologischen und pathologischen Prozessen.²¹⁸ So übt es zum Beispiel eine wichtige Funktion bei der embryonalen Entwicklung, der Reproduktion (Spermatogenese und Implantation) und der neuronalen Entwicklung aus, und ist bei räumlichen Lernprozessen und Gedächtnisfunktionen beteiligt.²¹⁹⁻²²⁴ Über die Induktion von MMPs nimmt es auch Einfluss auf die Metastasierung von Tumoren.²²⁵ Es ist außerdem bei einer Reihe von pathologischen Prozessen wie der rheumatoiden Arthritis, dem Eintritt von Viren in Wirtszellen sowie bei kardiovaskulären Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt, der Herzinsuffizienz und der Atherosklerose involviert und wird dabei verstärkt exprimiert.^{209,227-232}

Wie in Abbildung 18 schematisch dargestellt, handelt es sich bei CD147 (EMMPRIN) um ein 248 Aminosäuren langes, integrales Membranprotein (Typ I), das abhängig vom Grad seiner Glykosylierung am aminoterminalen Ende eine molekulare Masse zwischen 45 und 65kDa besitzt.^{204,233} Es wird der Familie der Immunglobuline zugeordnet, die an Interaktionen zwischen Zelloberflächen und an der immunologischen Erkennung beteiligt sind.^{204,212,217,234}

Es besteht aus einer 185 Aminosäuren langen extrazellulären Domäne, einer 24 Aminosäuren langen transmembranösen und einer 39 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Domäne.²⁰⁴ Der aminoterminalen, extrazellulären Teil von CD147 (EMMPRIN) besteht aus zwei immunglobulinartigen Regionen, die stark glykosyliert sind.²³⁵⁻²³⁹ Die transmembranöse Domäne besteht aus einer Abfolge von hydrophoben Aminosäuren und ist zwischen den verschiedenen Tierarten beinahe vollständig konserviert.^{218,234,240} Die zytoplasmatische Domäne ist nur moderat konserviert.²⁴⁰

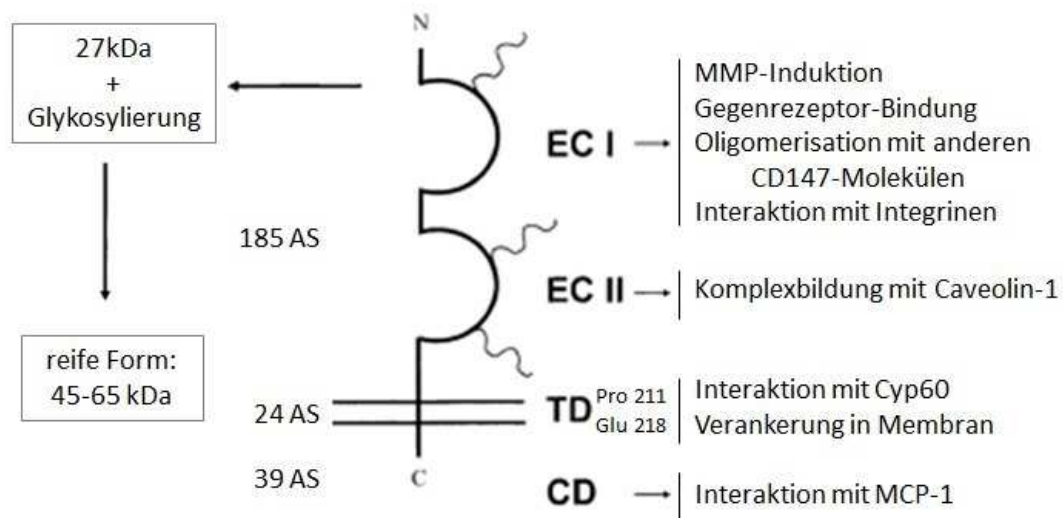


Abbildung 18: Struktur des Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (CD147, EMMPRIN) (Abbildung modifiziert nach Nabeshima et al. 2006²³³)

EC I und EC II stellen die erste und zweite extrazelluläre Immunglobulin-Domäne dar, TD die transmembranöse Domäne, CD die zyttoplasmatische Domäne. EC I ist an der Induktion von MMPs, der homophilen Bindung von CD147 (EMMPRIN) in cis- und trans-Stellung und der Interaktion mit Integrinen beteiligt. EC II ist verantwortlich für die Bindung von Caveolin-1, TD für die Bindung von CyP60 und CD für die Bindung von MCT-1 (Monocarboxylat Transporter 1). AS = Aminosäuren;

Das Gen, das für CD147 (EMMPRIN) kodiert, wird als BSG bezeichnet und findet sich beim Menschen auf Chromosom 19.²⁴¹

4 Cyclophiline

Cyclophiline stellen eine Familie von Proteinen dar, die in den Zellen von Säugetieren, Pflanzen, Insekten, Pilzen und Bakterien vorkommen.³⁴ Im menschlichen Genom wurden bisher 17 verschiedene Cyclophiline identifiziert.^{35,242} *Drosophila* besitzt mindestens 9 verschiedene, die Pflanze *Arabidopsis thaliana* 29 vermeintliche Cyclophiline und bei *Saccharomyces cerevisiae* konnten 8 Cyclophiline nachgewiesen werden.²⁴³⁻²⁴⁵

Die beiden häufigsten Vertreter beim Menschen sind Cyclophilin A (CyPA) und Cyclophilin B (CyPB).²⁴⁶ CyPB konnte in vielen unterschiedlichen Blutzellen (außer Erythrozyten) mit durchschnittlich 250ng/mg Gesamtprotein nachgewiesen werden und kann im Blut in physiologischen Konzentrationen von 2,4-3,1nM vorkommen.^{247,248}

4.1 Struktur und Vorkommen der Cyclophiline

Die Struktur der Cyclophiline wurde während der Evolution stark konserviert. Alle Isoformen zeigen eine Sequenz-Homologie von über 50%.²⁴⁹

Alle Cyclophiline weisen eine gemeinsame, etwa 109 Aminosäuren lange Domäne auf, die als *Cyclophilin-like domain* (CLD) bezeichnet wird. Sie wird von Domänen umgeben, die für die jeweiligen Cyclophiline spezifisch sind und sowohl mit ihrer Funktion als auch mit ihrer Zuordnung zu bestimmten subzellulären Kompartimenten assoziiert sind.³⁴

CyPA und CyPB stimmen zu 65% in ihrer Aminosäurenabfolge überein.²⁵⁰ CyPA ist ein 18 kDa großes Protein.²⁵¹ Es besteht aus einer fassartigen, achtsträngigen, antiparallel verlaufenden β -Faltblatt-Struktur, die an beiden Kopfenden von je einer α -Helix umgeben ist. Im Inneren des Fasses bilden hydrophobe Seitenketten (zum Teil aromatische Ringe) einen hydrophoben Kern, der die Bindungsstelle für Cyclosporin A darstellt.^{252,253} Bei CyPB handelt es sich um ein 21 kDa großes Protein.²⁴⁷ Der Aufbau von CyPB ähnelt stark dem von CyPA (siehe Abb. 19). Die Hauptunterschiede zu CyPA finden sich in zwei Schleifen-Regionen, die durch die Seitenketten der Aminosäuren 19-24 und 152-164 gebildet werden, sowie am amino- und carboxyterminalen Ende.^{33,34}

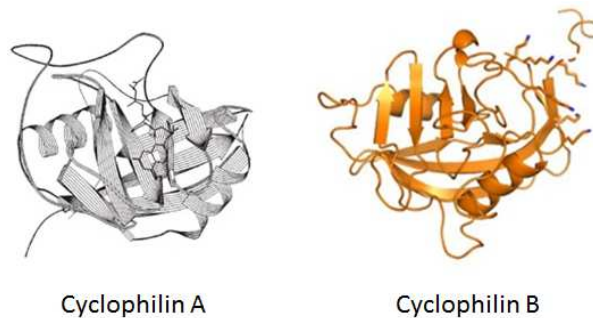


Abbildung 19: Gegenüberstellung der Struktur von CyPA (Kallen et al. 1991^{253a}) und CyPB (modifiziert nach Kozlov et al. 2010^{253b})

CyPB wird durch eine abtrennbare Signalsequenz am aminoterminalen Ende dem endoplasmatischen Retikulum zugeführt.^{254,255} Ein zusätzliches, c-terminales Aminosäuremotiv bewirkt, dass es dort zurückgehalten wird.²⁵⁶ Infolge seines Vorkommens im endoplasmatischen Retikulum weist es im Zytoplasma ein netzartiges, diskontinuierliches Verteilungsmuster auf.²⁵⁷ Ein kleiner Anteil des CyPB konnte intrazytoplasmatisch auf der Außenseite des endoplasmatischen Retikulums nachgewiesen werden.²⁵⁸ Außerdem findet es sich auch extrazellulär.²⁵⁹ Seine Hauptlokalisation befindet sich jedoch im Zellkern, wobei die Bereiche des Nucleolus ausgespart sind.²⁵⁷

Andere Isoformen finden sich beispielsweise im Zytoplasma, den Mitochondrien oder dem Zellkern.³⁴ So kommen CyPA und CyP40 bei Säugetieren im Zytoplasma vor.³⁴ CyPNK, das größte Cyclophilin mit einem großen, hydrophilen, positiv geladenen carboxyterminalen Ende, befindet sich ebenfalls im Zytoplasma.^{260,261} CyPC besitzt ebenso wie CyPB eine Aminosäuresequenz, die es dem endoplasmatischen Retikulum zuführt.²⁵⁵ CyPD besitzt eine Signalsequenz, die es zu den Mitochondrien dirigiert.²⁶²⁻²⁶⁴ CyPE besitzt eine aminoterminal RNA-Bindungsregion und findet sich im Zellkern.²⁶⁵

4.2 Cyclophiline und Cyclosporin A

Ein Merkmal, das die meisten Cyclophiline gemeinsam haben, ist ihre Affinität zu der immunsupprimierenden Substanz Cyclosporin A (CsA). Dabei unterscheiden sich die Isoformen in ihrer Bindungsaffinität zu Cyclosporin A.²⁶⁶ Cyclophilin-Isoformen, die keine Affinität zu Cyclosporin A aufweisen, sind PPIL2 (*peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 2*, CyP60), PPIL6 (*peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like6*), RANBP2 (*RAN binding protein 2*) und SDCCAG-10 (*serologically defined colon cancer antigen 10*).²⁴²

CyPA und CyPB stellen die beiden wichtigsten Bindungsproteine für Cyclosporin A dar.²⁴⁷ Dabei zeigt CyPB eine zehnmal höhere Affinität zu Cyclosporin A als CyPA.²⁶⁷

Die Bindung von Cyclosporin A an Cyclophiline (siehe Abb. 20) führt zur Bildung von Komplexen, die die Phosphataseaktivität von Calcineurin hemmen.²⁶⁸ Dadurch wird die Transkription von Genen, die Cytokine wie beispielsweise IL-2 kodieren, in T-Lymphozyten verhindert und eine immunsupprimierende Wirkung erzielt.^{268,269}

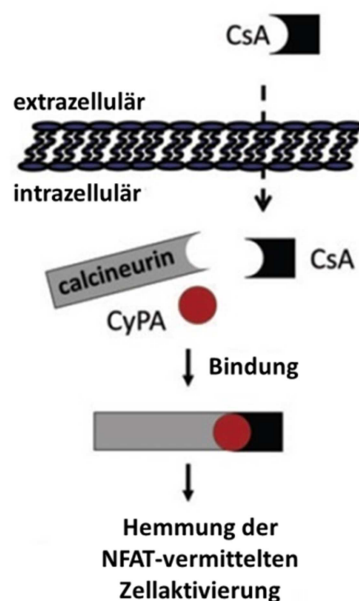


Abbildung 20: Immunsupprimierende Wirkung des intrazellulären CyPA-CsA-Komplexes (Abbildung modifiziert nach Seizer et al. 2014³²)

Das im Rahmen einer medikamentösen Therapie angewandte Cyclosporin A penetriert die Zellmembran und bindet intrazellulär an CyPA. Der CyPA-CsA-Komplex wiederum bindet an Calcineurin und hemmt seinerseits die Calcineurin-vermittelte NFAT-Aktivierung in T-Zellen. CsA = Cyclosporin A; NFAT = *nuclear factor of activated T-cells*;

4.3 Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase-Aktivität der Cyclophiline

Ein weiteres gemeinsames Merkmal der meisten Cyclophiline ist ihre enzymatische Wirkung als Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPlasen). Sie katalysieren die Umwandlung von trans- und cis-Isomeren von Peptid-Bindungen, an denen die Aminosäure Prolin beteiligt ist (siehe Abb. 21).²⁵¹ Allerdings gibt es auch in dieser Gruppe Vertreter, die eine Ausnahme hiervon darstellen. Dabei konnte eine positive Korrelation zwischen der fehlenden PPlase-Aktivität und der Unfähigkeit an Cyclosporin A zu binden, festgestellt werden.²⁴²

Peptidbindungen haben einen partiellen Doppelbindungscharakter und können daher in einer cis- und trans-Konformation vorliegen. Die trans-Konformation, bei der sich die Seitenketten 180 Grad gegenüberliegen (siehe Abb. 21, linke Seite), ist energetisch und räumlich günstiger als die cis-Konformation, bei der sich die Seitenketten auf derselben Seite befinden (siehe Abb. 21, rechte Seite). Peptidbindungen werden von Ribosomen daher normalerweise in dieser Konformation synthetisiert.³⁴ 99,95% aller Peptidbindungen liegen in der trans-Konformation vor. Peptidbindungen an denen die Aminosäure Prolin beteiligt ist, liegen bis zu 6% in der cis-Konformation vor.²⁷⁰ Die spontane Isomerisierung der cis- in die trans-Konformation ist ein langsam ablaufender, energieverbrauchender Prozess und daher der limitierende Schritt bei der Proteinfaltung. Cyclophiline stabilisieren und beschleunigen diese Umwandlung und nehmen dadurch eine zentrale Rolle bei der Faltung von Proteinen ein.^{249,271}

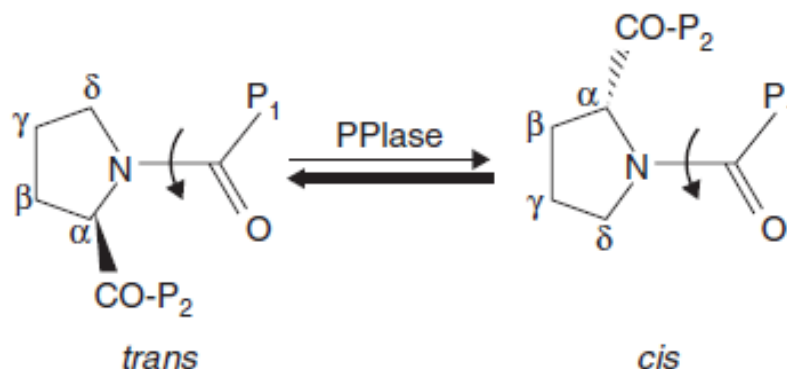


Abbildung 21: Schematische Darstellung der cis- und trans-Isomerie bei einer Peptidbindung zwischen Prolin und einer anderen Aminosäure (P₁) (Abbildung modifiziert nach Wang und Heitman 2005³⁴)

Die Pfeile deuten an, dass die Reaktion normalerweise vermehrt in Richtung der energetisch günstigeren trans-Konformation abläuft. PPlasen fördern die Umwandlung in die cis-Konformation. Die griechischen Buchstaben geben die C-Atome des Prolins an, P₂ bezeichnet eine dritte Aminosäure am anderen Ende des Prolins.

Das erste Protein mit PPlase-Aktivität wurde 1984 aus der Rinde einer Schweineniere isoliert und später als CyPA identifiziert.²⁷¹⁻²⁷³ Kurze Zeit danach konnte eine weitere, sezernierte PPlase identifiziert werden, die dann als CyPB bezeichnet wurde.^{254,274}

4.4 Weitere Funktionen der Cyclophiline

Cyclophiline besitzen mannigfaltige Funktionen im Organismus. Obwohl sie mit vielfältigen zellulären Prozessen wie beispielsweise der Infektiosität von Viren, der Funktion als Chaperon, Mitochondrienfunktionen, Apoptose und der Regulierung des Proteintransports sowie der Zellkommunikation in Verbindung gebracht werden, wird ihre physiologische Rolle bislang nur unvollständig verstanden.²⁷⁵⁻²⁸¹

Auf die Funktionen von Cyclophilin B wird in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen.

4.5 Biologische Effekte von Cyclophilin B

Wie schon zuvor beschrieben, ist CyPB als ein im endoplasmatischen Retikulum ansässiges Cyclophilin an der post-translationalen Faltung von Proteinen beteiligt.²⁸²

Bei Pferden der Rasse *Quarter Horse* konnte eine autosomal rezessiv vererbare, degenerative Hauterkrankung (*Hyperelastosis cutis*) beschrieben werden, die durch eine *missense*-Mutation in CyPB ausgelöst wird. Sie ist gekennzeichnet durch eine starke Überdehnbarkeit der Haut, schweren Läsionen am Rücken und starker Narbenbildung. Aufgrund der schlechten Behandlungsmöglichkeiten müssen die meisten betroffenen Tiere euthanasiert werden.^{283,284}

Bei CyPB-*knockout*-Mäusen konnte eine schwere Form von *Osteogenesis imperfecta* ausgelöst werden, eine Erkrankung mit einer Vielzahl von Defekten in kollagen-enthaltenden Strukturen wie Knochen, Haut und Bindegewebe. Die Tiere entwickelten schon frühzeitig eine ausgeprägte Kyphose und Osteoporose. Diese Feststellung legt nahe, dass CyPB eine bedeutende Rolle bei der Bildung von Kollagen spielen könnte.²⁸²

Des Weiteren konnte eine Beteiligung von intrazellulärem, an der zytoplasmatischen Seite vom endoplasmatischen Retikulum lokalisiertem CyPB bei Hepatitis C-Infektionen festgestellt werden. Ihm kommt eine entscheidende Bedeutung für die effiziente Replikation des Virus zu. Es interagiert mit der RNA-Polymerase NS5B des Hepatitis C-Virus und stimuliert so deren Aktivität, wodurch wiederum die Virusreplikation gesteigert wird.²⁵⁸

Im Zellkern ist es zusammen mit Prolaktin an der Regulation der Transkription und letztlich an der Zellproliferation beteiligt.²⁸⁵ Man vermutet, dass diese Effekte über eine Konformationsänderung des Transkriptionsfaktors Stat5 ausgelöst werden, welche wiederum über die PPIase-Aktivität von CyPB vermittelt wird.²⁸⁵

CyPB kann, wie schon beschrieben, auch extrazellulär vorkommen.²⁴⁷ Es wurde zum Beispiel in Muttermilch und Plasma nachgewiesen und kann dort Konzentrationen von bis zu 150µg/ml erreichen.^{247,274,286} Extrazellulärem CyPB fehlt die aminoterminal Sequenz, die für die Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum zuständig ist.²⁵⁵

Die Sekretion von CyPB kann von einer Reihe von Zellen durch verschiedene Auslöser erfolgen.²⁸⁷ So können beispielsweise glatte Muskelzellen CyPB als Reaktion auf oxidativen Stress freisetzen.²⁸⁸

II SCHRIFTTUM

Ebenso kann eine spezifische und schnelle Sekretion von CyPB durch Cyclosporin A ausgelöst werden. Dabei wird CyPB über den konstitutiven Sekretionsweg in voller Länge in den Extrazellularraum sezerniert.^{255,267} Dies konnte durch Versuche an epidermalen Keratinozyten, Nierenepithelzellen, embryonalen Nierenzellen, und epithelialen Tumorzellen aus dem Gebärmutterhals belegt werden.^{255,267,289,290} Auch hypophysäre Zellen können CyPB sezernieren. Als Stimuli hierfür dienen Östradiol, Insulin sowie *epidermal growth factor* (EGF).²⁹¹ Eine spontane Sekretion von CyPB konnte für Chondrozyten, Fibroblasten und Pankreastumorzellen nachgewiesen werden.²⁹²⁻²⁹⁴

Extrazelluläres CyPB ist ebenso wie CyPA ein starker proinflammatorischer Mediator.³⁵ Jedoch ist es alleine nicht in der Lage, entzündungsfördernde Cytokine zu induzieren.²⁹⁵

In Körperflüssigkeiten konnten als Reaktion auf entzündliche Stimuli große Mengen CyPB nachgewiesen werden.²⁹⁶ So konnten bei schwerer Sepsis erhöhte CyPB-Spiegel im Serum erkrankter Patienten gefunden werden.²⁹⁷ Auch bei Asthma-Patienten konnten, im Vergleich zu Kontrollgruppen gesunder Personen, erhöhte CyPB-Spiegel in Spülproben aus der Nase nachgewiesen werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass CyPB zur Rekrutierung von proinflammatorischen Leukozyten beiträgt.²⁹⁸

Die Sekretion von CyPB durch Chondrozyten lässt vermuten, dass es eine Rolle bei Gelenkerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis spielen könnte.²⁹³

Bei HIV-Infektion konnten ebenfalls erhöhte CyPB-Spiegel nachgewiesen werden. Dabei waren die Werte im Vergleich zum physiologischen Wert um das 1,6fache erhöht.²⁴⁸ Man vermutet, dass CyPB die Pathogenese der HIV-Infektion beeinflusst, indem es mit dem Hüll-protein gp120 interagiert. Dabei könnte es entweder durch die PPIase-Aktivität des CyPB zu einer Konformationsänderung des gp120 kommen, was die Viruspenetration vereinfacht oder alternativ das Andocken der Virionen durch einen gp120/CyP-Komplex erleichtert werden.²⁴⁸ Auch die Infektiosität humaner onkogener Papillomaviren wird durch CyPB beeinflusst. Dabei triggert auf der Zelloberfläche lokalisiertes CyPB die Internalisierung der Viruspartikel.²⁹⁹

Neben diesen entzündlichen und infektiösen Erkrankungen, konnte auch eine Beteiligung von CyPB bei tumorösen Erkrankungen nachgewiesen werden. So konnte zum Beispiel eine gesteigerte CyPB-Expression beim Mammakarzinom festgestellt werden. Dabei wird vermutet, dass CyPB die Zellproliferation und -migration beeinflusst, indem es die Expression von Hormonrezeptoren und Genprodukten beeinflusst.³⁰⁰ CyPB wird auch bei 80-90% der hepatozellulären Karzinome und Kolonneoplasien überexprimiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass es Tumorzellen vor Hypoxie und Apoptose, die durch Chemotherapeutika hervorgerufen werden, schützt.³⁵ Außerdem konnte ein protektiver Effekt von CyPB auf Hepatozyten gegenüber oxidativem Stress festgestellt werden.³⁰¹

4.6 Cyclophilin B und CD147 (EMMPRIN)

Extrazelluläres CyPB ist an der Kommunikation zwischen Zellen und an der Signalgebung bei entzündlichen Prozessen beteiligt.³⁵

Es kann Signale, wie beispielsweise die Freisetzung von Ca^{2+} sowie die Aktivierung von Proteinkinasen in Zielzellen auslösen.^{302,303} Dabei konnte CD147 (EMMPRIN) als Hauptsignalrezeptor für CyPB identifiziert werden, der die Signale in Zielzellen überträgt.^{287,302}

CyPB besitzt eine starke chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten, die über CD147 (EMMPRIN) vermittelt wird.^{296,302} Auch die Migration von Makrophagen konnte durch CyPB ausgelöst werden.^{295,304} Dies konnte durch Versuche mit Antikörpern gegen CD147 (EMMPRIN) belegt werden, bei denen der chemotaktische Effekt von CyPB auf Leukozyten aufgehoben werden konnte.³⁰² Diese Eigenschaft zeigt, dass es in der akuten Phase von Entzündungen zur Infiltration von Leukozyten beitragen kann und so das Entzündungsgeschehen reguliert.^{246,295,296,302,305}

Eine weitere Funktion von sezerniertem, extrazellulärem CyPB, die über CD147 (EMMPRIN) vermittelt wird, ist die integrin-vermittelte, feste Adhäsion von T-Lymphozyten an die extrazelluläre Matrix.^{296,306} Dies konnte dadurch belegt werden, dass Antikörper gegen CD147 (EMMPRIN) die Adhäsion der T-Zellen verhindert.²⁹⁶ Dieser Effekt betrifft vornehmlich CD4^+ -T-Zellen (*Memory*-T-Zellen), was die Hypothese untermauert, dass es zur Regulierung der Infiltration bestimmter T-Zell-Subpopulationen in entzündlich veränderte Gebiete beiträgt.²⁹⁶

Sowohl für die CyPB/CD147(EMMPRIN)-vermittelten Signalkaskaden, als auch für die chemotaktischen Wirkungen von CyPB und die CyPB/CD147(EMMPRIN)-vermittelte Adhäsion von T-Lymphozyten an die extrazelluläre Matrix, ist die zusätzliche Bindung von CyPB an Proteoglykane, die in der extrazellulären Matrix sowie auf T-Zellen, Granulozyten und Makrophagen vorkommen, erforderlich.^{218,296,306} Im Speziellen handelt es sich dabei um Glykosaminoglykane der Heparansulfat-Familie.³⁰⁷ Sie dienen auf diesen Zellen vermutlich als Hauptbindungsstelle für Cyclophiline.²¹⁸ So konnten durch Entfernung dieser Proteoglykane von der Zelloberfläche Signalkaskaden in neutrophilen Granulozyten ausgeschaltet, sowie die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und T-Zellen aufgehoben werden.^{306,308}

Die Bindung von CyPB an die Proteoglykane und CD147 (EMMPRIN) wird über zwei verschiedene Bindungsstellen vermittelt.²⁹⁶ Die Bindung an CD147 (EMMPRIN) wird über eine Bindungsstelle im konservierten Kern von CyPB bewerkstelligt, was erklärt, dass Chemotaxis und Ca^{2+} -Signale auch durch CyPA ausgelöst werden können.²⁹⁶ Allerdings werden diese Effekte effizienter durch CyPB ausgelöst als durch CyPA.²⁹⁶ Die Bindung an Heparansulfat wird durch eine Sequenz im aminoterminalen Ende von CyPB vermittelt, die spezifisch für CyPB ist. Dies erklärt die Tatsache, dass die feste Adhäsion von T-Zellen nur durch CyPB ausgelöst werden kann.²⁹⁶

Die Aminosäurereste des katalytischen Zentrums der Cyclophiline sind entscheidend für die Signalvermittlung in Zielzellen und die chemotaktische Aktivität dieser Proteine.²¹⁸ So können beispielsweise CyPA-Mutanten, denen die PPlase-Aktivität fehlt, keine Signalkaskaden in Zielzellen mehr auslösen.³⁰⁸ Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Signale am CD147(EMMPRIN)-Rezeptor durch die PPlase-Aktivität der Cyclophiline ausgelöst werden, die nur eine schwache Bindung von

Ligand und Rezeptor erfordern.²¹⁸ CyPB zeigt nur schwache und vorübergehende Interaktionen mit CD147 (EMMPRIN), die vergleichbar mit einem Enzym/Substrat-Komplex sind. Die Interaktion mit Heparansulfat führt zu einer Anreicherung von CyPB in der Umgebung des CD147(EMMPRIN)-Rezeptors.^{306,309} Dabei nimmt das Heparansulfat keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von CyPB, sodass dieses die Asp¹⁷⁹-Pro¹⁸⁰-Bindung der extrazellulären Domäne von CD147 (EMMPRIN) isomerisieren kann, wodurch wiederum intrazelluläre Signalkaskaden in den Zielzellen ausgelöst werden können.³⁰⁶ Dies könnte ein Ansatz für künftige therapeutische Maßnahmen sein, um den durch Cyclophiline vermittelten Entzündungsprozess zu modulieren.³⁰⁶

Neben den bisher beschriebenen Funktionen hat die Interaktion von CyPB und CD147 (EMMPRIN) auch Einfluss auf die Infektiosität des Masernvirus. So konnte seine Infektiosität durch Antikörper gegen CD147 (EMMPRIN) *in vitro* um 40% reduziert werden, wodurch bewiesen werden konnte, dass es CD147 (EMMPRIN) als Rezeptor benutzt.³¹⁰

4.7 Die Rolle von Cyclophilin A und B in der Atherosklerose

Die Rolle von **CyPA** in Bezug auf atherosklerotische Prozesse wurde in vielen Studien ausführlich untersucht. Die gewonnenen Daten belegen, dass es einen wichtigen (pro)atherogenen Stimulus für die Entwicklung der Atherosklerose darstellt.⁵¹

CyPA, sowie sein Rezeptor CD147 (EMMPRIN), konnten in histopathologischen Untersuchungen atherosklerotischer Plaques von ApoE-*knockout*-Mäusen, die als Tiermodell für Atherosklerose dienen, nachgewiesen werden. Dabei scheint eine Kolo-kalisation von CyPA und eingewanderten Monozyten und Makrophagen vorzuliegen.³¹¹⁻³¹⁵

Darüber hinaus nimmt CyPA direkten Einfluss auf Zellen, die an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sind.⁵¹ Hierzu gehören Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen sowie die daraus entstehenden Schaumzellen, glatte Muskelzellen sowie Thrombozyten.^{13,51,124,316}

CyPA wird unter anderem von dysfunktionellen Endothelzellen freigesetzt.⁵¹ Als Reaktion auf Risikofaktoren wie zum Beispiel Bluthochdruck, Hyperlipidämie, Hyperglykämie, Nikotinabusus oder der Anwesenheit von Chlamydia pneumoniae werden von diversen Zellen in der Arterienwand Entzündungsmediatoren und reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt, die zu endothelialer Dysfunktion und Freisetzung von CyPA führen.^{51,317-320}

Die Endothelzellen werden durch extrazelluläres CyPA zur Expression von Adhäsionsmolekülen wie beispielsweise ICAM-1, VCAM-1 oder E-Selektin angeregt. Dies ist eine wichtige Grundlage für das Auswandern von Entzündungszellen im Rahmen der Plaqueentstehung.^{315,317,318,321}

Außerdem führt CyPA zur Apoptose von Endothelzellen.³¹³ Während es in niedrigen Konzentrationen *in vitro* zur Proliferation von Endothelzellen führt, bewirken hohe CyPA-Konzentrationen eine verminderte Lebensfähigkeit derselben.³¹⁸

II SCHRIFTTUM

Neben Endothelzellen hat CyPA auch eine breitgefächerte Wirkung auf Leukozyten. Es beeinflusst unter anderem die Leukozytenrekrutierung. So stellt das auf den Endothelzellen durch CyPA induzierte E-Selektin einen wichtigen Bindungspartner für das auf Leukozyten exprimierte PSGL-1 dar. Auf diese Weise steigert es das *rolling* von Leukozyten.³²² Über die Induktion des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 auf Endothelzellen beeinflusst es darüber hinaus die feste Adhäsion von Leukozyten.³¹⁵ VCAM-1 spielt eine wichtige Rolle für die Atherogenese.³²³ Es stellt einen Liganden für das Integrin VLA-4 dar, das vornehmlich auf Lymphozyten und Monozyten exprimiert wird und vermittelt somit die selektive Adhäsion mononukleärer Zellen am Endothel.³²⁴

Außerdem besitzt CyPA eine starke chemotaktische Wirkung auf Monozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie T-Zellen.^{296,308,325-329} Auf diese Weise bewirkt es eine Akkumulation von Leukozyten im Bereich atherosklerotischer Läsionen.⁵¹

Die in die Intima ausgewanderten Entzündungszellen werden weiter durch die Wirkungen von CyPA beeinflusst:

So bewirkt CyPA zum Beispiel die Proliferation von Makrophagen, was als eine Kompensationsreaktion zur Elimination der exzessiven Lipidansammlungen in der Gefäßwand angesehen werden kann und letztlich zu einer vermehrten Schaumzellbildung führt.^{321,330,331}

Außerdem bewirkt CyPA die Aktivierung von Makrophagen.³³² Dies führt über einen NF- κ B-gesteuerten Signalweg zur Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF α , IL-6, IL-8, MCP-1, IL-1 β , MMPs und *tissue factor*.^{324,333} Über diesen Signalweg kommt es auch zu einer gesteigerten Expression des Zytokins M-CSF.³¹⁴ Dieses nimmt eine bedeutende Rolle in der Umwandlung von Monozyten zu Schaumzellen ein, indem es eine vermehrte Expression des *Scavenger*-Rezeptors A bewirkt und somit die Aufnahme modifizierter Lipide ermöglicht.³¹⁵

Auch die Bildung von Matrix Metalloproteinasen wird durch CyPA beeinflusst.³³⁴ MMPs stellen einen wichtigen Faktor für die Progression der Plaque dar, indem sie die Einwanderung der Entzündungszellen und glatter Muskelzellen in die Gefäßwand begünstigen, sowie den Abbau der *fibrous cap* vermitteln und so maßgeblich zur Entstehung vulnerabler Plaques beitragen.^{24,176,177,178}

Im Rahmen der Differenzierung von Monozyten und Makrophagen zu Schaumzellen kommt es zu einer gesteigerten Sekretion von CyPA sowie einer vermehrten Oberflächenexpression von CD147 (EMMPRIN) auf der Schaumzelloberfläche. Die Bindung von CyPA an CD147 (EMMPRIN) führt letztlich zu einer gesteigerten Sekretion von MMP-9.³¹⁴

Außer von Endothelzellen und Makrophagen/Schaumzellen wird CyPA auch von glatten Muskelzellen sezerniert und bewirkt deren Proliferation und Migration.^{319,335} Auf diese Weise trägt es zum vaskulären *remodeling* während der Atherogenese bei.³³⁵

Thrombozyten stellen im Rahmen der Atherosklerose ebenfalls wichtige Entzündungszellen dar.¹²⁴ Einerseits können sie die Rekrutierung von Leukozyten vermitteln, andererseits können sie durch die Sekretion von Chemokinen andere Zellen anlocken.^{13,124,129} CyPA führt über die Bindung an CD147 (EMMPRIN) auf der Thrombozytenoberfläche zu deren Aktivierung.^{316,336} Dies führt zu vermehrter Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Plättchenoberfläche und schließlich zur Adhäsion von Thrombozyten am Endothel. Im Falle einer Plaqueerosion oder -ruptur könnten diese Prozesse letztlich zur Thrombusbildung führen.

Neben den zahlreichen *in vitro*-Versuchen konnte der Einfluss von CyPA auf die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen auch *in vivo* bestätigt werden. In einer Untersuchung von Nigro et al. konnte an ApoE-CyPA-Doppel-*knockout*-Mäusen, die für 4 Wochen mit einer cholesterinreichen Diät gefüttert wurden, eine deutlich verminderte Bildung atherosklerotischer Veränderungen im Vergleich zu reinen ApoE-*knockout*-Mäusen, die als Tiermodell für Atherosklerose dienen, beschrieben werden. Die reduzierte Plaquebildung ist dabei auf ein vermindertes CyPA-vermitteltes Entzündungsgeschehen zurückzuführen, das unter anderem mit einer reduzierten Einlagerung von LDL in der Wand der Aorta und einer verminderten Expression von *Scavenger*-Rezeptoren einhergeht. Auch eine verminderte Expression von VCAM-1 im Aortenbogen sowie eine reduzierte Apoptoserate von Endothelzellen stehen damit in Zusammenhang.³¹⁵

Über das Vorkommen von **CyPB** in der atherosklerotischen Plaque, seinen Einfluss auf die Regulation von MMPs und somit seine potentielle Rolle für die Plaqueprogression und -destabilisierung konnten in der Literatur keine konkreten Daten gefunden werden.

Die *in vitro* nachgewiesene chemotaktische Wirkung von CyPB auf Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten, T-Zellen und Makrophagen zeigt, dass es an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist.^{295,296,302} Jedoch konnten in der Literatur keine Hinweise auf die Beteiligung an den entzündlichen Prozessen der Atherosklerose gefunden werden.

Die Wirkung von CyPB auf Thrombozyten wurde bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe untersucht. Durch die Einwirkung von CyPB kommt es bei Thrombozyten zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen. Dies konnte durch gesteigerte Adhäsivität (*rolling* und Adhäsion) von Thrombozyten in Flusskammerexperimenten und *in vivo* bewiesen werden.³¹⁶

5 Cyclosporin A (CsA) bei entzündlichen Erkrankungen

Die Wanderung von Leukozyten spielt eine bedeutende Rolle bei entzündlichen Erkrankungen. Die Beteiligung von CyPA bei atherosklerotischen Prozessen, die enge strukturelle Verwandtschaft zwischen CyPA und CyPB, das Vorkommen erhöhter CyPB-Konzentrationen bei entzündlichen Geschehen, sowie die Fähigkeit von CyPB, die Migration von Makrophagen, T-Zellen und neutrophilen Granulozyten auszulösen, lassen auch eine Beteiligung von CyPB bei der Entstehung der Atherosklerose vermuten.^{32,33,51,250,295,296,302}

Neuere Forschungen zeigen, dass die Antagonisierung der Cyclophilin-Wirkungen eine therapeutische Möglichkeit darstellen könnte, entzündliche Erkrankungen, die mit der Wanderung von Leukozyten einhergehen, zu reduzieren.³³⁷ Eine Möglichkeit hierfür besteht in der therapeutischen Anwendung von Cyclosporin A (CsA).

Die Behandlung mit Cyclosporin A ist jedoch mit einer Reihe von Nebenwirkungen verbunden. Hierzu gehören beispielsweise eine nephrotoxische, hepatotoxische und neurotoxische Wirkung, das Risiko für die Entwicklung von Diabetes mellitus und Bluthochdruck sowie Hyperkaliämie.³³⁸⁻³⁴⁰

Auch eine erhöhte Disposition für die Entstehung von atherosklerotischen Veränderungen und die Entwicklung von Hyperlipidämien stehen im Zusammenhang mit einer Cyclosporin A-Behandlung.³⁴⁰ In diesem Zusammenhang ist es wichtig, nochmals zu erwähnen, dass es durch Cyclosporin A zu einer Sekretion von CyPB kommt.^{255,267}

Darüber hinaus stellt die immunsupprimierende Wirkung von Cyclosporin A eine unerwünschte Wirkung für einen möglichen therapeutischen Einsatz von Cyclosporin A zur Unterdrückung der Cyclophilin-Wirkungen dar. Aus diesem Grund ist man auf der Suche nach Cyclosporin A-Derivaten, deren immunsupprimierende Wirkung aufgehoben wurde.

5.1 Das nicht immunsuppressive Cyclosporin A-Derivat NIM811 (N-methyl-4-*isoleucin* Cyclosporin; (Me-Ile⁴)-Cyclosporin)

NIM811 ist ein Cyclosporin A-Derivat, das an Position 4 des Cyclosporin-Rings substituiert ist.³⁴¹ Wie in Abbildung 22 gezeigt, unterscheidet sich die chemische Struktur von NIM811 zu der von Cyclosporin A darin, dass es eine Methyl-Isoleucin-Gruppe anstelle von Methyl-Leucin an Position 4 aufweist.³⁴²

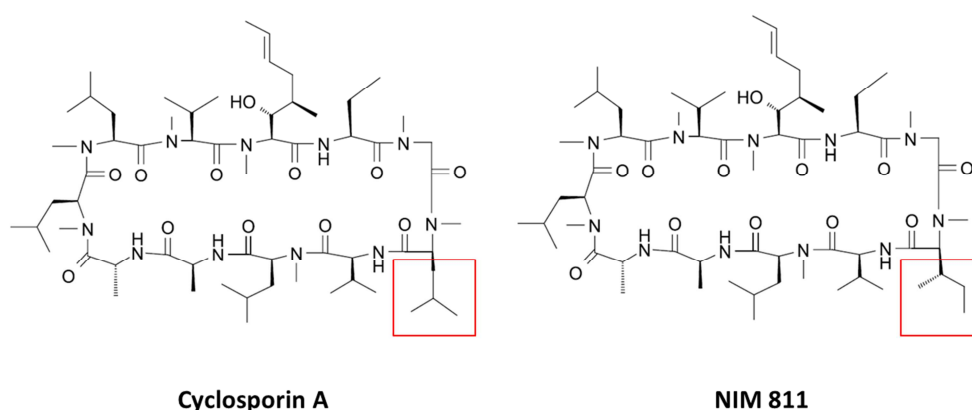


Abbildung 22: Vergleich der chemischen Struktur von Cyclosporin A mit der von NIM811 (Abbildung modifiziert nach Ma et al. 2006³⁴³)

Einbau einer Isobutylgruppe bei NIM811 im Austausch gegen eine sekundäre Butylgruppe an Position 4 bei CsA.

Es weist jedoch im Gegensatz zu Cyclosporin A keine immunsuppressiven Eigenschaften auf, da durch die strukturelle Veränderung an Position 4 die Bindungsstelle des CyPA/CsA-Komplexes für Calcineurin blockiert wird.^{341,343}

Darüber hinaus hat es eine doppelt so hohe Bindungsaffinität zu Cyclophilinen als Cyclosporin A.³⁴³ Die orale Bioverfügbarkeit von NIM811 ist vergleichbar mit der von Cyclosporin A, jedoch besitzt es eine geringere Nephrotoxizität.³⁴¹

II SCHRIFTTUM

Es weist eine starke und selektive anti-HIV-Aktivität *in vitro* auf, die über CyPA vermittelt wird.^{341,344} Außerdem besitzt es einen hemmenden Effekt auf die Replikation des Hepatitis C-Virus *in vitro*. Wie schon beschrieben, reguliert CyPB die Funktion der RNA-Polymerase NS5B des Hepatitis C-Virus und somit seine Genomreplikation. Dieser Effekt konnte durch Cyclosporin A und NIM811 gehemmt werden.^{258,345} Die Hemmung durch NIM811 ist vor allem in niedrigen Dosierungen höher als die von Cyclosporin A.³⁴⁶ Klinische Studien liegen allerdings bisher nicht in aussagekräftiger Anzahl vor.³⁵

Aufgrund seiner Fähigkeit, die Zellmembran zu penetrieren ist NIM811 jedoch in der Lage, auch die Wirkung intrazellulärer Cyclophiline wie beispielsweise CyPD zu inhibieren. Dies kann zu unerwünschten Nebenwirkungen führen.^{32,343} Aus diesem Grund wurde ein zellimpermeables Cyclosporin A-Derivat entwickelt, das ausschließlich die Wirkung extrazellulärer Cyclophiline blockiert.³³⁷

5.2 Das rein extrazelluläre wirkende Cyclosporin A-Derivat MM284 ([(4R)-4-[(6-carboxy-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-methyl]-4-methyl-L-threonine](1)-CsA)

Bei MM284 handelt es sich um ein an Position 1 mit einem Benzimidazol-Ring substituiertes Derivat von Cyclosporin A (siehe Abb. 23). Der Einbau dieses negativ geladenen Restes verhindert die Passage von MM284 durch die Zellmembran und macht es hierdurch zu einem, im Gegensatz zu NIM811, zellimpermeablen Cyclosporin A-Analog.^{337,347}

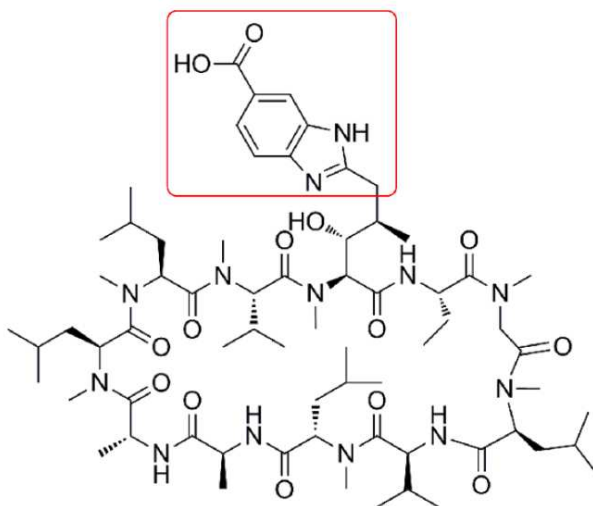


Abbildung 23: Chemische Struktur von MM284 (nach Malesevic et al. 2013³³⁷)

An Position 1 des Cyclosporin A-Grundgerüsts wurde ein Benzimidazol-Ring substituiert.

Seine Zellimpermeabilität und sein Unvermögen die Calcineurin-Aktivität und NF-AT-Aktivierung zu beeinflussen, zeigen dass diesem Stoff eine immunsupprimierende Wirkung fehlt.³³⁷

MM284 inhibiert die enzymatische Aktivität von CyPA im gleichen Maße wie Cyclosporin A, woraus man schlussfolgern kann, dass es eine enge Bindung mit CyPA eingeht.³⁴⁸

II SCHRIFTTUM

Aufgrund seiner Zellimpermeabilität inhibiert MM284 lediglich die Aktivität extrazellulärer Cyclophiline.^{337,347}

Diese inhibierende Wirkung konnte beispielsweise durch eine Hemmung der Migration verschiedener Arten von Leukozyten entgegen eines CyPA-Gradienten *in vitro* gezeigt werden.³⁴⁸ Außerdem konnte die Rekrutierung von Leukozyten in einem Versuchsmodell, bei dem eine Peritonitis und eine Hypersensitivitätsreaktion bei Mäusen induziert wurde, inhibiert werden.³³⁷

Des Weiteren konnte es in einem Tiermodell die Symptome der Hanot-Krankheit (primäre biliäre Zirrhose) abschwächen. Es wird vermutet, dass diese Effekte durch eine verminderte Expression von TIMP-4 und MMP-7 vermittelt werden.³⁴⁹

III Eigene Untersuchungen

1 Zielsetzung

Zelluläre Entzündungsprozesse spielen sowohl für die Entstehung und Progression der Atherosklerose als auch für die Destabilisierung der Plaque und den dadurch entstehenden Komplikationen wie dem akuten Myokardinfarkt eine wichtige Rolle. Dabei ist eine Vielzahl von verschiedenen Zellen beteiligt.

Einen entscheidenden Einfluss auf die atherosklerotischen Prozesse nehmen unter anderem Thrombozyten. Einerseits fördern sie durch ihre Interaktionen mit Leukozyten und Endothelzellen das Entzündungsgeschehen, indem sie über verschiedene Aktivierungsmechanismen entzündliche und atherogene Prozesse auslösen, andererseits sind sie an der Entstehung von Komplikationen wie dem akuten Myokardinfarkt maßgeblich beteiligt, indem sie nach der Ruptur bzw. Erosion einer vulnerablen Plaque einen thrombotischen Gefäßverschluss nach sich ziehen können.^{122,124}

Neben Thrombozyten nehmen auch Monozyten/Makrophagen sowie glatte Muskelzellen eine zentrale Rolle in der Entstehung der Atherosklerose ein. Diese Zelltypen stellen die Hauptproduzenten von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) dar.^{25,350} Hierdurch vermitteln sie die proteolytische Aktivität, die entscheidend für die Einwanderung von Monozyten und damit für die Progression der Atherosklerose ist und schließlich die Ruptur der Plaque und akute Komplikationen wie beispielsweise einen Myokardinfarkt nach sich ziehen kann.^{177,350,351}

Für das Immunophilin Cyclophilin A (CyPA) konnte in den letzten Jahren eine entscheidende Rolle für die Entstehung atherosklerotischer Prozesse aufgezeigt werden.^{32,51} Es wirkt dabei als wichtiger Mediator, der die entzündlichen Prozesse der Atherosklerose vorantreibt.

Ein weiterer Vertreter der Cyclophilin-Familie ist Cyclophilin B (CyPB). Es wird bei chronischen inflammatorischen Erkrankungen und auch bei schwerer Sepsis verstärkt exprimiert.^{35,297} CyPB wird außerdem von glatten Muskelzellen freigesetzt und besitzt besonders für T-Zellen eine ausgeprägte chemotaktische Aktivität.^{288,296}

Seine Beteiligung an atherosklerotischen Prozessen wurde in der Vergangenheit noch nicht untersucht. Die ähnliche Struktur von CyPA und CyPB sowie das extrazelluläre Vorkommen beider Vertreter geben jedoch Anlass zur Vermutung, dass CyPB ebenso wie CyPA Einfluss auf die Entwicklung atherosklerotischer Prozesse nehmen könnte.^{33,250,259,336,352}

Aufgrund der Freisetzung von CyPB durch glatte Muskelzellen, der chemotaktischen Wirkung auf T-Zellen, sowie der *in vitro* nachgewiesenen chemotaktischen Aktivität für Makrophagen, war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, zu prüfen, ob CyPB auch einen Einfluss auf die Migration von Monozyten oder anderer Leukozyten nehmen und somit die Progression der Atherosklerose fördern könnte.^{288,295,296}

Eine weitere Fragestellung, die sich aus den oben geschilderten Zusammenhängen ergab, war, ob CyPB die Bildung von MMPs durch Monozyten beeinflusst.

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Allain et al. konnten in einem statischen Versuchsansatz zeigen, dass es durch die Stimulation von Thrombozyten mit CyPB zu einer gesteigerten der Adhäsion auf Kollagen sowie zu einer Aktivierung der Blutplättchen kommt.³⁵³ In einer kürzlich durchgeführten Untersuchung unserer Arbeitsgruppe konnte auch im Flusskammerversuch eine deutliche Zunahme des *rollings* und der Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen sowie an humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) sowohl unter dem Einfluss von CyPB als auch unter demjenigen von CyPA nachgewiesen werden.³¹⁶ Diese Prozesse könnten im Rahmen der Atherogenese einen wesentlichen Faktor darstellen, der die Plaqueentstehung begünstigt. Daraus ergab sich als weitere Fragestellung, inwiefern die Wirkung von CyPB auf die Adhäsion der Thrombozyten durch die nicht immunsuppressiven Cyclophilin-Inhibitoren NIM811 und MM284 *in vitro* beeinflusst werden könnte.

In der folgenden Auflistung sind die Fragestellungen und Ziele der vorliegenden Arbeit nochmals zusammengefasst:

- 1) Nachweis der CyPB-Expression in der atherosklerotischen Plaque ApoE-defizienter Mäuse
- 2) Nachweis der CyPB-Expression bei verschiedenen Zelltypen, die eine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielen (Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen, Schaumzellen)
- 3) Einfluss von CyPB auf die Sekretion von Matrix Metalloproteinasen durch Monozyten
- 4) Einfluss von CyPB und CyPB in Kombination mit den Cyclosporin-Analoga NIM811 und MM284 auf die Migration von Monozyten *in vitro*
- 5) Einfluss von CyPB auf die Migration verschiedener Leukozyten-Subpopulationen *in vivo*
- 6) Einfluss von CyPB und CyPB in Kombination mit den Cyclosporin-Analoga NIM811 und MM284 auf das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten auf unterschiedlichen Matrices *in vitro*
- 7) Beurteilung des Adhäsionsverhaltens aktivierter Thrombozyten auf immobilisiertem CyPA und CypB

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

2.1.1.1 Allgemein benötigte Geräte für die *in vitro-* und *in vivo-*Versuche

Brutschrank <i>Sanyo MCO-18AIC</i>	Sanyo Electric Biomedical Co. Ltd., München
Eppendorf-Ständer	Brand, Wertheim
Falconständer	Brand, Wertheim
Hämatologie-Analysegerät <i>KX-21N</i>	Sysmex, Kobe, Japan
Magnetrührer Ika [®] RCT	IKA-Werke (Janke & Kunkel), Staufen
Magnetrührstäbchen	VWR, Darmstadt
pH-Meter <i>HI 9025</i>	Hanna Instruments, Kehl a. R.
Pipette Eppendorf <i>research</i>	Eppendorf AG, Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe <i>accu-jet[®] pro</i>	Brand, Wertheim
Präzisionswaage <i>TE-1200-OCE</i>	Sartorius AG, Göttingen
Reinstwasseranlage <i>TKA-GenPure</i>	TKA Thermo Electron LED GmbH, Niederelbert
Schüttler Ika [®] <i>KS260 basic</i>	IKA-Werke (Janke & Kunkel), Staufen
Tischzentrifuge Heraeus <i>Multifuge 1s</i>	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Vortexer Ika [®] <i>MS3 basic</i>	IKA-Werke (Janke & Kunkel), Staufen
Sterilbank Heraeus <i>HERAsafe HS18</i>	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.1.1.2 Verwendete Geräte für die mikroskopische Auswertung der immunhistologischen Färbungen und der Immunfluoreszenzfärbungen

Kamera-System

Kamera: <i>Nikon Digital Sight 5M</i>	Nikon, Tokyo, Japan
Steuerung: <i>Nikon Digital Sight DS-U1</i>	Nikon, Tokyo, Japan
mit: <i>Imaging-Software NIS-Elements</i>	Nikon, Tokyo, Japan

Fluoreszenzmikroskop *Optiphot-2* Nikon, Tokyo, Japan

mit Filter-Block B-2A:	Anregungsfilter: 450-490nm, dichroitischem Spiegel: 510nm, Emissionsfilter: 520nm
und Filter-Block DAPI:	Anregungsfilter 340-380nm, dichroitischem Spiegel: 400nm, Emissionsfilter: 435-485nm

2.1.1.3 Verwendete Geräte für die durchflusszytometrischen Untersuchungen an Thrombozyten sowie für die Thioglykolat-induzierte Peritonitis

Durchflusszytometer FACSCalibur™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
----------------------------------	-----------------------------------

2.1.1.4 Verwendete Geräte für die SDS-Gelatine-Zymographie

Elektrophorese-Kammer	Novex, Life Technologies GmbH, Darmstadt
<i>Novex® Mini Cell</i>	
<i>XCellSureLock™ Electrophoresis Cell</i>	

Scanner <i>ViewPix 700</i>	Biostep GmbH, Burkhardtsdorf
----------------------------	------------------------------

Spannrahmen für Zymogram-Gele	Novex, Life Technologies GmbH, Darmstadt
-------------------------------	--

2.1.1.5 Verwendete Geräte für den Chemotaxis-Assay

Migrationskammer	NeuroProbe, Gaithersburg, USA
<i>AC48 chemotaxis chamber</i>	

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.1.1.6 Verwendete Geräte für die Flusskammerversuche

CD-Recorder <i>VDR-3000</i>	Datavideo® Technologies Co., Hadfield, UK
Flusskammer	provitro GmbH, Berlin
Lichtmikroskop <i>Axiovert 2000</i> mit Quecksilberhöchstdrucklampe <i>HBO 100</i>	Carl Zeiss AG, Göttingen
Monitor <i>X15</i>	AG Neovo, Taipei, Taiwan
Perfusor® fm	Braun, Melsungen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Abdecktuch <i>Foliodrape®</i>	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Augen- und Nasensalbe <i>Bepanthen®</i>	Bayer, Leverkusen
Butterfly <i>Safety-Multifly®-Set 21G</i>	Braun, Melsungen
Cellophan-Folien	Novex, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Deckgläschen 25mm (für Flusskammer)	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim
Deckgläschen 24 x 60mm (für Histologie)	R. Langenbrinck, Emmendingen
Dreiwegehahn <i>Discofix®C</i>	Braun, Melsungen
Einmalspritze 20ml	Braun, Melsungen
Eppendorf Tubes (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf AG, Eppendorf, Hamburg
Falconröhrchen (15ml, 50ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Fettstift <i>Liquid Blocker Pap Pen</i>	Science Services, München
Filtereinheit <i>Millex® GP 0,22µm</i>	Merck Millipore, Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Filter für Migrationskammer <i>Standard PCTE 5µm</i>	NeuroProbe, Gaithersburg, USA
Hautdesinfektionsmittel <i>Softasept N</i>	Braun, Melsungen
Kanülen <i>BD Microlance™ 3 20G</i>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Lab-tek™ <i>Chamber Slide, 16 well</i>	Nunc, New York, USA

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Mäusefutter atherogene Diät: Experimentalfutter nach <i>Paigen</i> Artikel-Nr.: S8127-E510	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Basisdiät: Haltungsfutter für Mäuse und Ratten	SSniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Mäusekäfige <i>Makrolon Typ II long</i> mit Einstreu (entstaubtes Weichholzgranulat)	Tecniplast, Hohenpreißenberg ABEDD-LAB & VET Service GmbH, Wien, Österreich
Membranadapter	Sarstedt AG, Nümbrecht
Neubauer-Zählkammer <i>C-Chip</i>	peqlab, Erlangen
Objektträger	Brand, Wertheim
Pasteurpipetten (2,5ml)	Ratiolab GmbH, Dreieich
Perfusorspritzen, 50ml	Braun, Melsungen
Pipettenspitzen (2µl, 20µl, 1000µl)	Eppendorf AG, Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen <i>Multiflex®</i> (0,5-200µl)	Roth, Karlsruhe
Prolene® -Faden, 0,7 metric	Ethicon, Norderstedt
Rührstäbchen	ChronoLog, Leiden, Niederlande
S-Monovette 8,5ml CPDA (<i>citrate phosphate dextrose adenine</i>)	Sarstedt AG, Nümbrecht
Sechs-Loch-Platte	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Sechsendneunzig-Loch-Platte	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Verschlussfolie <i>Parafilm M</i>	Brand, Wertheim
Zellkulturflaschen (175mm ²)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschalen (100x20mm)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zymogram-(Gelatine-) Gel (10%)	Novex, Life Technologies GmbH, Darmstadt

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.1.3 Lösungen, Medien, Reagenzien

ADP (1mmol, 5ml)	Chrono-Log Corp., Havertown, USA
Albumin Fraction V (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bovines Kollagen Typ I (3mg/ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R-250	BioRad Laboratories GmbH, München
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Eisessig	Merck, Darmstadt
EndoPrime Kit	PAA, Pasching, Austria
Ethanol 99%, vollständig vergällt	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach
Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ficoll Trennlösung <i>Biocoll Separating Solution</i>	Biochrom AG, Berlin
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Hamburg
Formaldehyd (4%)	Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Gelatine-Lösung (2%, TypB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
GelDry™ <i>Drying Solution</i>	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
humanes Serum	aus dem Zentrum für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kochsalz-Lösung (NaCl)	AppliChem, Darmstadt

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

<i>LSAB + System-HRP</i>	Dako, Hamburg
<i>bestehend aus gebrauchsfertigem</i>	
<i>Biotinylated Link (biotinylierter Sekundärantikörper)</i>	
<i>Streptavidin HRP (Streptavidin-Biotin-(Meerrettich-)Peroxidase-Komplex)</i>	
<i>DAB+ Substrat-Puffer (pH7,5, mit Wasserstoffperoxid) &</i>	
<i>DAB+-Chromogen (3-3'-Diaminobenzidin-Chromogen-Lösung))</i>	
Lysepuffer	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Mayer's Hämalunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol (100%)	VWR, Fontenay-saus-Bois, Frankreich
May-Grünwalds	Merck, Darmstadt
Eosin-Methylenblau-Lösung	
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
nicht essentielle Aminosäuren	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Novex® Zymogram	Novex, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Entwicklungspuffer (10x)	
Novex® Zymogram	Novex, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Renaturierungspuffer (10x)	
Paraformaldehyd (0,5%)	Merck, Darmstadt
PBS-Tabletten	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (10.000µg/ml Streptomycin, 10.000U/ml Penicillin)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
<i>Phosphate-buffered Saline (PBS)</i>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
<i>Phosphate-buffered Saline (PBS)</i> mit 0,9mM CaCl ₂ und 0,49mM MgCl ₂	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
<i>Protein Block Serum-Free</i>	Dako, Hamburg
RPMI-1640	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Roti®-Histol	Roth, Karlsruhe
Roti®-Histokitt	Roth, Karlsruhe

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
<i>SeeBlue®Plus2 Prestained Standard</i>	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
<i>Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)</i>	Roth, Karlsruhe
tri-Natriumcitrat-Dihydrat 0,1M	Merck, Darmstadt
Tris	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypan Blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin-EDTA (0,05%)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Tween® 20	Merck, Hohenbrunn
Wasserstoffperoxid (30%)	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.4 Rezepte für Puffer, Kulturmedien und Färbelösungen

<u>ACD-Puffer</u>	12,5g Na ₃ -Citrat 6,82g Zitronensäure 10g Glucose mit Aqua dest. auf 500ml ergänzen mit NaOH auf pH 4,6 einstellen
<u>Citratpuffer, pH6</u>	41ml tri-Natriumcitrat-Dihydrat 0,1M 9ml Zitronensäure 0,1M 450ml Aqua dest. pH bei Bedarf mit HCl oder NaOH einstellen
<u>Coomassie Brilliant Blau</u>	0,25g Coomassie Brilliant Blau R-250 45ml Aqua dest. 45ml Methanol 10ml Eisessig
<u>HUVEC-Medium</u>	500ml EndoPrime Base Medium 5ml EndoPrime Supplement (100x) (1%) 1ml EndoPrime EGF (2,5µg/ml) (0,2%) 1ml EndoPrime VEGF (250ng/ml) (0,2%) 10ml EndoPrime FBS (2%) 5ml Penicillin Streptomycin (1%)

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

<u>Ladepuffer (5x)</u>	6,5ml 1M TrisHCl pH 6,8
<u>(non-reducing)</u>	2ml 10% SDS
	1ml Glycerol
	1 Spatelspitze Bromphenolblau
<u>Laufpuffer (10x)</u>	30g Tris (25mM)
	144g Glycin
	10g SDS (0,1%)
	mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen und auf 65°C erhitzen
<u>Monozytenmedium</u>	445ml RPMI-1640
	+50ml FBS (10%)
	+5ml PenStrep (1%)
<u>PBS, unsteril</u>	1000ml Aqua dest
	2 Tabletten PBS
<u>Schaumzellmedium</u>	380ml RPMI-1640
	+100ml humanes Serum (20%)
	+5ml nicht essentielle Aminosäuren (1%)
	+5ml Natriumpyruvat (1%)
	+5ml L-Glutamin (1%)
	+5ml PenStrep (1%)
<u>TrisHCl (pH 6,8)</u>	12,21g Tris
	mit Aqua dest. auf 100ml auffüllen
	pH mit HCl (37%) auf 6,8 einstellen
<u>Tween-PBS 0,05%</u>	500µl Tween 20
	in 1000ml PBS (unsteril) lösen
<u>Tyrodes-Puffer (10x)</u>	80g Natriumchlorid
	10,15g Natriumhydrogencarbonat
	1,95g Kaliumchlorid
	mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen
<u>Tyrodes-Puffer pH 7,4</u>	20ml Tyrodes-Puffer 10x
<u>und pH 6,5</u>	0,2g BSA
	0,2g Glucose
	mit Aqua dest. auf 200ml auffüllen
	mit HEPES auf pH 7,4 einstellen und 50ml davon abnehmen
	Rest mit HCl auf pH 6,5 einstellen
<u>Wasserstoffperoxid 3%</u>	10ml H ₂ O ₂ (30%)
	90ml Methanol (100%)

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.1.5 Proteine

<i>Collagen-related peptide</i> (CRP)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. R. Farndale, Universität Cambridge
Fc (4,02mg/ml)	Eigenherstellung
MM284	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. G. Fischer, Halle (Saale)
NIM811	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Novartis Pharma GmbH, Basel, Schweiz
rekombinantes humanes CD147-Fc	Procorde GmbH, Martinsried
rekombinantes humanes Cyclophilin A	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
rekombinantes humanes Cyclophilin B	Novus Biologicals, Cambridge, UK
rekombinantes humanes IFN- γ	Peprtech, Rocky Hill, USA
rekombinantes humanes TNF- α	Peprtech, Rocky Hill, USA
Thrombin (20U/ml)	Roche GmbH, Mannheim
<i>Thrombin receptor-activating peptide</i> (TRAP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.6 Antikörper

Für die Immunhistologie:

a) Primärantikörper:

<i>Rabbit anti-CyPB-AK</i>	abcam, Cambridge, UK
<i>Rabbit IgG₁ (Isotyp-Kontrolle)</i>	Dako, Hamburg
<i>Negative Control Rabbit Immunglobulin Fraction</i>	

b) Sekundärantikörper:

<i>Biotinylated Link Universal</i>	Dako, Hamburg
------------------------------------	---------------

Für die Immunfluoreszenzfärbungen:

a) Primärantikörper:

<i>Rabbit anti-CyPB-AK</i>	abcam, Cambridge, UK
<i>Rabbit IgG₁ (Isotyp-Kontrolle)</i>	Dako, Hamburg
<i>Negative Control Rabbit Immunglobulin Fraction</i>	

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

b) Sekundärantikörper:

Alexa Fluor® 488 *goat-anti-rabbit*

Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt

Für die Durchflusszytometrie:

a) Primärantikörper:

Rabbit IgG (Isotyp-Kontrolle)

Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Rabbit anti-CyPB-AK

abcam, Cambridge, UK

b) Sekundärantikörper:

Alexa Fluor® 488 *donkey-anti-rabbit*

Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.1.7 Zellen und Zelllinien

humane Monozyten

gesunde Blutspender

humane Thrombozyten

gesunde Blutspender

HUVEC (*human umbilical vein
endothelial cells*)

Gibco Invitrogen, Karlsruhe

2.1.8 Mäusestämme

C57BL/6J (Wildtyp)

Charles River Laboratories, Erkrath

B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J
(ApoE-*knockout*-Maus)

The Jackson Laboratory, Maine, USA

2.1.9 Narkose und Schmerztherapie

Buprenorphinhydrochlorid (*Temgesic*®)

RB Pharmaceuticals Limited, Berkshire, UK

Isofluran CP®

CP Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeines zur Zellkultur

Alle Zellkulturversuche wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Die verwendeten Medien und Lösungen wurden, soweit sie nicht schon vom Hersteller steril geliefert wurden, vor ihrer Verwendung sterilfiltriert. Dazu wurde ein Filter mit einer Porengröße von 0,2µm verwendet. Die verwendeten Kulturgefäße waren bereits vom Hersteller sterilisiert.

Die Zellkulturen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre gehalten.

Die verwendeten Reagenzien wurden gemäß Herstellerangaben bei der erforderlichen Temperatur gelagert. Tiefgefrorene Substanzen (-20°C und -80°C) wurden auf Eis aufgetaut und nach ihrer Verwendung sofort wieder tiefgefroren.

Für die Herstellung von Pufferlösungen wurde Wasser aus einer Reinstwasseranlage verwendet, dessen elektrischer Widerstand über 18 MΩ*cm lag.

2.2.2 Isolationsprotokolle und Zellkulturprotokolle für die in den Versuchen verwendeten Zellen

2.2.2.1 Thrombozytenisolation

Zunächst wurde von gesunden, humanen, weiblichen Blutspendern insgesamt 60ml Blut aus der *Vena mediana cubiti* in sterile 20ml-Spritzen, die zuvor mit 4ml *acid-citrate-dextrose*-Puffer (ACD-Puffer) befüllt wurden, entnommen. Dieses wurde zu jeweils 10ml in sechs 15ml-Falcons überführt und zentrifugiert (210xg, 20 Minuten, bei Raumtemperatur, ohne Bremse).

Durch die Zentrifugation wurden die Blutbestandteile nach ihrer Größe aufgetrennt und es sind zwei Phasen entstanden. In der unteren Phase sind sedimentierte, kernhaltige Zellen enthalten, in der oberen Phase plättchenreiches Plasma (PRP).

Die oberen Phasen von jeweils zwei 15ml-Falcons wurden vorsichtig mit einer Einmalplastikpipette abgenommen, zusammen in ein 50ml-Falcon überführt und dann mit Tyrodes-Puffer (pH 6,5) auf 35ml aufgefüllt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (840xg, 10 Minuten, bei Raumtemperatur). Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen, das Thrombozytenpellet vorsichtig in 500µl Tyrodes-Puffer (pH 6,5) resuspendiert und anschließend mit weiteren 500µl Tyrodes-Puffer (pH 7,4) versetzt. Zuletzt wurde die Zellzahl mit Hilfe eines Hämatologie-Analysegerätes bestimmt und die gewünschte Zellkonzentration mit Tyrodes-Puffer (pH 7,4) eingestellt.

2.2.2.2 Monozytenisolation

Die Anreicherung mononukleärer Zellen erfolgte über eine modifizierte isopyknische Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll Paque (einem neutralen, stark verzweigtem Polymer aus Saccharose-Monomeren, die über Epichlorhydrin kreuzvernetzt sind) und einer darauf folgenden Selektion von Monozyten über Adhäsion.

Zunächst wurden von gesunden, humanen, männlichen Blutspendern aus der *Vena mediana cubiti* 60ml Blut in CPDA (*citrate phosphate dextrose adenine*)-Monovetten entnommen und dieses mit 60ml PBS verdünnt. Dann wurde in sechs 50ml-Falconröhrchen je 20ml Ficoll Paque vorgelegt und mit jeweils 20ml des verdünnten Blutes vorsichtig überschichtet, sodass zwei Phasen entstanden. Durch einen Zentrifugationsschritt (900xg, 20 Minuten, bei Raumtemperatur, ohne Bremse) wurden die Blutbestandteile dann nach ihrer Dichte getrennt, wodurch mehrere Phasen entstanden (siehe Abb. 24).

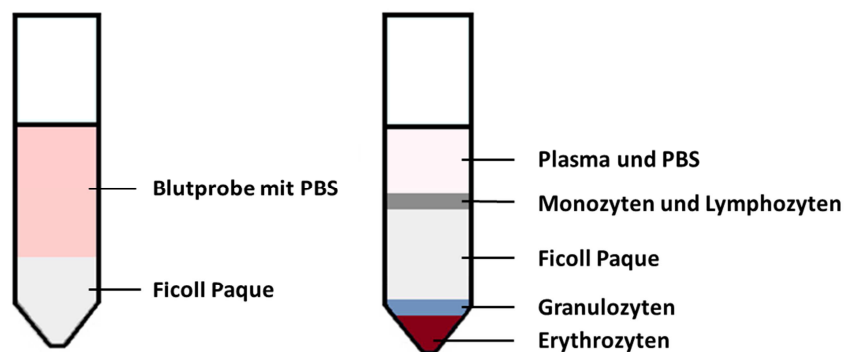


Abbildung 24: Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll Paque (Abbildung modifiziert nach Miltenyi Biotec GmbH³⁵⁴)

Links: Falcon mit 2 Phasen vor der Zentrifugation. **Rechts:** nach der Zentrifugation sind mehrere Phasen entstanden: Monozyten und Lymphozyten reichern sich aufgrund ihrer geringeren Dichte auf der Ficoll-Schicht an.

Die unterste Schicht besteht aus Erythrozyten und Granulozyten, da diese Zellen eine größere Dichte haben als das Ficoll Paque. Darüber folgt eine Schicht aus Ficoll Paque, dann eine milchige Intermediärschicht, die vorwiegend Monozyten und Lymphozyten enthält. In der obersten Schicht findet sich das Plasma.

Die Intermediärschicht wurde mit einer sterilen Transferpipette abgesaugt und in ein neues 50ml-Falconröhrchen überführt. Diese Zellsuspension wurde dann mit Phosphatpuffer (PBS) auf 50ml Gesamtvolumen verdünnt und anschließend zentrifugiert (500xg, 10 Minuten, mit Bremse, bei Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in PBS resuspendiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Durch diese Waschschrte wurde die Leukozytensuspension vom restlichen Ficoll Paque und anderen Verunreinigungen wie Thrombozyten gereinigt. Der Überstand wurde abermals verworfen, das Zellpellet in 1ml Monozytenmedium resuspendiert und anschließend in der Neubauer-Kammer die Zellzahl bestimmt.

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Zellsuspension wurde mit Monozytenmedium auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml verdünnt, in Zellkulturflaschen gegeben und für 18 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Dieser Schritt dient dazu, Monozyten aus der Zellsuspension heraus zu selektieren. Monozyten sind im Gegensatz zu Lymphozyten dazu in der Lage, Pseudopodien auszubilden und dadurch an Plastikoberflächen zu adhären.

Am nächsten Tag wurde das Medium mit den nicht adhären gewordenen Zellen abgenommen und der Boden der Zellkulturflasche mehrmals mit PBS gespült, um die Lymphozyten vollständig zu entfernen. Die in der Zellkulturflasche verbliebenen Monozyten wurden mit 0,05%iger Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin-EDTA) abgelöst. Dazu wurden nach dem Abpipettieren des PBS 10ml Trypsin-EDTA in die Zellkulturflaschen gegeben und für 2 Minuten auf dem Boden der Zellkulturflasche vorsichtig hin- und hergeschwenkt. Dann wurde 20ml Medium zugegeben und der Boden der Zellkulturflasche mit dieser Lösung mehrmals überspült. Zum Schluss wurde die vollständige Ablösung der Monozyten unter dem Mikroskop kontrolliert.

Zuletzt wurden die Monozyten nochmals zentrifugiert (500xg, 10 Minuten, mit Bremse, bei Raumtemperatur) und anschließend mit Monozytenmedium auf die für den folgenden Versuch benötigte Zellzahl eingestellt.

2.2.2.3 Differenzierung zu Makrophagen

Zunächst wurden Monozyten wie im vorherigen Kapitel beschrieben isoliert. Die Zellkultur erfolgte in sogenannten *chamber slides*. Dazu wurden jeweils 100.000 Zellen/200µl Monozytenmedium in jede Reaktionskammer der *chamber slides* gegeben und für 6 Tage im Brutschrank belassen. In dieser Zeit reiften die Monozyten zu Makrophagen aus. Nach 2-3 Tagen fand ein Mediumwechsel statt.

2.2.2.4 Differenzierung zu Schaumzellen

Die Monozyten wurden wie beschrieben isoliert und in einer Konzentration von $3,3 \times 10^5$ Zellen/ml in einem speziellen Medium zur Differenzierung von Schaumzellen kultiviert. Dieses Medium enthält humanes Serum mit den darin vorkommenden Lipoproteinen, die von den Monozyten phagozytiert werden können. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 150µl (entsprechend 50.000 Monozyten) in die Vertiefungen der *chamber slides* gegeben und bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden Thrombozyten isoliert und mit Tyrodes-Puffer (pH 7,4) auf eine Konzentration von 8×10^8 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Thrombozytenlösung wurden jeweils 50µl (entsprechend 40 Millionen Thrombozyten) zu den schon in den *chamber slides* befindlichen Monozyten gegeben und zusammen mit diesen für 8 Tage inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Thrombozyten durch die Monozyten/Makrophagen phagozytiert und diese sind dabei zu Schaumzellen ausgereift. Das Medium wurde während der Heranreifung der Schaumzellen jeden zweiten Tag gewechselt.

2.2.2.5. Kultivierung von *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs)

Aus der Nabelschnur isolierte Endothelzellen werden als ein Modell für die Untersuchung der Funktion von Endothelzellen verwendet.

Die kommerziell bezogenen Endothelzellen wurden in einem speziellen Endothelzell-Medium kultiviert, das mit bestimmten Supplementen und Wachstumsfaktoren angereichert wurde, die das Zellwachstum unterstützen. Zusätzlich wurde das Medium mit 1% Penicillin-Streptomycin versetzt, um ein Wachstum von Keimen zu verhindern.

Die Endothelzellen wurden in Zellkulturflaschen, die mit 0,2%iger Gelatine beschichtet wurden, mit dem oben beschriebenen Medium bei 37°C kultiviert. Dazu wurden pro Zellkulturflasche jeweils 3×10^6 Zellen in 25ml Medium verbracht und einige Tage im Brutschrank belassen.

Sobald die Zellen auf dem Boden der Zellkulturflasche zu 80 bis 90% konfluent gewachsen waren, konnten sie vom Boden der Kulturflaschen abgelöst und für den Versuch genutzt werden. Dazu wurde zunächst das Medium mit einer sterilen Stangenpipette aus den Flaschen abgenommen und verworfen. Dann wurde der Boden der Kulturflaschen zweimal mit 10ml PBS gespült, das dann ebenfalls verworfen wurde. Anschließend wurden die Zellen mit 7ml Trypsin-EDTA überschichtet, um die an der Kulturflasche haftenden Zellen abzulösen. Diese Reaktion wurde durch 3-minütige Inkubation bei 37°C beschleunigt. Nun wurde das Trypsin-EDTA mit 10ml Endothelzell-Medium verdünnt, um die Reaktion zu stoppen. Der Boden der Flasche wurde noch mehrmals mit der Lösung überspült, um die restlichen, noch locker haftenden Zellen vollständig abzulösen. Dann wurde die Zellsuspension in ein 50ml Falcon überführt und für 5 Minuten zentrifugiert (300xg, bei Raumtemperatur, mit Bremse). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 3ml HUVEC-Medium gelöst und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend konnte die Zellsuspension auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt und für die weitere Kultivierung bzw. für den Flusskammerversuch verwendet werden.

Für den Flusskammerversuch wurde die Zellsuspension auf eine Zellkonzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt.

2.2.3 Nachweismethoden für Cyclophilin B

2.2.3.1 Immunhistochemische Vorgehensweise

Durch die Immunhistochemie können in einem histologischen Gewebeschnitt bestimmte Proteine mit Hilfe von markierten Antikörpern nachgewiesen werden. Der Antikörper bindet mit einer bestimmten Affinität an das zu untersuchende Epitop in den Gewebeschnitten und kann durch das an ihn gekoppelte Detektionssystem sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise erhält man an dem Ort, an dem das Epitop vorhanden ist, ein Signal und kann so das Vorhandensein des Epitops in bestimmten Gewebeabschnitten bzw. Zellabschnitten lokalisieren.

Ist das Detektionssystem direkt an den an das Epitop bindenden Antikörper gekoppelt, spricht man von direkter Immunhistochemie. Wird ein mit dem Detektionssystem gekoppelter, sekundärer Antikörper gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers verwendet, spricht man von indirekter Immunhistochemie.

Es gibt eine Reihe von verschiedenen Detektionssystemen. Die verwendeten Antikörper können entweder mit einem Fluorochrom markiert sein, und das nachzuweisende Epitop auf diese Weise sichtbar machen, oder an Enzyme gekoppelt sein, die eine Enzym-Substrat-Reaktion auslösen, mit deren Hilfe eine zunächst noch farblose Substrat/Chromogen-Lösung in einen sichtbaren Farbstoff verwandelt wird.

Kommen fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper zum Einsatz, spricht man von Immunfluoreszenzfärbung.

2.2.3.2 Zum Nachweis von Cyclophilin B in atherosklerotischen Plaques von ApoE-*knockout*-Mäusen mittels indirekter Immunhistochemie

Ziel des im Folgenden geschilderten Versuchs war es, das Protein Cyclophilin B (CyPB) in der atherosklerotischen Plaque nachzuweisen. Die Immunhistochemie wurde deshalb nach der *Labeled Streptavidin-Biotin*-Methode (LSAB-Methode) durchgeführt (siehe Abb. 25).

Bei der LSAB-Methode handelt es sich um eine indirekte immunenzymatische Färbung. Sie beruht auf der Fähigkeit von Streptavidin (einem von *Streptomyces avidinii* synthetisierten Protein), an das Vitamin Biotin zu binden. Dabei kommen zunächst gegen das Epitop gerichtete, unkonjugierte Primärantikörper zum Einsatz. Diese werden mit biotinmarkierten sekundären Antikörpern detektiert. Durch Zugabe eines enzymmarkierten Streptavidin-Biotin-Komplexes, das an die biotinmarkierten Sekundärantikörper bindet, kann das nachzuweisende Epitop sichtbar gemacht werden. Hierzu wird das Chromogen DAB (3,3-Diaminobenzidin) verwendet. Dieses wird durch das an Streptavidin gekoppelte Enzym (aus dem Meerrettich stammende Peroxidase) im Sinne einer Enzym-Substrat-Reaktion zu einer braunen Substanz umgesetzt.

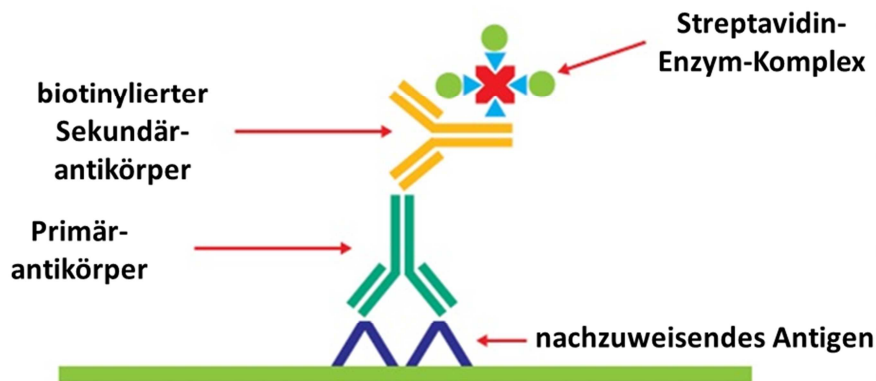


Abbildung 25: Prinzip der *Labeled Streptavidin-Biotin*- bzw. LSAB-Methode (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dako Deutschland GmbH, Hamburg ³⁵⁵)

Das nachzuweisende Antigen wird zunächst mit einem Primär-Antikörper markiert, an den ein biotinylierter Sekundärantikörper bindet. Dieser bindet seinerseits einen peroxidasemarkierten Streptavidin-Biotin-Komplex. Die Peroxidase setzt schließlich das zugegebene Chromogen DAB in einen braunen Farbstoff um, wodurch das Antigen sichtbar gemacht wird.

Für die Färbung wurden formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von Aorten von Apolipoprotein E (ApoE)-*knockout* Mäusen verwendet, die für 6 Wochen mit einer atherogenen Diät (1,25% Cholesterol-Gehalt) gefüttert wurden.

Für die Färbung der histologischen Gewebeschnitte war zunächst eine Entparaffinierung erforderlich. Dazu wurden die Objektträger zwei mal zehn Minuten in das Lösungsmittel Roti®-Histol eingelegt, danach folgte zur Rehydrierung eine absteigende Alkoholreihe. Dazu wurden die Objektträger jeweils 5 Minuten in 100%iges, 95%iges und 70%iges Ethanol eingelegt. Nach einem 30-sekündigen Waschschrift in Aqua dest. wurden die Objektträger in PBS überführt.

Anschließend wurden die Schnitte 15 Minuten in Citratpuffer (pH 6) gekocht. Dieses Verfahren dient der Demaskierung der Epitope. Durch die Fixierung des Gewebes mit Formalin kommt es zu Vernetzungen zwischen Membran-Proteinen und Formalinmolekülen. Dadurch werden die Antigene „maskiert“ und die Bindung des Primärantikörpers an das Epitop erschwert. Durch Erhitzung in Pufferlösungen (sogenannten *retrieval solutions*), wie dem Citratpuffer, werden die ausgebildeten Vernetzungen wieder aufgebrochen. Der Primärantikörper kann nun wieder an das Epitop binden.

Nachdem die Objektträger wieder abgekühlt waren, folgten drei Waschschriffe für jeweils zwei Minuten in Tween-PBS (0,05%). Dann wurden die Objektträger für 15 Minuten in Wasserstoffperoxid (3%ig, in Methanol verdünnt) inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Bei nicht ausreichender Blockierung der endogenen Peroxidase, kann diese im letzten Schritt der Färbung ebenfalls mit der DAB-Lösung reagieren und falsch positive Signale hervorrufen. Im Anschluss folgten weitere drei Waschschriffe in Tween-PBS.

Für die weitere Färbung wurden die einzelnen Schnitte auf den Objektträgern mit Fettstift umrandet, um ein Ineinanderlaufen der Antikörper zu verhindern und die benötigte Menge der Reagenzien zu reduzieren. Außerdem wurden die Schnitte von nun an waagrecht liegend in einer feuchten

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Inkubationskammer gefärbt. Die feuchte Umgebung ist vonnöten, um ein Verdunsten der fortan auf die Objektträger aufgetragenen Lösungen zu vermeiden.

Die Schnitte wurden danach für 20 Minuten in Proteinblockierungsreagenz inkubiert. Dieser Schritt dient dazu, unspezifische Färbereaktionen zu verhindern. Diese entstehen durch hydrophobe oder ionische Wechselwirkungen zwischen Antikörper und anderen als den nachzuweisenden Gewebekomponenten, insbesondere Kollagen- und Bindegewebselementen. Das Proteinblockierungsreagenz bindet an diese Komponenten und verhindert so diese Wechselwirkungen. Eine unspezifische Hintergrundfärbung kann hierdurch reduziert werden.

Anschließend wurde der 1:200 in PBS verdünnte, unkonjugierte Primärantikörper bzw. die Isotyp-Kontrolle auf die einzelnen Schnitte aufgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger zunächst fünfmal für zwei Minuten in Tween-PBS gewaschen, dann wurde der biotinylierte Sekundärantikörper aufgetragen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit konnte er an den Primärantikörper binden.

Im Anschluss wurde der Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex auf die einzelnen Schnitte aufpipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei bindet das Streptavidin, an das das Enzym Peroxidase gekoppelt ist, an den biotinylierten Sekundärantikörper. Dieser Schritt dient der Verstärkung des Signals, um auch kleine Antigen-Mengen detektieren zu können.

Während der Inkubationszeit wurde die Substrat-Chromogen-Lösung angesetzt. Dazu wurde 1ml DAB-Puffer mit 1 Tropfen DAB-Substrat (Wasserstoffperoxid, H_2O_2) gemischt. Das in der Substrat-Chromogen-Lösung enthaltene H_2O_2 dient als Substrat für die Peroxidase. Es wird durch diese zu einem braunen Farbstoff oxidiert und macht das nachzuweisende Epitop schließlich sichtbar.

Im nächsten Schritt wird zunächst der Sekundärantikörper vom Objektträger abgekippt. Nach weiteren drei Waschschritten in Tween-PBS wurde dann die vorher angesetzte Substrat-Chromogen-Lösung auf die einzelnen Schnitte pipettiert und für 1 Minute einwirken gelassen.

Nach weiteren drei Waschschritten in Tween-PBS wurden die Schnitte 3 Minuten in Mayers Hämalaun gefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Anschließend wurden die Schnitte 10 Minuten in fließendem Leitungswasser gebläut.

Zuletzt folgte zur Entwässerung der Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe. Dazu wurden die Schnitte jeweils 5 Minuten in 70%igem, 80%igem, 90%igem, 95%igem und 100%igem Ethanol inkubiert. Nach zweimaliger, fünfminütiger Inkubation in Roti®-Histol wurden die Schnitte mit Roti®-Histokitt unter dem Abzug eingedeckelt. Nach einer zweitägigen Wartezeit, in der die eingedeckelten Schnitte trocknen konnten, fand die mikroskopische Beurteilung statt.

Die einzelnen Komponenten und deren Konzentrationen für die hier beschriebene Färbung sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 2: Verwendete Komponenten für die Immunhistologie und ihre Konzentrationen

Komponente	Konzentration	Hersteller-bezeichnung
Primärantikörper (<i>Rabbit polyclonal Antibody to Cyclophilin B</i>)	1µg/ml	Ab16045, abcam
IgG-Kontrolle (<i>Negative Control Rabbit Immunglobulin Fraction</i>)	1µg/ml	X0903, Dako
Sekundärantikörper (<i>Biotinylated Link Universal</i>)	unverdünnt	LSAB-Kit, Dako
Streptavidin-Biotin-(Meerrettich-)Peroxidase-Komplex (<i>Streptavidin-HRP</i>)	unverdünnt	LSAB-Kit, Dako
DAB-Lösung (<i>DAB+-Chromogen (3-3'-Diaminobenzidin-Chromogen-Lösung) + DAB+-Substrat-Puffer (pH 7,5; enthält Wasserstoffperoxid)</i>)	unverdünnt	LSAB-Kit, Dako

2.2.3.3 Zum Nachweis von Cyclophilin B in und auf Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung ist eine Methode zum Nachweis von Antigenen in Zellen oder Geweben mittels fluorochrom-gekoppelter Antikörper. Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung wird das nachzuweisende Antigen zunächst mit Hilfe eines spezifischen, unkonjugierten Antikörpers gebunden. In einem zweiten Schritt wird ein fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper eingesetzt, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Das an den Antikörper gekoppelte Fluorochrom wird durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und emittiert wiederum Licht einer anderen Wellenlänge, welches mithilfe des Fluoreszenzmikroskops detektiert wird.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden sogenannte *chamber slides* verwendet. Dabei handelt es sich um Objektträger, auf denen 16 abnehmbare Medienkammern für Zellkulturen aufgebracht sind (siehe Abb. 26). Dies ermöglicht die Färbung der Zellen direkt am Ort der Zellkultur.

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN



Abbildung 26: *Chamber slide* (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Sigma-Aldrich ³⁵⁶)

Für die Färbung der Monozyten wurden in einem *chamber slide* pro Vertiefung jeweils 100.000 Monozyten ausgesät und dort über Nacht belassen. In dieser Zeit konnten die in Lösung befindlichen Zellen am Boden des *chamber slide* adhären. Am nächsten Tag konnte die Färbung der Monozyten durchgeführt werden. Die Färbung von Makrophagen und Schaumzellen erfolgte nach Kultur der Zellen in *chamber slides* wie bereits beschrieben.

Die Zellen in den 8 rechten Kammern des *chamber slide* wurden für 2 Stunden bei 37°C mit 2µg/ml LPS stimuliert, die anderen Kammern des *chamber slide* blieben unstimuliert. Dann wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann für 15 Minuten mit 4%igem Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen und die Zellmembranen der Zellen in der unteren Reihe des *chamber slides* mit 0,2%igem Triton-X für 15 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert (siehe Abb. 27).

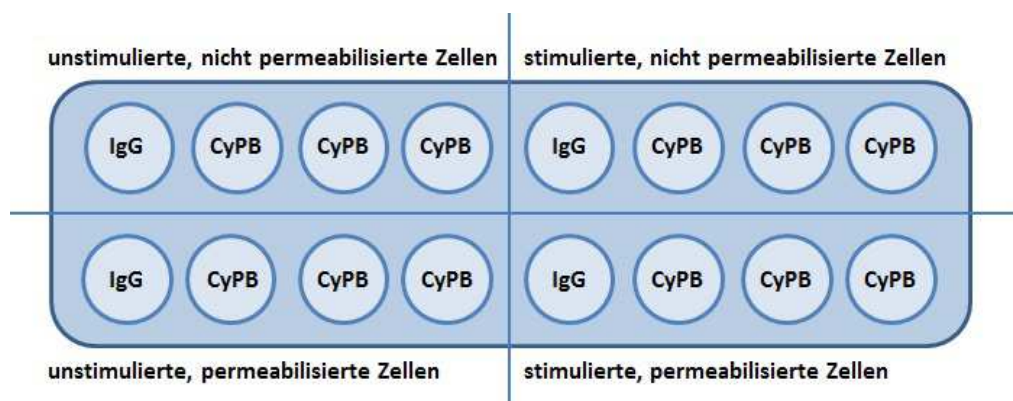


Abbildung 27: Einteilung der Reaktionskammern der *chamber slides* für die Immunfluoreszenzfärbung von Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen mit 3%igem bovines Serumalbumin (BSA, in PBS verdünnt) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt dient dazu, unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach einem weiteren Waschschrift wurde der mit PBS verdünnte Primärantikörper sowie die Isotyp-Kontrolle in die entsprechenden Vertiefungen gegeben (siehe Abb. 27) und bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Der Antikörper gegen CyPB wurde in einer Konzentration von 1µg/ml eingesetzt. Als Kontrolle wurde *rabbit-IgG* verwendet, das ebenfalls bei einer Konzentration von 1µg/ml angewendet wurde. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurde der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Sekundärantikörper mit PBS auf eine Konzentration von 10µg/ml verdünnt, in alle Vertiefungen gegeben und im Dunkeln für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Vertiefungen zweimal mit PBS gewaschen.

Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI), das in einer Konzentration von 300µg/ml eingesetzt wurde, für 3 Minuten im Dunkeln angefärbt. Nach weiteren zwei Waschschriften mit PBS wurden die Reaktionskammern des *chamber slide* abgenommen, der Objektträger mit *Fluorescence Mounting Medium* eingedeckelt und bis zum nächsten Tag im Dunkeln unter dem Abzug zum Trocknen aufbewahrt.

Am darauffolgenden Tag fand die Fluoreszenzmikroskopie statt. Der Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 besitzt ein Anregungsmaximum von 493nm und ein Emissionsmaximum von 519nm. Er weist damit eine Fluoreszenz im grünen Spektralbereich auf. Entsprechend seiner Absorptions- und Emissionsmaxima wurde ein Anregungsfilter mit einer Wellenlänge von 450-490nm verwendet, und ein Emissionsfilter mit einer Wellenlänge von 520nm. DAPI besitzt ein Anregungsmaximum von 358nm und ein Emissionsmaximum von 461nm und fluoresziert somit im blauen Bereich des Lichtspektrums. Dementsprechend wurde hier ein Anregungsfilter mit einer Wellenlänge von 340-380nm verwendet, und ein Emissionsfilter mit einer Wellenlänge von 435-485nm.

Die einzelnen Komponenten und deren Konzentrationen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tabelle 3: Verwendete Komponenten für die Immunfluoreszenzfärbung und ihre Konzentrationen

Antikörper	verwendete Konzentration	Herstellerbezeichnung
Primärantikörper (<i>Rabbit polyclonal Antibody to Cyclophilin B</i>)	1µg/ml	Ab16045, abcam
IgG-Kontrolle (<i>Negative Control Rabbit Immunglobulin Fraction</i>)	1µg/ml	X0903, Dako
Sekundärantikörper (<i>Alexa Fluor® 488 goat-anti-rabbit IgG (H+L) Antibody</i>)	10µg/ml	A-11008, Gibco Invitrogen
DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol)	300µg/ml	D9542, Sigma-Aldrich GmbH

2.2.3.4 Zum Nachweis von Cyclophilin B auf der Oberfläche von Thrombozyten mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode dar, bei der Zellen einzeln an einem Laser vorbeigeleitet werden. Dabei wird die Lichtbrechung an den Partikeln gemessen. Das hierbei erzeugte Streulicht (*light scatter*) wird in 2 Komponenten aufgeteilt: Der *forward scatter* (FSC - Vorwärts-Streulicht) liefert Informationen über die Größe des Partikels, der *side scatter* (SSC - Seitwärts-Streulicht) liefert Informationen über seine Granularität, also den Gehalt an Granula in dem Partikel. Diese Werte sind für jede Zellart individuell und es lassen sich somit einzelne Zelltypen aus einer heterogenen Probe unterscheiden und zählen.³⁵⁹

Eine besondere Form der Durchflusszytometrie stellt die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie dar. Dabei werden die Zellen zusätzlich mit einem fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper markiert. Durch das Laserlicht wird der Fluoreszenzfarbstoff angeregt und emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge. Mit Hilfe dieses emittierten Fluoreszenzsignals können antikörpermarkierte Rezeptoren auf der Zelloberfläche qualitativ und quantitativ identifiziert werden.³⁵⁹

Durch die Kombination aus Lichtbrechung und emittiertem Fluoreszenzsignal kann ein genaueres Bild über die Eigenschaften eines Partikels gewonnen werden.³⁵⁹

Für die fluoreszenz-durchflusszytometrischen Versuche in dieser Arbeit wurde das Durchflusszytometer FACSCalibur™ verwendet.

Thrombozyten wurden, wie im Kapitel 2.2.2.1 beschrieben, isoliert. Anstelle von Tyrodes-Puffer wurde zur Isolierung allerdings PBS, das mit Kalziumchlorid (CaCl_2 , 0,9mM) und Magnesiumchlorid (MgCl_2 , 0,49mM) versetzt war, verwendet. Nach der Gewinnung des plättchenreichen Plasmas wurde die Zellzahl auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und jeweils 100µl dieser Zellsuspension in 10 Rundbodenröhrchen gegeben. Jeweils 2 der Röhrchen wurden mit 20µM ADP, 25µM *Thrombin receptor-activating peptide* (TRAP), 10µg/ml *Collagen-related peptide* (CRP) bzw. 0,1U/ml Thrombin für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die übrigen 2 Röhrchen wurden als Negativ- bzw. Isotyp-Kontrolle unstimuliert belassen.

Im Anschluss wurden die Thrombozyten mit den Antikörpern markiert. Hierfür wurden zunächst *ungelabelte* Primärantikörper, also solche die nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert waren, verwendet. In einem zweiten Schritt wurden diese dann mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten (*gelabelten*) Sekundärantikörper markiert, damit sie im Durchflusszytometer detektiert werden konnten.

Die Röhrchen mit den stimulierten Thrombozyten und eines der Röhrchen mit unstimulierten Thrombozyten wurden in einem ersten Schritt für 30 Minuten mit einem gegen CyPB gerichteten Primärantikörper (Konzentration: 15µg/ml) inkubiert. Dann folgte ein Waschschriff mit PBS. Dazu wurde jeweils 1ml PBS in die Rundbodenröhrchen gegeben und im Anschluss für 5 Minuten bei 200xg zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen wieder in 100µl PBS mit CaCl_2 und MgCl_2 resuspendiert.

Im Anschluss wurde der gebundene Primärantikörper mit einem Alexa Fluor® 488-*gelabelten* Sekundärantikörper markiert, der gegen die Tierart, in der der Primärantikörper generiert wurde, gerichtet ist. Dazu wurden die Thrombozyten für 30 Minuten unter Lichtausschluss mit 15µl des

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Alexa Fluor® 488-Antikörpers inkubiert. Nach der Einwirkung des Sekundärantikörpers erfolgte ein weiterer Waschschrift in der oben beschriebenen Methode, um nicht gebundene Antikörper aus der Zellsuspension zu entfernen.

Die Färbung des verbleibenden Röhrchens diente der Isotyp-Kontrolle. Die unstimulierten Thrombozyten wurden nach demselben Protokoll gefärbt wie die anderen Zellen, mit dem Unterschied, dass hier anstelle des Primärantikörpers ein aus dem Hasen stammender IgG-Antikörper (Konzentration: 15µg/ml) verwendet wurde.

Das Zellpellet wurde schließlich in 300µl 0,5%igem Paraformaldehyd resuspendiert und fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers detektiert und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) gemessen. Die Stärke der Fluoreszenz dient dabei als Indikator für die gebundene Antikörpermenge.

Die einzelnen Antikörper für die Detektion und die Quantifizierung der Thrombozyten mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper für die Färbung der Thrombozyten und ihre Konzentrationen

Antikörper	verwendete Konzentration	Herstellerbezeichnung
Primärantikörper (<i>Rabbit polyclonal Antibody to Cyclophilin B</i>)	15µg/ml	Ab16045, abcam
IgG-Kontrolle (<i>Rabbit IgG</i>)	15µg/ml	sc-2027, Santa Cruz
Sekundärantikörper (<i>Alexa Fluor® 488 donkey-anti-rabbit Antibody</i>)	300µg/ml	A-21206, Gibco

2.2.4 Wirkung von Cyclophilin B auf Monozyten

2.2.4.1 Zum Nachweis der veränderten enzymatischen Aktivität von Matrix Metalloproteinasen mittels SDS-PAGE (*Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel-electrophoresis*)-Gelatine-Zymographie

Die Zymographie ist eine auf einer SDS-PAGE (*Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel-electrophoresis*) basierende Methode, mit deren Hilfe die Matrix Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden können.

Die bei dieser Methode verwendeten Polyacrylamidgele werden mit einer unterschiedlich großen Menge Gelatine versetzt, die als Substrat für die MMPs dient und von den Gelatinasen abgebaut wird. Dies wird bei der abschließenden Färbung der Gele zur Sichtbarmachung der MMPs genutzt.

Im vorliegenden Versuch wurden die Überstände von Monozytenkulturen auf das Vorhandensein der MMPs untersucht. Die Monozyten wurden hierfür wie im Kapitel 2.2.2.2 beschrieben isoliert und jeweils 2×10^5 Zellen/200µl Monozytenmedium in die Vertiefungen von 96-Loch-Platten ausgesät. Nach einer dreistündigen Inkubationszeit bei 37°C, während der die Monozyten wieder adhären konnten, wurde das Medium vorsichtig abgenommen und gegen 100µl frisches Monozytenmedium ausgetauscht. Nun wurden die Zellen mit CyPB (Konzentration: 100nM bzw. 200nM) für 18 Stunden inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellkulturüberstände von Monozyten verwendet, die lediglich in Monozytenmedium ohne weitere Zugaben kultiviert wurden, als Positivkontrolle diejenigen von Lipopolysaccharid (LPS)-stimulierten Monozyten (LPS-Konzentration: 2µg/ml). Nach Ablauf der 18 Stunden wurden die Überstände abgenommen und konnten für die Zymographie weiter bearbeitet werden.

Alle Überstände wurden zunächst im Verhältnis 1:10 verdünnt. Dann wurden jeweils 20µl der Probe mit 5µl nicht reduzierendem Ladepuffer (5x) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Puffer enthält das anionische Tensid *Sodium dodecylsulfate* (SDS), das eine reversible Inaktivierung der Proteasen bewirkt und durch seine anionischen Eigenschaften die Eigenladung der MMPs überdeckt.

Während der Inkubationszeit wurde die Elektrophoresekammer mit einem Zymogram-Gel (mit 10% Gelatine) beladen und die Kammer bis über den oberen Rand des Gels mit auf 4°C gekühltem Laufpuffer, der ebenfalls SDS enthält, gefüllt. Dann wurden die Proben und ein Proteinstandard (*Seebblue® Plus2 Prestained Standard*) vorsichtig in die Taschen des Gels pipettiert.

Nach Verschließen der Kammer wurde eine elektrische Spannung angelegt, die die Migration der negativ geladenen Proteine durch das Gel von der Anode in Richtung Kathode bewirkt. Dabei werden sie entsprechend ihrer molekularen Masse (MMP-2: 72kDa, MMP-9: 92kDa) aufgetrennt.

Die Spannung wurde zunächst auf 60V eingestellt, bis die Proben ein Stück weit in das Gel gewandert waren und dort eine horizontale Linie bildeten. Dann wurde sie auf 80V erhöht. Sobald die Banden des Markers eine gute Auftrennung zeigten, wurden die Gele entnommen und zur Entfernung des SDS zweimal in Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die Gele für 30 Min. in 1:10 verdünntem, auf 37°C angewärmten Renaturierungspuffer auf dem Schüttler inkubiert, wodurch die

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

MMPs in ihre enzymatisch aktive Form zurückversetzt wurden. Nach einem kurzen Waschschrift in 1:10 verdünntem Entwicklungspuffer wurden die Gele nochmals für 30 Min. auf dem Schüttler in Entwicklungspuffer inkubiert. Schließlich wurde der Entwicklungspuffer erneut gegen frischen ausgetauscht und die Gele darin über Nacht bei 37°C belassen. Während dieser Zeit konnten die MMPs die Gelatine in den Gelen verdauen.

Am nächsten Tag wurden die Gele für 30 Minuten auf dem Schüttler in Coomassie Brilliant Blau gefärbt und anschließend solange in Aqua dest. gespült, bis die transparenten Banden auf dem blaugefärbten Gelhintergrund sichtbar wurden.

Zuletzt wurden die Gele mit Hilfe eines Spannrahmens und *GelDry™ Drying Solution* zwischen zwei Zellophanfolien für 2 Tage getrocknet und die Banden schließlich densitometrisch ausgewertet. Dazu wurden die Gele zunächst als schwarz-weiß-Bild eingescannt, die Farben invertiert und die Intensität der Banden mit Hilfe eines Grafikprogrammes (ImageJ) gemessen. Die dabei gewonnenen Daten konnten im Anschluss statistisch ausgewertet werden.

2.2.4.2 Zum Nachweis der Migrationwirkung von Cyclophilin B mittels Chemotaxis-Assay

Die Migration von Monozyten entlang eines chemotaktischen Gradienten spielt bei der Atherosklerose eine wichtige Rolle. Dabei spielen insbesondere MCP-1 sowie in geringerem Umfang auch oxidativ modifiziertes LDL als chemotaktisch wirksame Moleküle eine wichtige Rolle.^{52,54,56,69}

Ziel des hier angewendeten Chemotaxis-Assays war es, herauszufinden, ob CyPB als chemotaktisch wirksames Agens für Monozyten wirkt und ob diese entlang eines CyPB-Gradienten migrieren können. Darüber hinaus sollte im gleichen Ansatz geklärt werden, ob die Wirkung von CyPB durch die Cyclosporin A-Derivate NIM811 und MM284 inhibiert werden kann.

In dieser Versuchsanordnung wurde ein 2-Kammer-System mit 48 Reaktionskammern verwendet (*48-well Micro Chemotaxis Chamber*) (siehe Abb. 28). Dabei befand sich im unteren Teil der Kammer die zu untersuchende Substanz und im oberen Teil der Kammer die Monozyten. Dazwischen wurde eine Gummidichtung eingelegt, die an den Stellen, an denen die beiden Reaktionskammern miteinander in Verbindung stehen, Aussparungen aufweist. Hierdurch sollte ein Ineinanderfließen der verschiedenen Substanzen in den unterschiedlichen Kammern verhindert werden. Außerdem wurde ein Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von 5µm zwischen den unteren und oberen Teil der Apparatur eingelegt, den die Monozyten bei ihrer Migration nicht überwinden konnten. Sie bleiben daran hängen, konnten darauf fixiert und anschließend mikroskopisch ausgezählt werden.

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN



Abbildung 28: Migrationskammer (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Neuroprobe Inc., Gaithersburg, Maryland, USA ³⁵⁷)

Die Migration fand bei 37°C im Brutschrank statt. Es wurden zwei Versuchsanordnungen durchgeführt: bei der ersten Variante wurde der Filter nach einer Migrationsdauer von 4 Stunden ausgewertet, bei der zweiten nach 18 Stunden.

Zum Beladen der Migrationskammer wurden zunächst die Kammern im unteren Teil der Apparatur mit jeweils 28µl der in Monozytenmedium gelösten Testsubstanzen befüllt:

Im Ansatz für den 4-Stunden-Test wurden die Vertiefungen mit CyPB (Konzentration: 200nM) sowie CyPB (Konzentration: 200nM) in Kombination mit dem sowohl intra- als auch extrazellulär wirkenden Cyclosporin A-Derivat NIM811 (Konzentration: 200nM) bzw. dem rein extrazellulär wirkenden Cyclosporin A-Derivat MM284 (Konzentration 800nM) befüllt. In eine der Vertiefungen wurde als Positivkontrolle Monozytenmedium, das mit *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1, Konzentration: 50ng/ml) versetzt wurde, gegeben, in eine andere Monozytenmedium ohne Zusätze als Negativkontrolle.

Im Ansatz für den 18-Stunden-Test wurden die Vertiefungen mit CyPB in einer Konzentrationsreihe (Konzentrationen: 100nM, 200nM, 400nM sowie 800nM), sowie CyPB (Konzentration: 200nM) in Kombination mit dem sowohl intra- als auch extrazellulär wirkenden Cyclosporin A-Derivat NIM811 (Konzentration: 200nM) bzw. dem rein extrazellulär wirkenden Cyclosporin A-Derivat MM284 (Konzentration: 800nM) befüllt. Wie beim 4-Stunden-Test wurde auch hier in eine Vertiefung Monozytenmedium mit *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1, Konzentration: 50ng/ml) als Positivkontrolle gegeben, in eine andere Monozytenmedium ohne Zusätze als Negativkontrolle.

Bei der Kombination von CyPB mit NIM811 bzw. MM284 wurden die beiden Substanzen in beiden Versuchsansätzen jeweils für eine halbe Stunde vor dem Lösen in Monozytenmedium und Befüllen der Kammer kokubiert.

Anschließend wurde der Filter kurz in Monozytenmedium inkubiert, kurz antrocknen gelassen und luftblasenfrei auf den unteren Teil der Kammer aufgebracht. Darüber wurde die Gummidichtung gelegt, die ein Ineinanderlaufen der verschiedenen Ansätze verhindern sollte, sowie die obere Platte und die Apparatur vorsichtig zusammengeschraubt.

Nun wurden die oberen Vertiefungen mit 50 µl Monozytensuspension (Konzentration: 4×10^5 Zellen/ml, entsprechend 20.000 Zellen pro Vertiefung) befüllt. Dabei kamen in die Vertiefungen, die über denjenigen mit der Kombination aus CyPB und NIM811 bzw. MM284 liegen,

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

zusätzlich jeweils NIM811 bzw. MM284 (Konzentration: 200nM), um einen Konzentrationsgradienten bei diesen Substanzen zu verhindern.

Zuletzt wurde die gesamte Migrationskammer in Frischhaltefolie eingewickelt, um ein Verdunsten des Mediums zu verhindern, und für 4 bzw. 18 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach dieser Zeit wurde der Filter vorsichtig aus der Migrationskammer entnommen, wobei darauf geachtet werden musste, dass die Zellseite des Filters nicht berührt wird. Die auf dem Filter haftenden Zellen wurden dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Methanol fixiert. Anschließend wurde der Filter 3 Minuten in Eosin-Methylenblau-Lösung nach May-Grünwald gefärbt, dann für 1 Minute in Aqua dest. gewaschen und zuletzt in 1:10-verdünnter Giemsa-Lösung 15 Minuten inkubiert. Nach dem abschließenden Spülen mit Aqua dest. wurde der Filter auf einen Objektträger aufgelegt, und mit Roti®-Histokitt unter einem Deckgläschen eingedeckelt.

Ausgewertet wurde der Filter durch mikroskopische Auszählung der haftengebliebenen Zellen auf der gesamten Fläche der jeweiligen Vertiefung bei 200facher Vergrößerung.

Dabei wurde die Gesamtzahl der migrierten Zellen bei der Positivkontrolle (MCP-1) gleich 100% gesetzt. Die Anzahl der migrierten Zellen bei der Negativkontrolle bzw. bei den Testsubstanzen wurden dazu prozentual ins Verhältnis gesetzt.

Die Substanzen, die für den oben beschriebenen Assay verwendet wurden, sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Tabelle 5: Verwendete Substanzen für den Chemotaxis-Assay und ihre Konzentrationen

Ansatz	Substanz und eingesetzte Konzentration
A	100nM CyPB
B	200nM CyPB
C	400nM CyPB
D	800nM CyPB
E	200nM CyPB + 200nM NIM811
F	200nM CyPB + 200nM MM284
G	50ng/ml MCP-1 (Positivkontrolle)
H	reines Monozytenmedium (Negativkontrolle)

2.2.5 Wirkung von Cyclophilin B auf Thrombozyten

2.2.5.1 Zum Nachweis der Interaktionen von Thrombozyten mit Gefäßwandkomponenten mittels Flusskammerversuch

Der Flusskammerversuch dient als ein *in vitro*-Modell, in dem die physikalischen Bedingungen, die in Endstromgebieten von Blutgefäßen vorherrschen, nachgestellt werden können.

Die zu untersuchenden, in Lösung befindlichen Zellen werden mit Hilfe einer Perfusionspumpe an einer stationären Phase, die die Gefäßwand simuliert, vorbeigeleitet. Dabei lassen sich die Interaktionen zwischen diesen Zellen und der stationären Phase, wie beispielsweise das *rolling* oder die feste Adhäsion, genauer untersuchen.

2.2.5.1.1 Aufbau der Flusskammer

Die Flusskammer (siehe Abb. 29) besteht aus einem Metallgestell, auf den ein Plexiglasblock mit 25mm Durchmesser und einem längsovalen Sichtfenster aufgebracht ist, an dessen Enden sich Öffnungen für den Zu- und Abfluss der Zellsuspension befinden. Dieser Block bildet den Boden des Flusskanals. Auf ihn wird ein 0,5mm hoher Dichtungsring aufgelegt, der den Flusskanal seitlich begrenzt. Durch ihn werden die Zellen einerseits innerhalb eines bestimmten Flusskanals geleitet, andererseits kann durch die Höhe des Dichtungsringes die vorherrschende Schubspannung variiert werden. Anschließend wird ein Deckgläschen aufgelegt, das mit den zu untersuchenden Substanzen beschichtet wurde. Dieses bildet die Decke des Flusskanals. Gummidichtung und Deckgläschen werden mit einem Spannrings auf der Flusskammer befestigt.



Abbildung 29: Aufbau der Flusskammer (Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Provitro AG, Berlin; Abbildung modifiziert nach ³⁵⁸)

Die Flusskammer besteht aus einem Korpus, auf dem ein mit den gewünschten Substanzen beschichtetes Deckgläschen aufgelegt werden kann. Zwischen Korpus und Deckgläschen befindet sich eine Gummidichtung, die die Zellen entlang eines Kanals mit definierter Höhe durch die Kammer leitet. Deckgläschen und Gummidichtung werden mithilfe eines Spannrings am Korpus befestigt.

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die zu untersuchenden Zellen werden mit Hilfe eines Perfusors mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit durch die Flusskammer geleitet. Die Interaktionen zwischen Zellen und stationärer Phase können dabei unter dem Mikroskop beobachtet und mit Hilfe einer Kamera und eines DVD-Recorders für die spätere Auswertung aufgezeichnet werden (Versuchsaufbau siehe Abb. 30).



Abbildung 30: Aufbau des Arbeitsplatzes für die Flusskammer

Oben: Versuchsausrüstung mit Perfusor, Flusskammer, Mikroskop, Kamera, Monitor und DVD-Recorder.

Unten: Flusskammer mit zuführender Flüssigkeitsleitung, Abflussleitung und Abfallauffangschale. Mit Hilfe des Perfusors werden die Zellen durch die Flusskammer geleitet. Die Zellinteraktionen werden mittels eines inversen Mikroskops am Monitor beobachtet und mit einer Kamera sowie einem DVD-Recorder für die spätere Auswertung aufgezeichnet.

Im vorliegenden Versuch wurden die Interaktionen von Thrombozyten mit den folgenden stationären Phasen untersucht:

- a) Deckgläschen mit Kollagenbeschichtung
- b) Deckgläschen mit Endothelzell-Beschichtung (HUVECs)
- c) Deckgläschen beschichtet mit verschiedenen rekombinanten Proteinen

2.2.5.1.2 Beschichtung der Deckgläschen

Die Deckgläschen wurden zunächst in den Vertiefungen von 6-Loch-Platten verteilt, wobei in jede Vertiefung 1 Deckglas gegeben wurde. In diesen wurden die Deckgläschen dann für 1 Stunde zur Desinfektion in 70%iges Ethanol eingelegt. Anschließend wurden sie mit Hilfe einer sterilen Pinzette für 10 Minuten zum Trocknen an den Rand der Vertiefungen gelehnt. Danach wurden sie zurück in die Vertiefungen gelegt und je nach Versuchsansatz mit unterschiedlichen Substanzen beschichtet:

Für den ersten Versuchsansatz wurden die Deckgläschen zunächst mit Kollagenlösung (Konzentration: 10µg/ml) beschichtet und vor der Verwendung für 16 Stunden bei 4°C inkubiert.

Für den zweiten Versuchsansatz wurden die Deckgläschen mit Endothelzellen (HUVECs) beschichtet. Dazu wurden die Deckgläschen zunächst mit 0,2%iger Gelatine für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wurden die HUVECs wie im Kapitel 2.2.2.5 beschrieben von der Zellkulturflasche abgelöst und auf eine Zellkonzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Nach dem Abpipettieren der überschüssigen Gelatine aus den Vertiefungen der 6-Loch-Platten, konnten die Deckgläschen mit den Endothelzellen beschichtet werden. Dazu wurden 2ml der Endothelzell-Suspension in jede Vertiefung der 6-Loch-Platten gegeben und im Brutschrank weiter kultiviert. Sobald die Zellen auf den Deckgläschen konfluent gewachsen waren, also ein Zellmonolayer entstanden war, konnten die Deckgläschen für den Versuch verwendet werden. Dies war je nach Passagezahl der HUVECs normalerweise schon am nächsten oder übernächsten Tag der Fall. Am Versuchstag mussten die Endothelzellen zunächst aktiviert werden. Dazu wurden das Medium 6 Stunden vor Versuchsbeginn mit Interferon- γ (IFN- γ) in einer Konzentration von 50ng/ml und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) in einer Konzentration von 20ng/ml versetzt.

Für den dritten Versuchsansatz wurden die Deckgläschen zunächst wieder mit 0,2%iger Gelatine beschichtet und anschließend mit verschiedenen rekombinanten Proteinen gecoatet.

Für die Beschichtung mit Gelatine wurden die Deckgläschen zunächst für 15 Minuten bei 37°C mit 0,2%iger Gelatine inkubiert. Danach wurde die Gelatinelösung abgesaugt, die Deckgläschen kurz mit PBS gespült und dann für 20 Minuten mit 2%igem BSA inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS konnten die Deckgläschen mit den zu untersuchenden rekombinanten Proteinen gecoatet werden.

Hierfür wurde sowohl rekombinantes, humanes CyPA, CyPB bzw. CD147-Fc (EMMPRIN-Fc) verwendet. Als Negativkontrolle für CyPA und CyPB wurden BSA-beschichtete Deckgläschen eingesetzt, als Negativkontrolle zu CD147-Fc (EMMPRIN-Fc) wurden die Deckgläschen mit humanem IgG-Fc-Fragment-beschichtet.

Für die Beschichtung mit den oben genannten Proteinen wurden die Deckgläschen jeweils für 15 Minuten bei 37°C mit den Proteinen inkubiert. Dazu wurde zunächst die PBS-Spüllösung aus den Vertiefungen abgesaugt. Daraufhin wurde je 1ml der Proteinlösung in der benötigten Konzentration in die Vertiefungen pipettiert. CD147-Fc (EMMPRIN-Fc) wurde in einer Konzentration von 20µg/ml verwendet, CyPA und CyPB in einer Konzentration von 200nM. Als Kontrolle wurde humanes IgG-Fc-Fragment in einer Konzentration von 20µg/ml bzw. 2%iges BSA verwendet.

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.2.5.1.3 Durchführung des Flusskammerversuchs mit kollagen- bzw. endothelzellbeschichteten Deckgläschen

Die Thrombozyten wurden am Versuchstag wie beschrieben isoliert und die Zellzahl ermittelt. Dann wurde die Zellsuspension auf 7 Eppendorfgefäße verteilt und bis zur Verwendung im Brutschrank gelagert.

Die einzelnen Portionen wurden dann je nach Versuchsanordnung zeitversetzt für 30min bei 37°C mit den zu testenden Proteinen (CyPB, NIM811, MM284, ADP) inkubiert, sodass die Zellsuspensionen nach Ablauf der Inkubationszeit sofort für den Flusskammerversuch verwendet werden konnten. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Thrombozyten verwendet.

Die verwendeten Reagenzien für die Stimulation der Thrombozyten und deren Konzentrationen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellsuspensionen dann mit Tyrodes-Puffer (pH 7,4), der auf 37°C angewärmt war, auf eine Zellkonzentration von 4×10^7 Zellen/ml eingestellt, in Perfusorspritzen gefüllt und diese mit einem Dreiwegehahn versehen, über welchen später die Verbindung zur Flusskammer hergestellt werden konnte.

Tabelle 6: Verwendete Substanzen zur Stimulation von Thrombozyten für den Flusskammerversuch und ihre Konzentrationen

Ansatz	Substanz und eingesetzte Konzentration
A	200nM CyPB
B	200nM CyPB + 200nM NIM811
C	200nM CyPB + 200nM MM284
D	200nM CyPB + 500nM MM284
E	200nM CyPB + 800nM MM284
F	20µM ADP (Positivkontrolle)
G	unstimuliert (Negativkontrolle)

Im Anschluss wurde ein kollagen- bzw. endothelzellbeschichtetes Deckgläschen in die Flusskammer eingelegt und dieses mit dem Spannring befestigt. Dann wurde die Perfusorspritze in der Perfusor eingelegt, mit der Zuleitung der Flusskammer verbunden und eine Flussgeschwindigkeit von 15ml/min eingestellt, was einer Scherrate von 2000 s^{-1} entspricht, wie sie in arteriellen Endstromgebieten vorherrscht. Vor den einzelnen Messungen wurde zunächst eine 10-minütige Vorlaufzeit abgewartet.

Dann wurden pro Deckgläschen 4 für den Versuchsansatz repräsentative Stellen ausgesucht und an diesen Stellen je eine Sequenz von 40 sec aufgezeichnet. Pro aufgezeichneter Sequenz wurden sowohl die rollenden als auch die fest adhärierenden Zellen an 4 Bildausschnitten quantifiziert. Dazu

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

wurde auch hierfür ein repräsentativer Bereich in jedem Quadranten des Monitors ausgewählt. Für die Auszählung der Zellen wurde eine Schablone mit einer Aussparung, die einer Fläche von $100\mu\text{m} \times 150\mu\text{m}$ entsprach, am Monitor aufgeklebt und die Zellen darin ausgezählt (siehe Abb. 31).

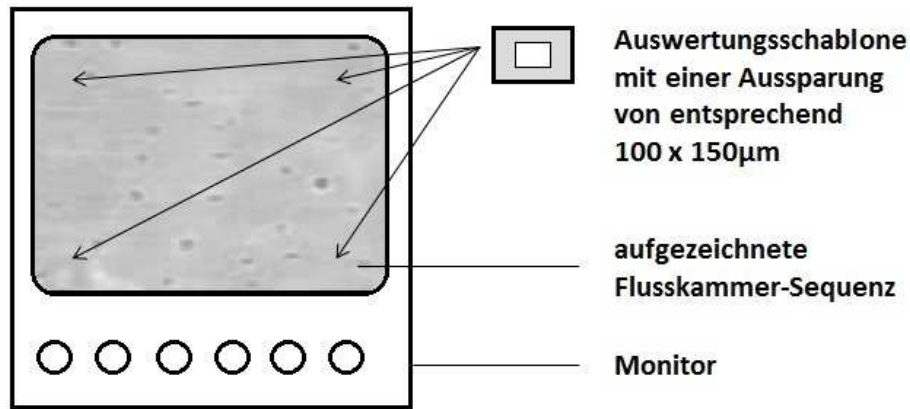


Abbildung 31: Schema zur Auswertung der Flusskammersequenzen

Mit Hilfe einer Auswertungsschablone wurden an 4 verschiedenen, repräsentativen Stellen die rollenden und adhärennten Zellen pro Videosequenz ausgezählt.

2.2.5.1.4 Durchführung des Flusskammerversuchs mit proteinbeschichteten Deckgläschen

Die Thrombozyten wurden am Versuchstag wie beschrieben isoliert und die Zellzahl ermittelt. Dann wurden die gesamten Zellen mit $20\mu\text{M}$ ADP für 30 Minuten im Brutschrank stimuliert, um die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Thrombozyten zu induzieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension mit Tyrodes-Puffer (pH 7,4) auf eine Zellzahl von 4×10^7 Zellen/ml verdünnt und auf 5 Perfusorspritzen verteilt.

Anschließend wurde ein Deckgläschen, das wie in Kapitel 2.2.5.1.2 beschrieben, mit den rekombinanten Proteinen CyPA, CypB, CD147-Fc (EMMPRIN-Fc), BSA sowie IgG-Fc-Fragment gecoatet wurde, in die Flusskammer eingelegt und mit dem Spannring befestigt. Der restliche Versuchsablauf erfolgt analog zu der im vorherigen Kapitel beschriebenen Methode.

2.2.6 In vivo-Versuch

2.2.6.1 Versuchstiere, Haltungsbedingungen, Tierversuchsantrag

Für den Tierversuch kamen Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6J zum Einsatz. Dabei wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet, die zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung ein Alter von 12-16 Wochen hatten.

Die Haltung der Tiere erfolgte in Kleingruppen von bis zu 5 Tieren in Käfigen, die mit entstaubtem und entkeimtem Weichholzgranulat aus Espenholz eingestreut waren. Als Beschäftigungs- und Nestbaumaterial wurde den Tieren sterilisierter Zellstoff zur Verfügung gestellt. Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung.

In der Tierhaltung herrschte eine durchschnittliche Raumtemperatur von 22°C. Ein Tag-Nacht-Rhythmus wird mit Hilfe einer Beleuchtungsanlage geregelt, bei einer Lichtdauer von 12 Stunden pro Tag.

Der Versuch wurde vom Regierungspräsidium Tübingen gemäß Tierschutzgesetz §8 unter der Versuchsnummer M7/14 genehmigt und gemäß der Richtlinien des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.2.6.2 Zum Nachweis der Cyclophilin B-Wirkung auf die Migration von inflammatorischen Zellen mittels einer Peritonitis-Induktion bei Wildtypmäusen (C57BL/6J)

2.2.6.2.1 Prinzip des Versuchs

Zur Untersuchung des Einflusses von CyPB auf die Migration von Leukozyten *in vivo* wurde ein Model, bei dem eine Peritonitis bei Mäusen (C57BL/6J) induziert wurde, angewendet.

Dabei wurde durch intraperitoneale Injektion einer reizenden Substanz eine sterile Peritonitis ausgelöst, in deren Rahmen es zu einer Auswanderung von Leukozyten in die Bauchhöhle kam. Durch eine Lavage der Bauchhöhle konnten die migrierten Entzündungszellen gewonnen werden. Im Anschluss wurden die einzelnen Zelltypen mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht.

2.2.6.2.2 Versuchsdurchführung

Die Mäuse wurden zur intraperitonealen Injektion der verschiedenen Substanzen kurzzeitig mit Isofluran narkotisiert und der hintere Bauchbereich desinfiziert. Dann wurden jeweils 500µl einer 4%igen Thioglykolat-Lösung bzw. einer 0,5%igen CyPB-Lösung (entsprechend 10µg CyPB pro Maus) im hinteren Drittel des Bauchs paramedian auf der linken Seite intraperitoneal injiziert. Beide Substanzen waren in 0,9%iger, physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Bei den Negativkontrolltieren wurde zur Injektion 500µl sterile physiologische Kochsalzlösung verwendet.

Zur Schmerztherapie wurde den Tieren zu Beginn des Versuchs und im weiteren Verlauf alle 8 Stunden 50µg Buprenorphin (entsprechend einer Dosierung von 25mg/kg Körpergewicht) subkutan injiziert.

Nach 24 Stunden wurden die Tiere erneut narkotisiert und dann durch zervikale Dislokation getötet. Im Anschluss erfolgte eine Bauchhöhlenlavage zur Gewinnung der in die Bauchhöhle gewanderten Entzündungszellen (siehe Abb. 32).

Dazu wurde den Tieren nach Desinfektion des Bauchbereichs zunächst 3ml PBS-Lösung und 2ml Luft intraperitoneal injiziert. Dann wurden die Tiere auf der Arbeitsfläche mehrfach hin und her gerollt, um die eingewanderten Leukozyten gleichmäßig in der Spülflüssigkeit zu verteilen. Im Anschluss wurde zunächst die Haut im Bauchbereich entfernt und ein kleiner Schnitt in der *Linea alba* gesetzt durch den die Spülflüssigkeit mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt werden konnte. Die Spülung der Bauchhöhle wurde noch fünf Mal mit jeweils 1ml PBS wiederholt, um die Entzündungszellen möglichst vollständig zu gewinnen.

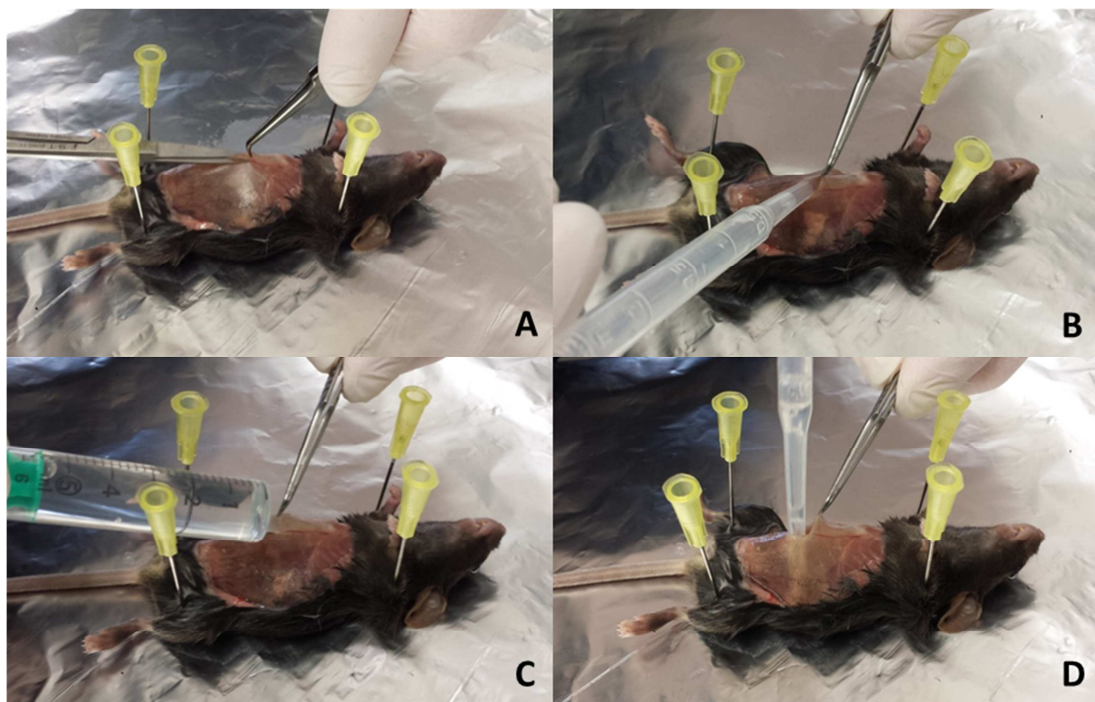


Abbildung 32: Durchführung einer Bauchhöhlenlavage bei der Maus

A) Eröffnung der mit Spüllösung und Luft gefüllten Bauchhöhle in der *Linea alba*. **B)** Absaugen der Spülflüssigkeit. **C und D)** Erneute Spülung der Bauchhöhle und Gewinnung der Spülflüssigkeit.

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Lavageflüssigkeit mit den gewonnenen Entzündungszellen wurde zentrifugiert (5 Minuten, 500xg, bei Raumtemperatur, mit Bremse), der Überstand verworfen und das Pellet in 1ml Lysepuffer, der vorwiegend aus Diethylenglykol und Formaldehyd besteht, resuspendiert, um beigemengte Erythrozyten zu entfernen. Danach wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt, jeweils 5×10^5 Zellen in Rundbodenröhrchen gegeben und für weitere 10 Minuten im Lysepuffer inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 Minuten, 500xg, bei Raumtemperatur, mit Bremse) wurde das entstandene Pellet in 200µl 0,5%igem Paraformaldehyd (PFA) resuspendiert und mit 10µl der Allophycocyanin (APC)-gekoppelten Antikörper im Dunkeln inkubiert.

Zur Bestimmung der unterschiedlichen Leukozyten-Subpopulationen wurden verschiedene Antikörper verwendet: F4/80 dient zur Identifizierung von Makrophagen. Mit CD11b können Monozyten, Makrophagen, Granulozyten sowie NK-Zellen detektiert werden. Bei Ly-6G handelt es sich um einen Marker für neutrophile Granulozyten und bei CD3 um einen Marker für T-Zellen.

Im Anschluss wurden die gefärbten Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers identifiziert und die Gesamtzellzahl der einzelnen Leukozyten-Arten berechnet.

2.2.6.2.3 Auswertung

Mit Hilfe des Durchflusszytometers wurden insgesamt 200.000 Zellen pro Rundbodenröhrchen gemessen. Die Anzahl der jeweils CD11b-, F4/80-, Ly-6G- und CD3-positiven Zellen wurden vom Durchflusszytometer gemessen und als Prozentwert angegeben.

Die Prozentzahl der CD11b-, F4/80-, Ly-6G- und CD3-positiven Zellen in der gesamten Lavage wurde mit folgender Formel berechnet: Gesamtzellzahl der Lavage x Gesamtvolumen der Lavage x Prozentwert der CD11b-, F4/80-, Ly-6G- und CD3-positiven Zellen.

2.2.7 Statistische Berechnungen

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M. – *Standard error of the mean*) angegeben. Der S.E.M. dient zur Berechnung der Streubreite der Mittelwerte und wird als Quotient aus der Standardabweichung und der Wurzel des Stichprobenumfangs definiert.

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe eines Statistikprogramms (Graphpad 6.0, Graphpad Software, La Jolla, USA). Zur Berechnung der Signifikanz wurde der Dunnett-Test herangezogen. Dabei wurde ein p-Wert von $p < 0,05$ als signifikant definiert und in den Schaubildern mit einem Stern * gekennzeichnet.

IV Ergebnisse

1 Zur Cyclophilin B-Expression in murinen atherosklerotischen Plaques

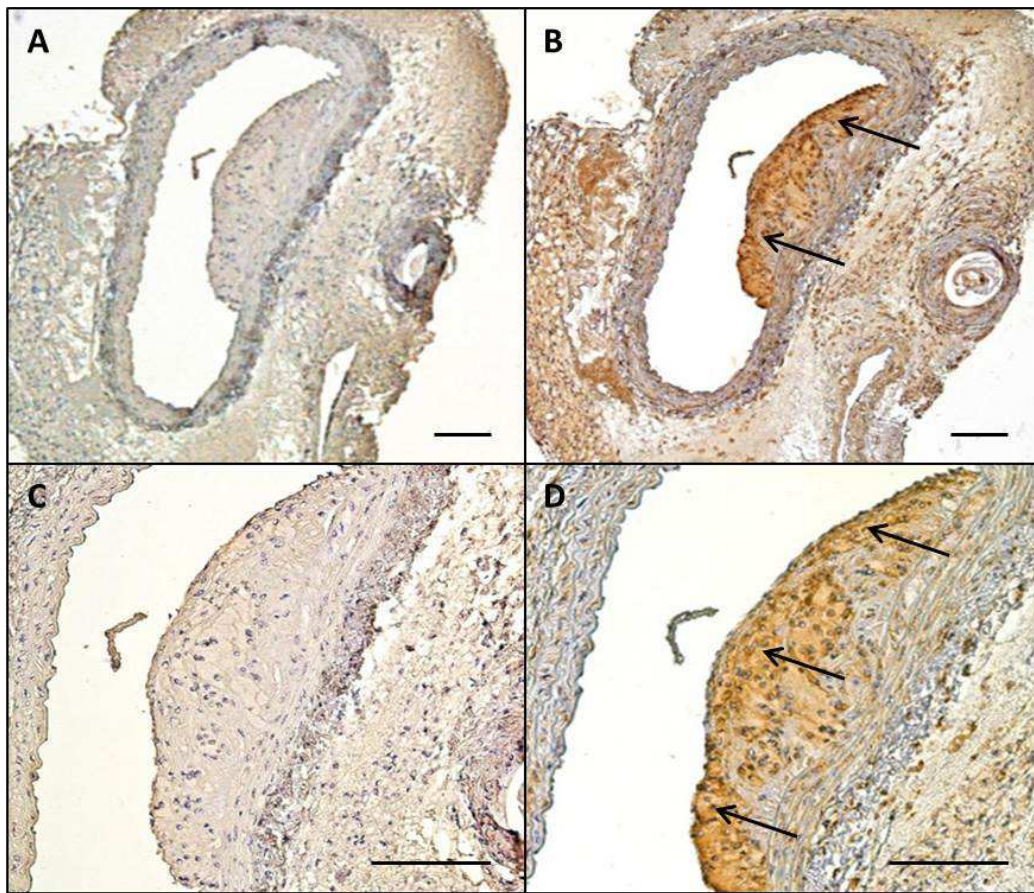
Zum Vorkommen von CyPB in der atherosklerotischen Plaque konnten in der Literatur keine Angaben gefunden werden.

Aus diesem Grund wurde die Expression von CyPB an Gewebeschnitten von atheromatös veränderten Gefäßabschnitten ApoE-defizienter Mäuse (Stamm: B6.129P2-Apoe^{tm1Unc}/J) mittels Immunhistochemie untersucht.

Die Tiere wurden vor ihrer schmerzlosen Tötung und der Entnahme der Aortenbögen 6 Wochen lang mit einer atherogenen Diät (1,25% Cholesterol-Gehalt) gefüttert, um die Plaquebildung zu fördern.

Die Färbung wurde mit Hilfe der *Labeled-Streptavidin-Biotin* (LSAB)-Methode durchgeführt. Dabei wurde ein Antikörper gegen CyPB (Konzentration: 1µg/ml) und als Kontrolle ein Isotyp-IgG in derselben Konzentration verwendet.

Die immunhistochemische Färbung der atherosklerotischen Plaques ergab im Vergleich zu unveränderten Gefäßabschnitten eine deutlich verstärkte Expression von CyPB in der Plaque. Innerhalb der Plaque konnte eine zusätzlich verstärkte Expression im Bereich der fibrösen Kappe nachgewiesen werden (siehe Abb. 33).



A und C: Isotyp-Kontrolle

B und D: CyPB-Detektion

Abbildung 33: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Detektion der CyPB-Expression in atherosklerotischen Plaques ApoE-defizienter Mäuse (Stamm: B6.129P2-Apoe^{tm1Unc}/J)

Bereiche, in denen CyPB exprimiert wird, stellen sich braun dar. Im Bereich der Plaque zeigt sich eine deutlich verstärkte Expression von CyPB im Vergleich zu unveränderten Gefäßabschnitten. Insbesondere die fibröse Kappe lässt eine verstärkte CyPB-Expression erkennen (siehe Pfeile).

A und B: 40fache Vergrößerung, **C und D:** 100fache Vergrößerung. Die Maßbalken rechts unten entsprechen 100µm.

2 Expression von Cyclophilin B in Monozyten

Mittels einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung wurde das Verteilungsmuster von CyPB sowohl an intakten, nicht permeabilisierten Monozyten als auch an Monozyten mit permeabilisierten Zellmembranen untersucht.

Da der Antikörper gegen CyPB die intakte Zellmembran nicht durchdringt, kann nach der Permeabilisierung der Zellmembran zwischen intrazellulär vorkommendem CyPB und solchem, das extrazellulär auf der Zellmembran lokalisiert ist, differenziert werden.

In beiden Monozyten Gruppen wurden jeweils ruhende Zellen mit LPS-aktivierten Zellen (LPS-Konzentration im Monozytenmedium: 2µg/ml, Stimulation für 2 Stunden bei 37°C) verglichen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen ergaben, dass CyPB auf der Zelloberfläche von Monozyten exprimiert wird (siehe Abb. 34 B1-B3 und C1-C3). Durch die zweistündige Stimulation der Zellen mit LPS konnte die Expression auf der Zelloberfläche verstärkt werden (siehe Abb. 34 C1-C3).

Durch die Immunfluoreszenzfärbung permeabilisierter Monozyten konnte eine Expression von CyPB im Zytoplasma der Monozyten nachgewiesen werden (siehe Abb. 35 B1-B3 und C1-C3). Die zweistündige Stimulation mit LPS löste keine Veränderung des Verteilungsmusters aus (siehe Abb. 35 C1-C3).

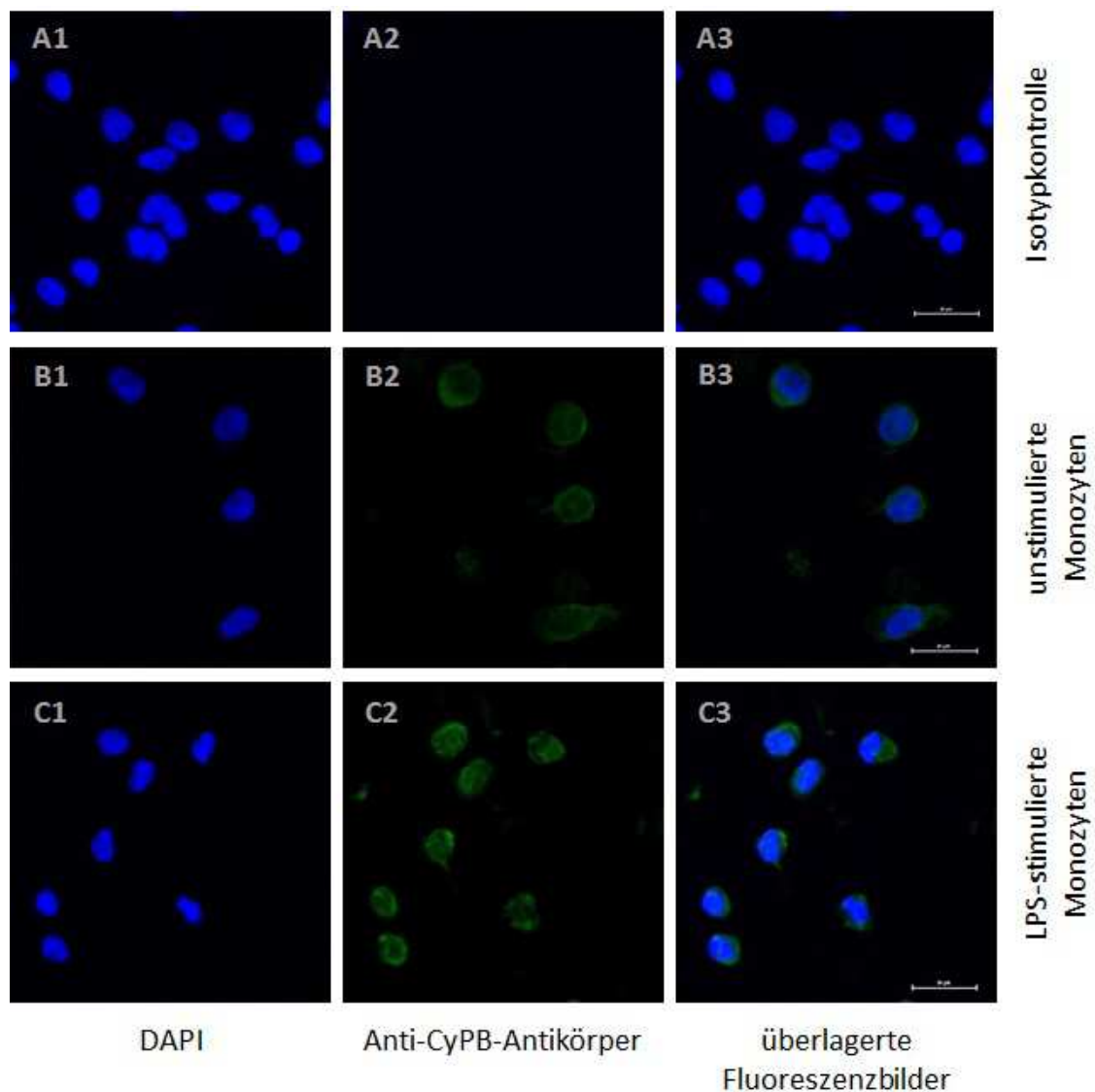


Abbildung 34: Exemplarische Darstellung der CyPB-Expression auf der Monozytenoberfläche

Nicht permeabilisierte Monozyten wurden mit einem Primärantikörper gegen CyPB markiert und dessen Bindung mittels eines Alexa Fluor® 488-markierten Sekundärantikörpers nachgewiesen (grüne Fluoreszenz). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blaue Fluoreszenz).

A1-A3) Isotyp-Kontrolle

B1-B3) CyPB wird auf der Zelloberfläche von Monozyten exprimiert.

C1-C3) Die Expression wird durch Stimulation der Monozyten mit LPS verstärkt.

Der Maßbalken entspricht 20µm.

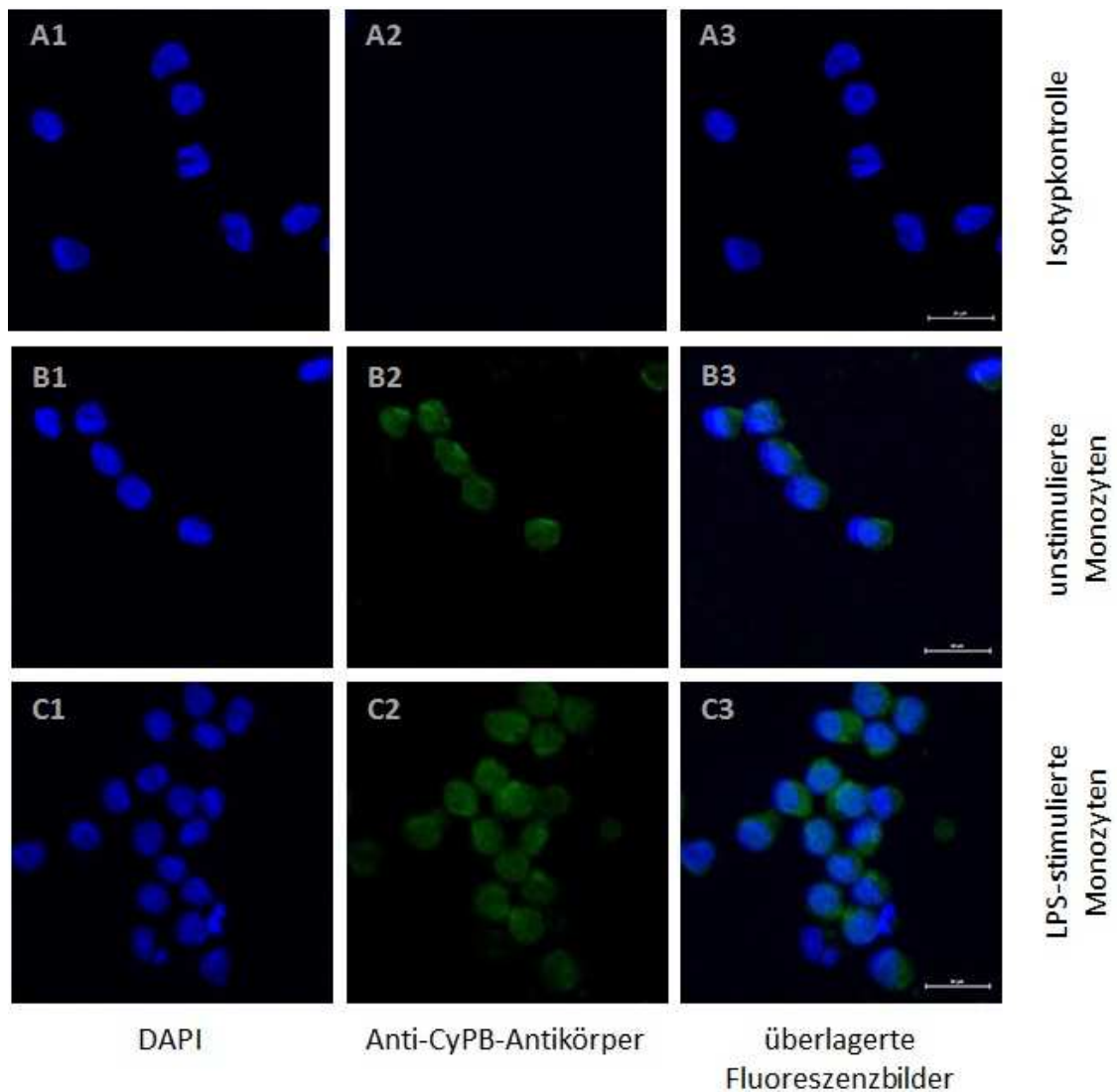


Abbildung 35: Exemplarische Darstellung der intrazellulären Expression von CyPB in Monozyten

Permeabilisierte Monozyten wurden mit einem Primärantikörper gegen CyPB markiert und dessen Bindung mittels eines Alexa Fluor® 488-markierten Sekundärantikörpers nachgewiesen (grüne Fluoreszenz). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blaue Fluoreszenz).

A1-A3) Isotyp-Kontrolle

B1-B3) CyPB wird im Zytoplasma von Monozyten exprimiert.

C1-C3) Die Expression von CyPB innerhalb der Zelle verändert sich durch LPS-stimulation nicht.

Der Maßbalken entspricht 20µm.

3 Expression von Cyclophilin B in Makrophagen

Monozyten wurden für 6 Tage in Monozytenmedium bei 37°C in *chamber slides* kultiviert (100.000 Zellen pro Vertiefung), um sie zu Makrophagen ausreifen zu lassen.

Ihre Färbung erfolgte analog zur Vorgehensweise bei den Monozyten, und zwar sowohl an nicht permeabilisierten als auch an permeabilisierten Makrophagen. Auch bei diesem Versuch wurden in jeder Gruppe ruhende mit LPS-aktivierten Makrophagen verglichen.

In den Fluoreszenzbildern (siehe Abb. 36 und 37) ist deutlich zu erkennen, dass es durch die Kultivierung der Zellen und ihrer Differenzierung zu Makrophagen zu einer Veränderung ihres morphologischen Erscheinungsbildes kommt. Sie stellen sich, wie es für diesen Zelltyp typisch ist, mit granuliertem Zytoplasma dar und sind deutlich größer als Monozyten.

Weiterhin ist zu erkennen, dass CyPB auf der Zelloberfläche von ruhenden sowie aktivierten Makrophagen exprimiert wird (siehe Abb. 36 B1-B3 und C1-C3). Durch Stimulation der Zellen mit 2µg/ml LPS (für 2 Stunden, bei 37°C) konnte die Expression auf der Zelloberfläche noch verstärkt werden (siehe Abb. 36 C1-C3).

Die Färbung permeabilisierter Makrophagen ergab, dass CyPB im Zytoplasma von Makrophagen vorkommt (siehe Abb. 37 B1-B3 und C1-C3). Nach zweistündiger Stimulation mit LPS (2µg/ml) konnte eine verstärkte Expression im Zellkern der Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 37 C1-C3).

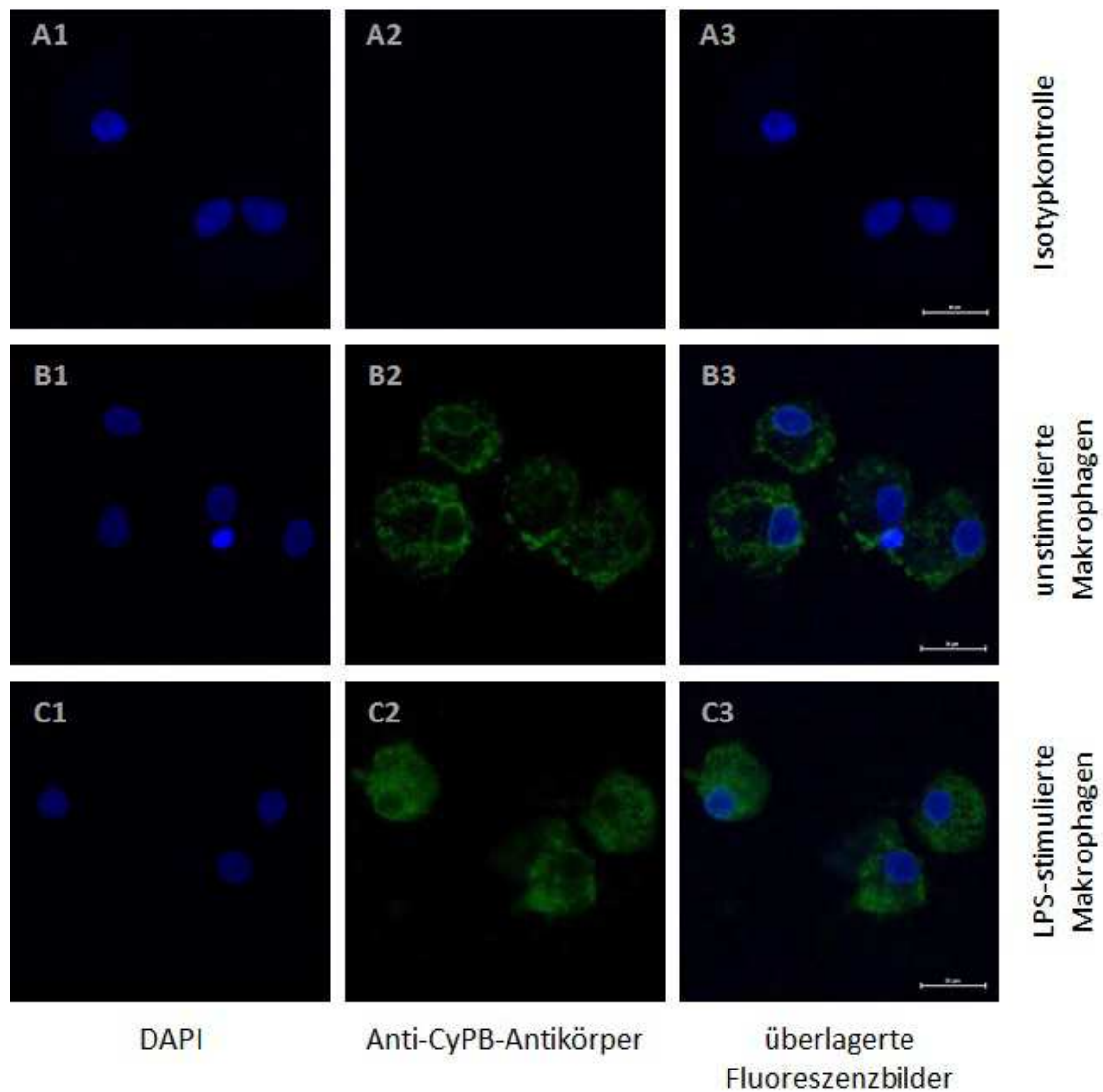


Abbildung 36: Exemplarische Darstellung der Expression von CyPB auf der Oberfläche von Makrophagen

Nicht permeabilisierte Makrophagen wurden mit einem Primärantikörper gegen CyPB markiert und dessen Bindung mittels eines Alexa Fluor® 488-markierten Sekundärantikörpers nachgewiesen (grüne Fluoreszenz). Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blaue Fluoreszenz).

A1-A3) Isotyp-Kontrolle

B1-B3) CyPB wird auf der Zelloberfläche von Makrophagen exprimiert.

C1-C3) Die Expression von CyPB auf der Zelloberfläche wird durch Stimulation der Makrophagen mit LPS verstärkt.

Der Maßbalken entspricht 20µm.

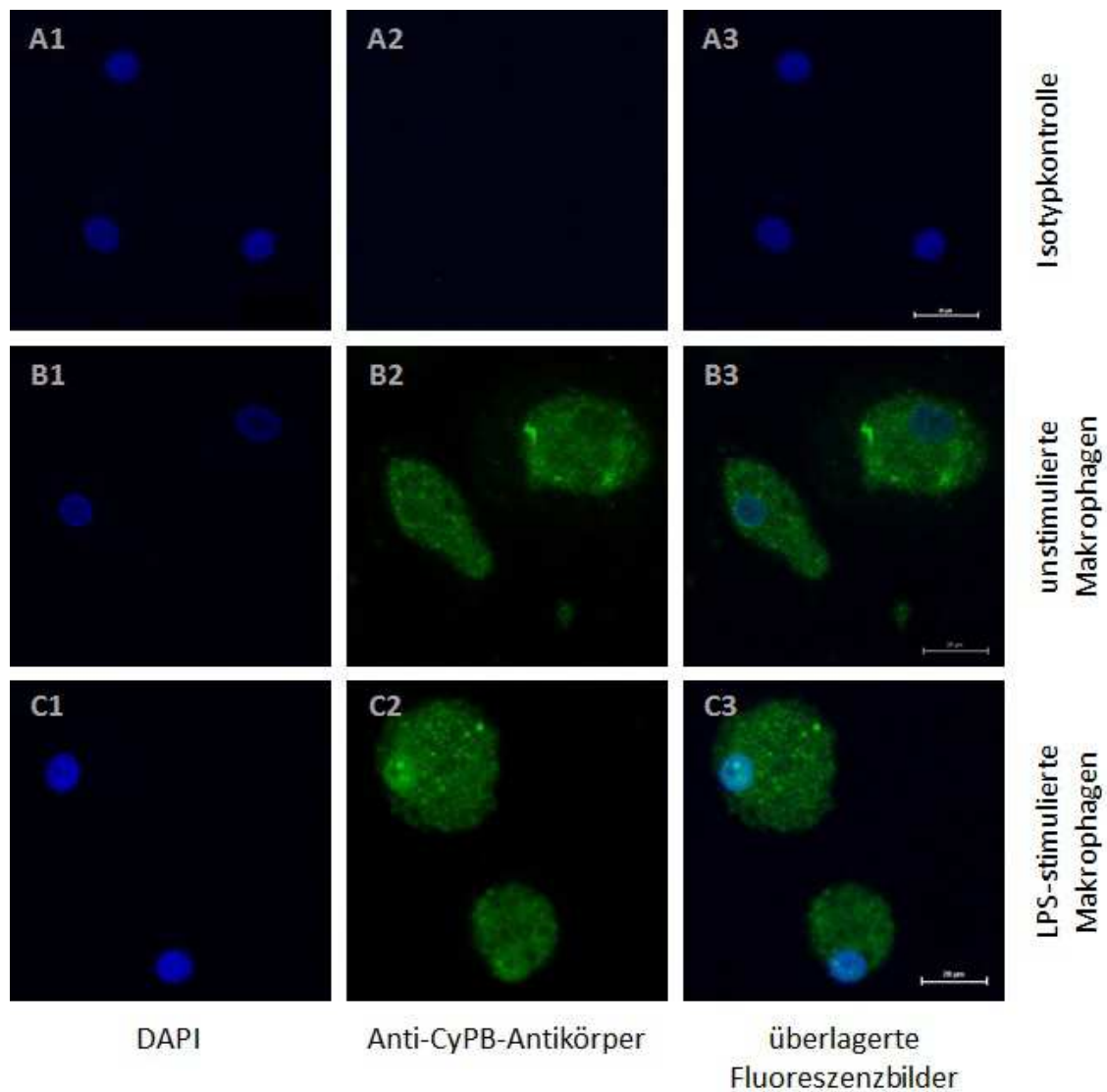


Abbildung 37: Exemplarische Darstellung der intrazellulären Expression von CyPB in Makrophagen

Permeabilisierte Makrophagen wurden mit einem Primärantikörper gegen CyPB markiert und dessen Bindung mittels eines Alexa Fluor® 488-markierten Sekundärantikörpers nachgewiesen (grüne Fluoreszenz). Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blaue Fluoreszenz).

A1-A3) Isotyp-Kontrolle

B1-B3) CyPB wird im Zytoplasma von Makrophagen exprimiert.

C1-C3) Durch die Stimulation mit LPS kommt es zu einer gesteigerten CyPB-Expression im Zellkern der Makrophagen.

Der Maßbalken entspricht 20µm.

4 Expression von Cyclophilin B in Schaumzellen

Monozyten (50.000 Zellen pro Vertiefung des *chamber slide*) wurden für 8 Tage zusammen mit Thrombozyten (40 Millionen Thrombozyten pro Vertiefung des *chamber slide*) bei 37°C im Schaumzellmedium kultiviert, um zu Schaumzellen zu differenzieren.

Die Färbung erfolgte analog zur Vorgehensweise bei den Monozyten sowohl an nicht permeabilisierten als auch an permeabilisierten Schaumzellen. Auch bei diesem Versuch wurden in jeder Gruppe ruhende mit LPS-aktivierten Schaumzellen verglichen.

Die Fluoreszenzbilder (siehe Abb. 38 und 39) zeigten auch hier eine deutlich veränderte Morphologie der Schaumzellen im Vergleich zum Monozyten. Am augenscheinlichsten ist die deutliche Größenzunahme. Die Größe einer Schaumzelle kann zwischen der einer Epithelzelle und der einer Riesenzelle schwanken. Außerdem kann sie einen oder mehrere Zellkerne enthalten.³⁶⁰ Übereinstimmend mit diesen Aussagen konnte im vorliegenden Versuch festgestellt werden, dass die Schaumzellen teilweise unterschiedlich groß waren. Dieser Effekt konnte sowohl bei den stimulierten als auch bei den unstimulierten Zellen beobachtet werden. Vereinzelt konnten auch mehrkernige Zellen gefunden werden (siehe z.B. Abb. 38 C1-C3). Weiterhin ist das vakuolisierte Zytoplasma zu erkennen, das auf die Cholesterineinschlüsse in den Zellen hindeutet.

Die Immunfluoreszenzfärbung der nicht permeabilisierten Schaumzellen ergab darüber hinaus, dass CyPB auf deren Zelloberfläche exprimiert wird (siehe Abb. 38 B1-B3 und C1-C3). Durch Stimulation der Zellen mit 2µg/ml LPS konnte die Expression auf der Zelloberfläche verstärkt werden (siehe Abb. 38 C1-C3).

Auch bei permeabilisierten Schaumzellen konnte eine Expression von CyPB im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 39 B1-B3 und C1-C3). Nach zweistündiger Stimulation mit LPS (2µg/ml) konnte, ebenso wie bei Makrophagen, eine verstärkte Expression im Zellkern nachgewiesen werden. Außerdem war eine gesteigerte Expression im Zytoplasma zu erkennen (siehe Abb. 39 C1-C3).

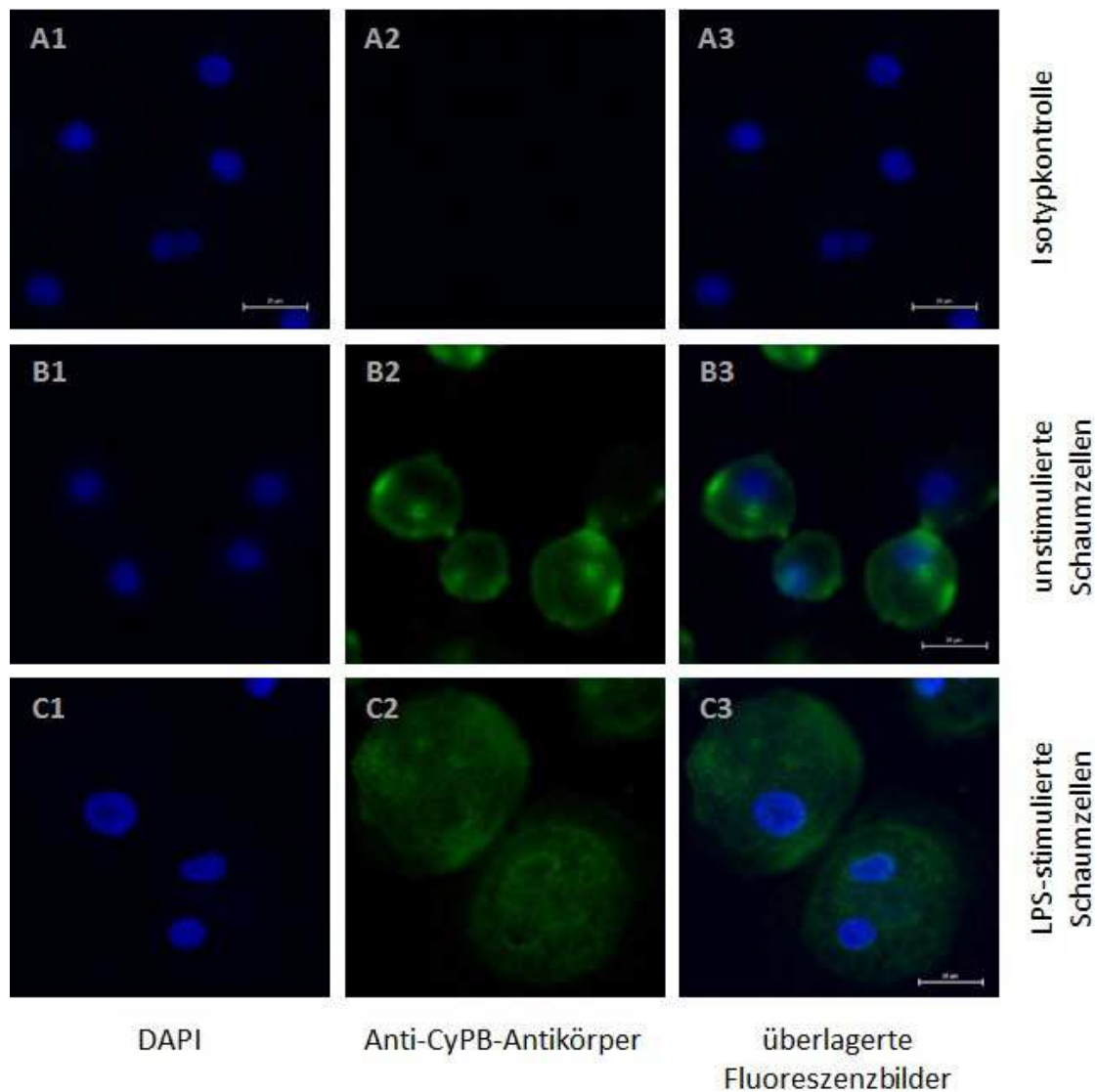


Abbildung 38: Exemplarische Darstellung der Expression von CyPB auf der Schaumzelloberfläche

Nicht permeabilisierte Schaumzellen wurden mit einem Primärantikörper gegen CyPB markiert und dessen Bindung mittels eines Alexa Fluor® 488-markierten Sekundärantikörpers nachgewiesen (grüne Fluoreszenz). Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blaue Fluoreszenz).

A1-A3) Isotyp-Kontrolle

B1-B3) CyPB wird auf der Zelloberfläche von Schaumzellen exprimiert.

C1-C3) Die Expression von CyPB auf der Zelloberfläche wird durch Stimulation der Schaumzellen mit LPS verstärkt.

Der Maßbalken entspricht 20µm.

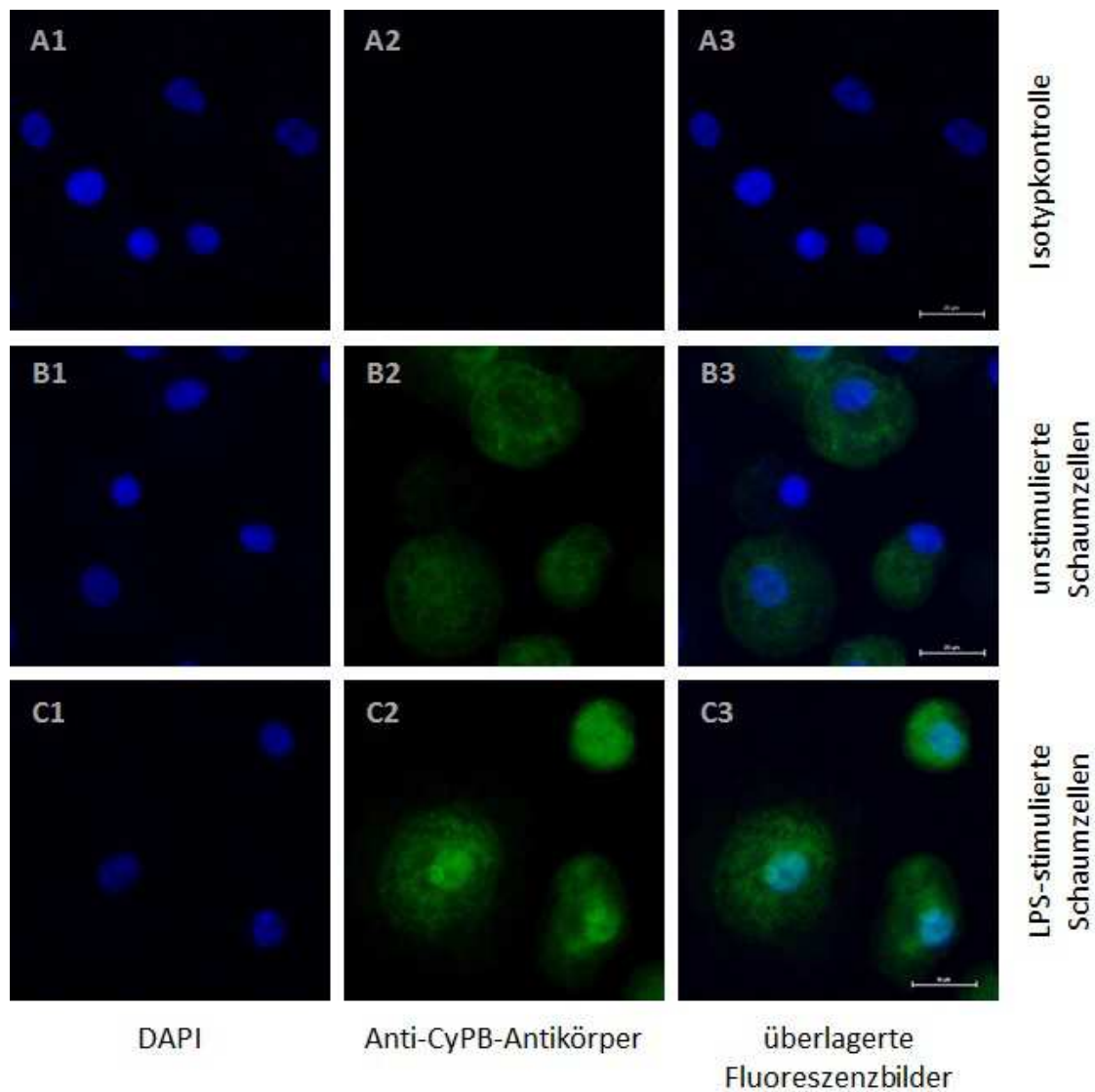


Abbildung 39: Exemplarische Darstellung der intrazellulären Expression von CyPB in Schaumzellen

Permeabilisierte Schaumzellen wurden mit einem Primärantikörper gegen CyPB markiert und dessen Bindung mittels eines Alexa Fluor® 488-markierten Sekundärantikörpers nachgewiesen (grüne Fluoreszenz). Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blaue Fluoreszenz).

A1-A3) Isotyp-Kontrolle

B1-B3) CyPB wird im Zytoplasma von Schaumzellen exprimiert.

C1-C3) Durch die Stimulation mit LPS kommt es zu einer gesteigerten CyPB-Expression im Zytoplasma und Nucleus der Schaumzellen.

Der Maßbalken entspricht 20µm.

5 Cyclophilin B wird auf der Zelloberfläche von thrombinstimulierten Thrombozyten verstärkt exprimiert

Im nachfolgenden Versuchsansatz sollte das Vorkommen von CyPB auf Thrombozyten nachgewiesen werden. Dazu wurden sowohl ruhende als auch aktivierte Thrombozyten durchflusszytometrisch untersucht.

Zur Stimulation der Thrombozyten wurden 20µM Adenosindiphosphat (ADP), 25µM *Thrombin receptor-activating peptide* (TRAP), 10µg/ml *Collagen-related peptide* (CRP) bzw. 0,1U/ml Thrombin verwendet. Die ruhenden und aktivierten Thrombozyten wurden (mit Ausnahme der Isotyp-Kontrolle) zunächst mit einem Primärantikörper gegen CyPB inkubiert. In einem zweiten Schritt wurde dieser durch die Zugabe eines fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpers markiert und konnte dadurch detektiert werden. Als Isotyp-Kontrolle dienten ruhende Thrombozyten, bei denen anstelle des Primärantikörpers ein aus dem Hasen stammender IgG-Antikörper (*rabbit IgG*) verwendet wurde. Die Detektion der Zellen erfolgte mit Hilfe des Durchflusszytometers.

Wie in Abbildung 40 dargestellt, zeigte der Versuch, dass CyPB auf ruhenden Thrombozyten nicht exprimiert wird. Die Stimulation mit ADP, TRAP bzw. CRP führte nicht zu einem signifikanten Anstieg der Oberflächenexpression von CyPB. Die Stimulation mit Thrombin hingegen bewirkte eine signifikante Steigerung der Expression von CyPB auf der Oberfläche von Thrombozyten.

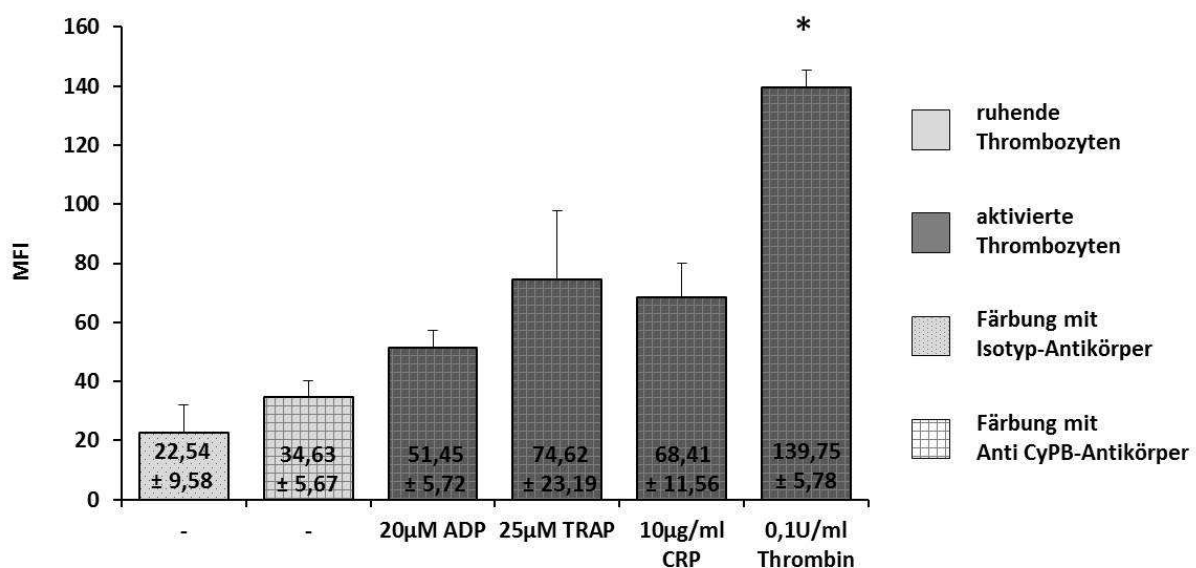


Abbildung 40: Darstellung der mittleren Oberflächenexpression (+S.E.M.) von CyPB auf stimulierten Thrombozyten im Säulendiagramm (n= 5 Versuchsansätze)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Auf der Oberfläche von ruhenden Thrombozyten konnte kein CyPB nachgewiesen werden. Auch durch die Stimulation mit 20µM ADP, 25µM TRAP bzw. 10µg/ml CRP kam es zu keiner signifikanten Steigerung der CyPB-Oberflächenexpression. Die Stimulation mit 0,1U/ml Thrombin hingegen bewirkte eine signifikante Steigerung der Expression von CyPB auf der Oberfläche von Thrombozyten.

Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett Test bestimmt (*p < 0,05 im Vergleich zu ruhenden Thrombozyten). MFI = mittlere Fluoreszenzintensität.

6 Einfluss von Cyclophilin B auf das Migrationsverhalten und die Matrix Metalloproteinasen-Aktivität von Monozyten *in vitro*

6.1 Cyclophilin B induziert eine gesteigerte Sekretion von MMP-9 durch Monozyten

Im vorliegenden Versuch wurde der Einfluss von CyPB auf die Bildung von MMPs durch Monozyten untersucht.

Monozyten wurden in einer 96-Loch-Platte ausgesät (200.000 Zellen/Vertiefung) und für 18 Stunden bei 37°C mit 100nM bzw. 200nM CyPB inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Monozyten, als Positivkontrolle LPS-stimulierte Monozyten. Nach Ablauf der 18 Stunden wurden die Überstände entnommen und im Verhältnis 1:10 in PBS verdünnt. Im Anschluss konnten sie für die Zymographie verwendet werden.

Die Zymogramme (siehe Abb. 41) zeigen eine erhöhte Aktivität von MMP-9 in den Überständen der Monozyten, die mit CyPB inkubiert wurden, im Vergleich zur Negativkontrolle. Dabei ist die durch 100nM CyPB ausgelöste Aktivitätssteigerung der MMP-9 in den Überständen nicht signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle. Nach Stimulation der Monozyten mit 200nM CyPB hingegen, lässt sich eine signifikante Steigerung der MMP-9-Aktivität messen (siehe Abb. 42).

Im Gegensatz zur MMP-9-Aktivität zeigten sich keine relevanten Änderungen bei der MMP-2-Aktivität (siehe Abb. 43).

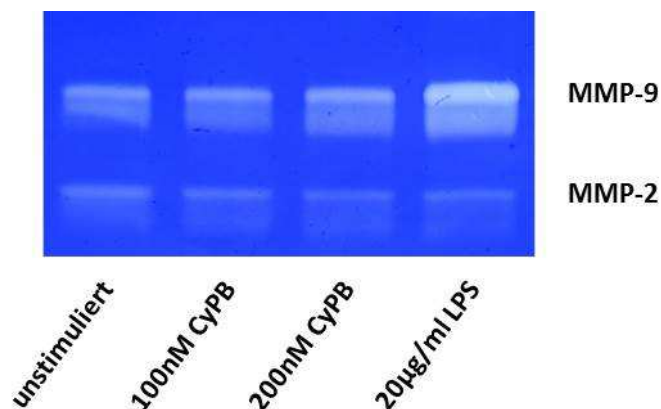


Abbildung 41: Zymographische Darstellung der Freisetzung von MMP-9 aus CyPB-stimulierten Monozyten

Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von n=6 Zymographie-Gelen. Monozyten wurden für 18 Stunden bei 37°C mit 100nM bzw. 200nM CyPB inkubiert und die Überstände im Anschluss auf die Aktivität von MMP2- und -9 untersucht. Die Überstände der mit 200nM CyPB stimulierten Monozyten wiesen eine signifikant erhöhte Aktivität von MMP-9 gegenüber den Überständen der unstimulierten Monozyten auf.

IV ERGEBNISSE

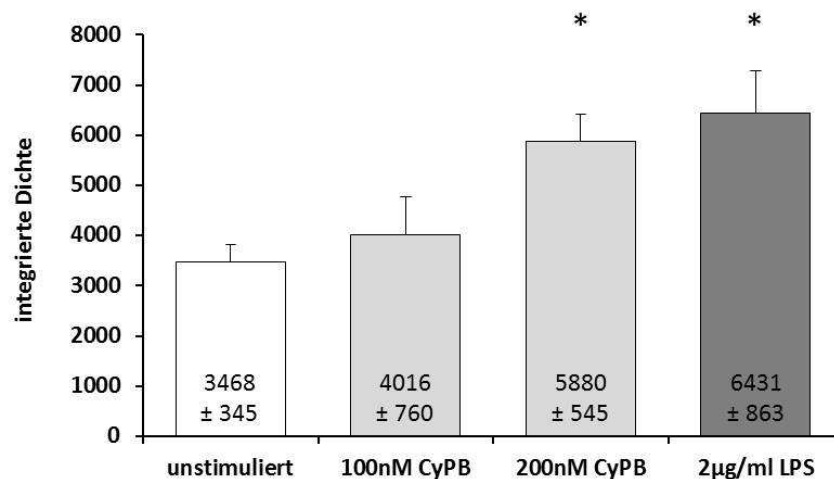


Abbildung 42: Darstellung der Mittelwerte (+S.E.M.) der MMP-9-Aktivität (92kDa-Bande) von n=6 Zymogrammen im Säulendiagramm

Nach 18-stündiger Stimulation der Monozyten mit 200nM CyPB konnte eine signifikante Steigerung der MMP-9-Aktivität in den Überständen der Monozytenkultur gemessen werden. Die Stimulation mit nur 100nM CyPB führte zu keiner signifikanten Steigerung der MMP-9-Aktivität.

Die ermittelte Intensität der Bandenfärbung (=integrierte Dichte) wurde mittels Dunnett-one-way-ANOVA auf ihre statistische Signifikanz überprüft. (*p < 0,05 im Vergleich zur Negativkontrolle).

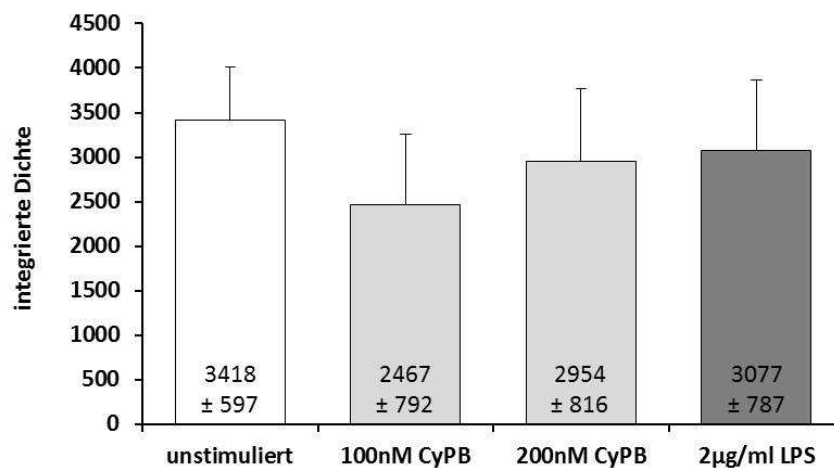


Abbildung 43: Darstellung der Mittelwerte (+S.E.M.) der MMP-2-Aktivität (72kDa-Bande) von n=6 Zymogrammen im Säulendiagramm

Nach 18-stündiger Stimulation der Monozyten mit 100nM bzw. 200nM CyPB konnte keine signifikante Steigerung der MMP-2-Aktivität in den Überständen der Monozytenkultur festgestellt werden

Die ermittelte Intensität der Bandenfärbung (=integrierte Dichte) wurde mittels Dunnett-one-way-ANOVA auf ihre statistische Signifikanz überprüft. (*p < 0,05 im Vergleich zur Negativkontrolle).

6.2 Zur chemotaktischen Wirkung von Cyclophilin B auf Monozyten *in vitro*

6.2.1 Einfluss von Cyclophilin B sowie der Cyclosporin A-Derivate NIM811 und MM284 in Kombination mit Cyclophilin B auf die Migration von Monozyten

Um zu untersuchen, ob CyPB einen Einfluss auf die Migration von Monozyten nehmen kann, und ob die Wirkung von CyPB durch den sowohl extra- als auch intrazellulär wirkenden Cyclophilin-Inhibitor NIM811 bzw. den rein extrazellulär wirkenden Cyclophilin-Inhibitor MM284 inhibiert werden kann, wurde ein Chemotaxis-Assay mit Hilfe einer modifizierten Boyden-Kammer durchgeführt.

Für diesen Chemotaxis-Assay wurden die Vertiefungen im unteren Teil der Migrationskammer mit den zu testenden Lockstofflösungen (zum einen 200nM CyPB und zum anderen 200nM CyPB in Kombination mit 200nM NIM811 bzw. 200nM CyPB in Kombination mit 800nM MM284) bzw. den Kontrolllösungen (Monozytenmedium ohne Zusätze als Negativkontrolle bzw. Monozytenmedium mit MCP-1 in einer Konzentration von 50ng/ml als Positivkontrolle) befüllt. In die oberen Kammern wurde die Monozytensuspension (Zellkonzentration von 4×10^5 Zellen/ml, entsprechend 200.000 Monozyten pro Kammer) gegeben. Die Kammern waren durch einen porösen Filter getrennt, an dem die entlang des Konzentrationsgradienten migrierenden Zellen haften blieben und für die mikroskopische Auswertung angefärbt werden konnten. Die Migrationskammer wurde für 4 bzw. 18 Stunden bei 37°C inkubiert, bevor der Filter entnommen, gefärbt und ausgewertet wurde.

Sowohl nach 4-stündiger Inkubation, als auch nach 18-stündiger Inkubation der Monozyten in der Migrationskammer, kam es zu keiner signifikanten Zunahme der Migration von Monozyten entlang des CyPB-Gradienten im Vergleich zur Negativkontrolle. Auch die Zugabe der Cyclophilin-Inhibitoren NIM811 bzw. MM284 zu CyPB in die Lockstoffkammern beeinflusste die Migration der Monozyten nicht weiter. Lediglich nach Zugabe des als Positivkontrolle verwendeten MCP-1 in die Lockstoffkammer kam es zu einer signifikant gesteigerten Zunahme der Monozytenmigration (siehe Abb. 44 A und B).

IV ERGEBNISSE

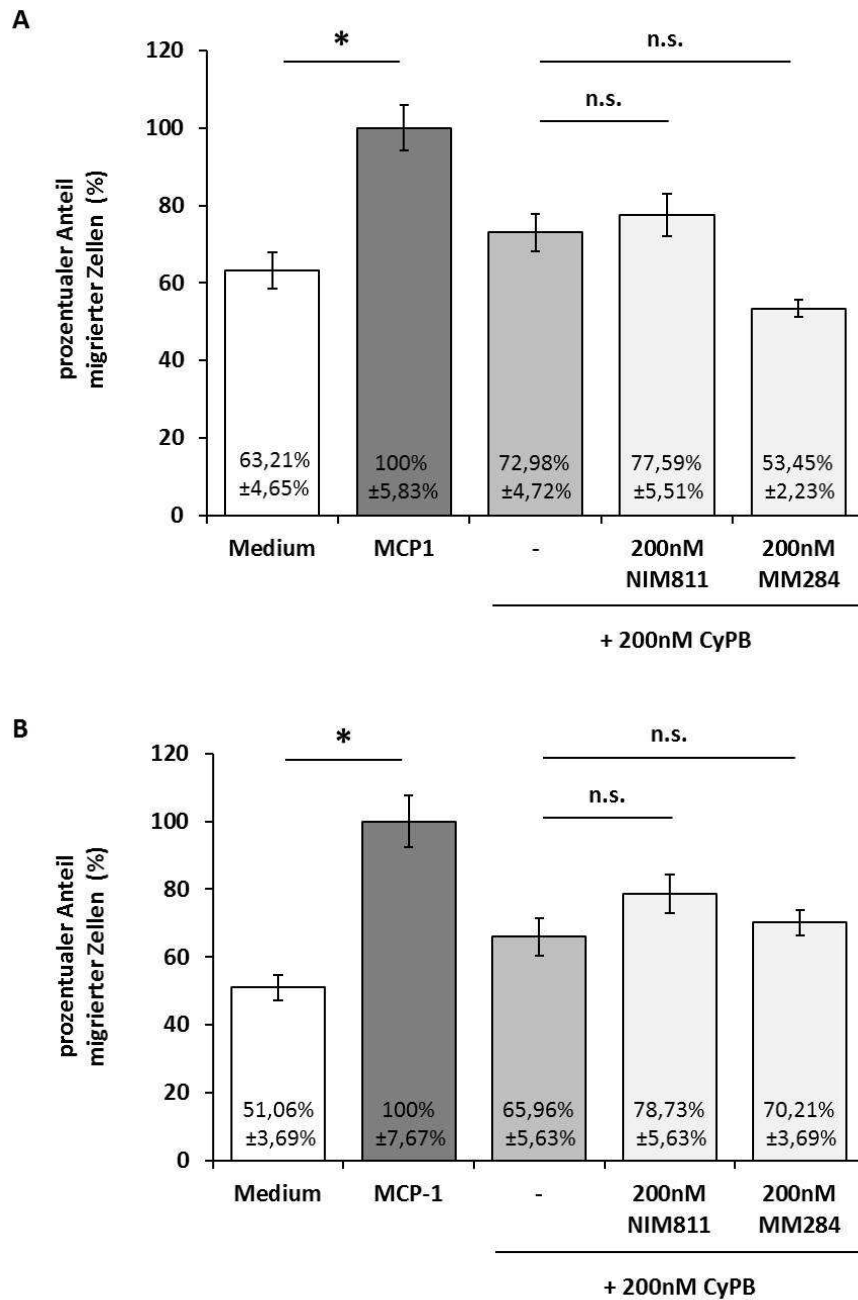


Abbildung 44: Darstellung der chemotaktischen Wirkung von CyPB sowie von Cyclosporin A-Derivaten auf Monozyten nach 4 Stunden (A) bzw. 18 Stunden (B)

Die Abbildungen zeigen den prozentualen Anteil migrierter Monozyten, die entgegen einer Konzentration von 200nM CyPB, sowie entgegen einer Kombination aus 200nM CyPB und 200nM NIM811 bzw. 800nM MM284 gewandert sind, im Vergleich zur Positivkontrolle.

Als Negativkontrolle diente reines Monozytenmedium, als Positivkontrolle Monozytenmedium, das mit 50ng/ml MCP-1 angereichert wurde.

In beiden Versuchsansätzen nimmt CyPB keinen signifikanten Einfluss auf die Zahl migrierter Monozyten. Auch die Inhibitoren NIM811 und MM284 beeinflussten die Migration von Monozyten nicht weiter.

Angegeben sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von 4 Versuchsansätzen pro zu testender Substanz bei 4 Stunden bzw. 3 Ansätzen bei 18 Stunden. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett Test bestimmt (* $p < 0,05$). Dabei wurden MCP-1 und CyPB (200nM) gegen die Negativkontrolle verglichen und CyPB (200nM)/NIM811 (200nM) sowie CyPB (200nM)/MM284 (200nM) gegen CypB (200nM). n.s. = nicht signifikant;

6.2.2 Einfluss verschiedener Konzentrationen von Cyclophilin B auf die Migration von Monozyten

Nachdem bei einer Konzentration von 200nM CyPB keine Migration von Monozyten ausgelöst werden konnte, sollte untersucht werden, ob niedrigere oder höhere CyPB-Konzentrationen einen Einfluss auf das Migrationsverhalten nehmen können. Dazu wurden die unteren Kammern der Migrationskammer mit Monozytenmedium, das eine Konzentration von 100nM, 200nM, 400nM bzw. 800nM CyPB enthielt, befüllt. Die Zellen wurden in der Migrationskammer für 18 Stunden bei 37°C inkubiert, bevor der Filter entnommen, gefärbt und ausgewertet wurde.

Bei keiner der verwendeten Konzentrationen kam es zu einer signifikanten Zunahme der Migration von Monozyten im Vergleich zur Negativkontrolle (siehe Abb. 45).

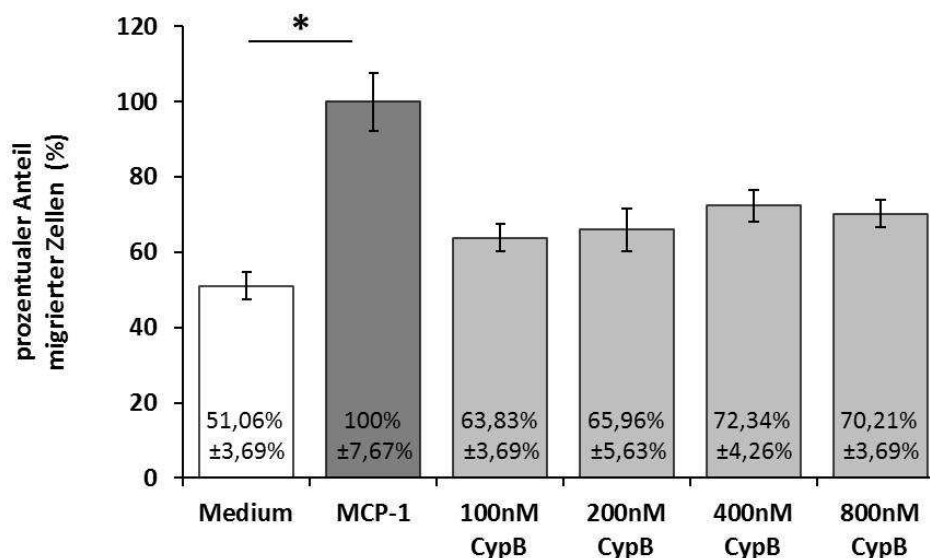


Abbildung 45: Einfluss unterschiedlicher CyPB-Konzentrationen auf die Migration von Monozyten nach 18 Stunden

Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil migrierter Monozyten, die im Chemotaxis-Assay entgegen einer CyPB-Konzentration von 100nM, 200nM, 400nM bzw. 800nM CyPB gewandert sind, im Verhältnis zur Positivkontrolle. Als Negativkontrolle diente reines Monozytenmedium, als Positivkontrolle Monozytenmedium, das mit 50ng/ml MCP-1 angereichert wurde.

Der Versuch zeigt, dass keine der verwendeten CyPB-Konzentrationen eine signifikante Steigerung der Migration der Monozyten entgegen des Konzentrationsgradienten bewirkte. Angegeben sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von 3 Versuchsansätzen pro zu testender Substanz. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett Test bestimmt (* $p < 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrolle).

7 Einfluss von Cyclophilin B auf das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten *in vitro*

7.1 ADP-stimulierte Thrombozyten binden verstärkt an immobilisiertes Cyclophilin A und Cyclophilin B

Im vorliegenden Versuch sollte der Einfluss von immobilisiertem CyPA und CyPB auf ADP-aktivierte Thrombozyten *in vitro* unter Nachstellung arterieller Flussbedingungen mittels Flusskammer untersucht werden.

Hierzu wurden zunächst Deckgläschen zunächst mit 0,2%iger Gelatine beschichtet und anschließend mit 200nM CyPA bzw. 200nM CyPB über Nacht gecoatet. Als Positivkontrolle dienten CD147-Fc (EMMPRIN-Fc)-beschichtete Deckgläschen (Konzentration: 20µg/ml). Als Negativkontrolle wurden Deckgläschen mit 20µg/ml Fc-Fragment bzw. 2%igem BSA beschichtet.

Am Folgetag wurden Thrombozyten isoliert, auf eine Konzentration von 4×10^7 Zellen/ml eingestellt und mit 20µM ADP für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die aktivierten Zellen wurden mit Hilfe der Flusskammer über die Deckgläschen perfundiert.

Die in den Abbildungen 46 und 47 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, dass es im Vergleich zur Negativkontrolle (BSA-gecoatete Deckgläschen) sowohl bei den CyPA- als auch bei den CyPB-beschichteten Deckgläschen zu einer signifikanten Steigerung des *rollings* und der Adhäsion von aktivierten Thrombozyten kam (*p<0,05).

Auch bei dem als Positivkontrolle verwendeten CD147-Fc (EMMPRIN-Fc) konnte eine signifikante Steigerung des *rollings* sowie auch der festen Adhäsion von aktivierten Thrombozyten im Vergleich zur Negativkontrolle (Fc-Fragment) festgestellt werden (*p<0,05). Diese war ähnlich stark ausgeprägt wie diejenige auf den Cyclophilinen.

Abbildung 48 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen adhärenter Thrombozyten auf CyPA-, CyPB- sowie CD147-Fc (EMMPRIN-Fc)-beschichteten Deckgläschen.

IV ERGEBNISSE

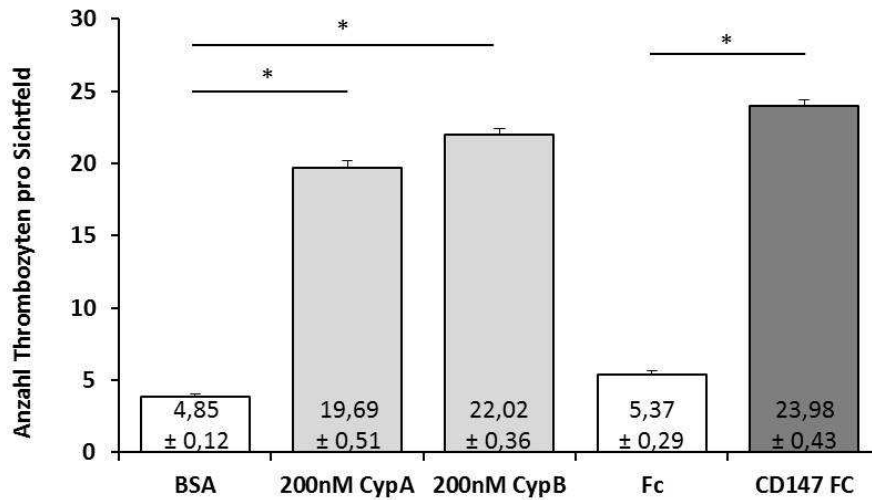


Abbildung 46: Immobilisiertes CyPA und CyPB vermitteln gesteigertes thrombozytäres rolling

Rolling ADP-stimulierter Thrombozyten auf Deckgläschen, die mit CyPA bzw. CyPB, sowie CD147-Fc (EMMPRIN-Fc) beschichtet wurden. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte + S.E.M. von 9 ausgezählten Deckgläschen je Versuchsansatz. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett Test bestimmt (* $p < 0,05$ im Vergleich zu BSA bzw. Fc-Fragment).

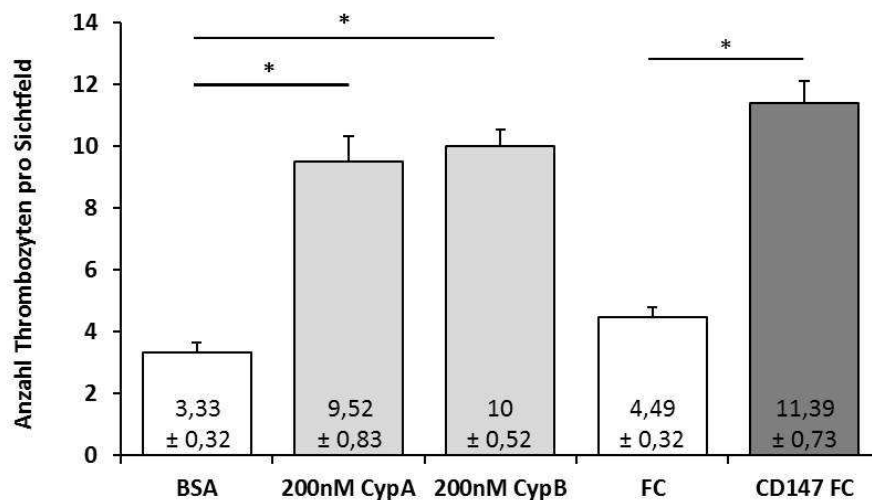


Abbildung 47: Immobilisiertes CyPA, CyPB und CD147-Fc (EMMPRIN-Fc) vermitteln eine gesteigerte thrombozytäre Adhäsion

Anzahl der adhärenen ADP-stimulierten Thrombozyten auf Deckgläschen, die mit CyPA bzw. CyPB, sowie CD147-Fc (EMMPRIN-Fc) beschichtet wurden. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte + S.E.M. von 9 ausgezählten Deckgläschen je Versuchsansatz. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett Test bestimmt (* $p < 0,05$ im Vergleich zu BSA bzw. Fc-Fragment).

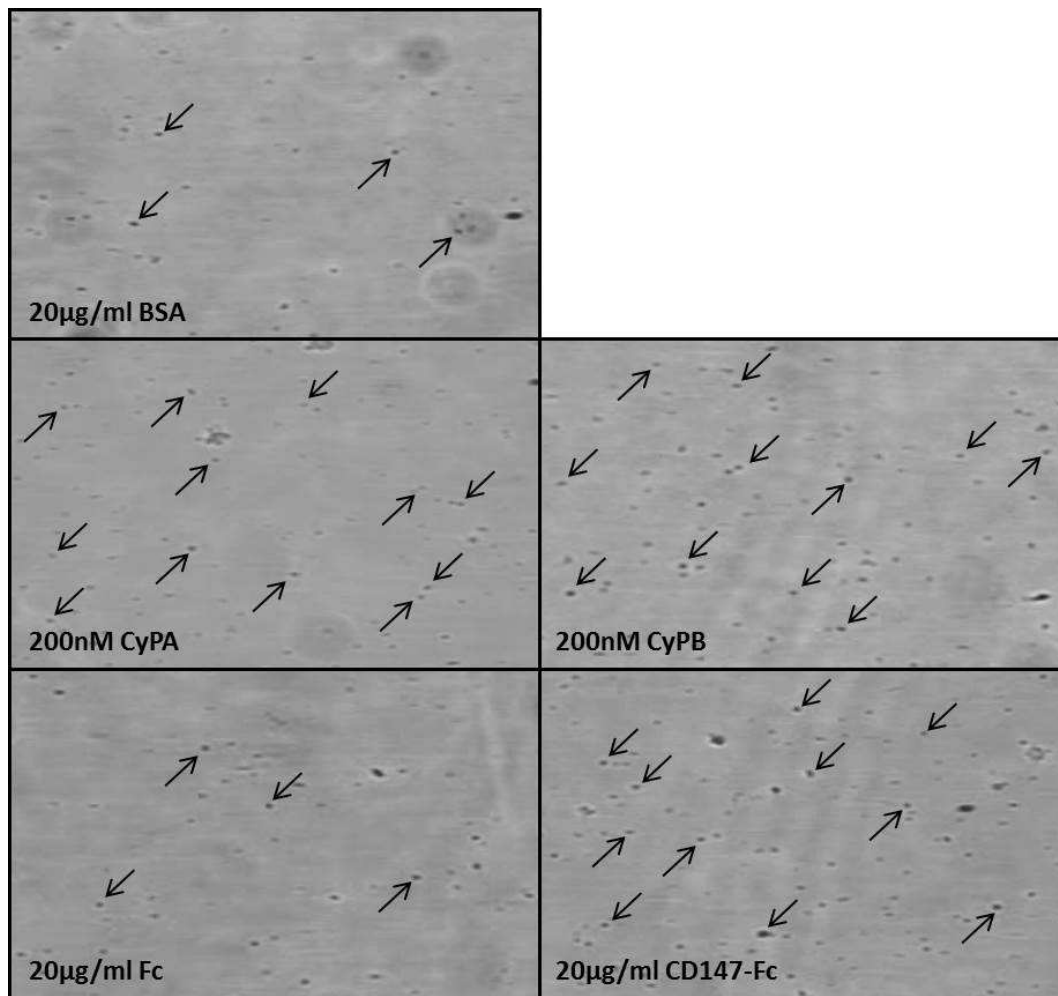


Abbildung 48: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen adhärenen Thrombozyten auf CyPA-, CyPB- sowie CD147-Fc (EMMPRIN-Fc)-beschichteten Deckgläschen im Flusskammer-Versuch

Die Einzelbilder zeigen einen Bildausschnitt von 200 x 300µm bei 200facher Vergrößerung. Die Pfeile zeigen die adhärenen Thrombozyten des Bildausschnittes auf den proteinbeschichteten Deckgläschen.

7.2 Die durch Cyclophilin B gesteigerte Adhäsion von Thrombozyten auf Kollagen wird durch die Cyclosporin A-Derivate NIM811 und MM284 reduziert

Im vorliegenden Flusskammer-Versuch wurde der Einfluss des sowohl extra- als auch intrazellulär wirkenden Cyclophilin-Inhibitors NIM811 mit dem des rein extrazellulär wirkenden Cyclophilin-Inhibitors MM284 auf das *rolling* und die Adhärenz CyPB-stimulierter Thrombozyten auf Kollagen untersucht.

Für den Versuch wurden zunächst Deckgläschen mit Kollagen (Konzentration: 10µg/ml, für 2 Stunden bei 37°C) beschichtet. Anschließend wurden Thrombozyten isoliert, auf eine Zellzahl von 4×10^7 Zellen/ml eingestellt und für 30 Minuten mit 200nM CyPB bzw. 200nM CyPB in Kombination mit NIM811 (Konzentration: 800nM) oder MM284 (Konzentrationen: 200nM, 500nM, 800nM) inkubiert. Im Falle der Kombination von CyPB und NIM811 bzw. MM284 wurden die Inhibitoren vorab zunächst für 10 Minuten mit CyPB kokubiert und dann für 30 Minuten zu den Thrombozyten gegeben.

Die in den Abbildungen 49 und 50 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, dass sowohl das durch CyPB gesteigerte *rolling* als auch die feste Adhäsion der Thrombozyten auf Kollagen durch die Inhibitoren NIM 811 und MM284 signifikant reduziert wird (*p<0,05). Bei MM284 konnte die stärkste Hemmung der CyPB-Wirkung bei einer Konzentration von 500nM festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Flusskammerversuche nur noch diese Wirkstoffkonzentration verwendet.

Abbildung 51 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen von adhärenenten Thrombozyten auf kollagenbeschichteten Deckgläschen nach CyPB-Stimulation bzw. Inhibition der CyPB-Wirkung mit NIM811 und MM284.

IV ERGEBNISSE

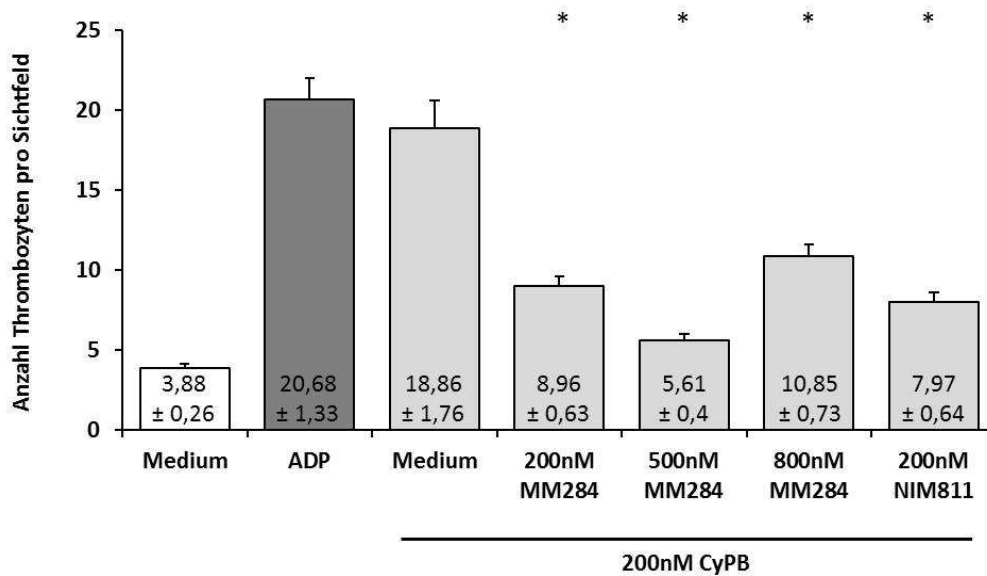


Abbildung 49: Das durch CyPB gesteigerte *rolling* von Thrombozyten auf Kollagen wird durch die Inhibitoren NIM 811 und MM284 signifikant reduziert

Rolling CyPB-stimulierter bzw. NIM811- und MM284-inhibierter Thrombozyten auf Kollagen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte + S.E.M. von 9 ausgezählten Deckgläschen je Versuchsansatz. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett Test bestimmt (* $p < 0,05$ im Vergleich zum Monozytenmedium mit 200nM CyPB).

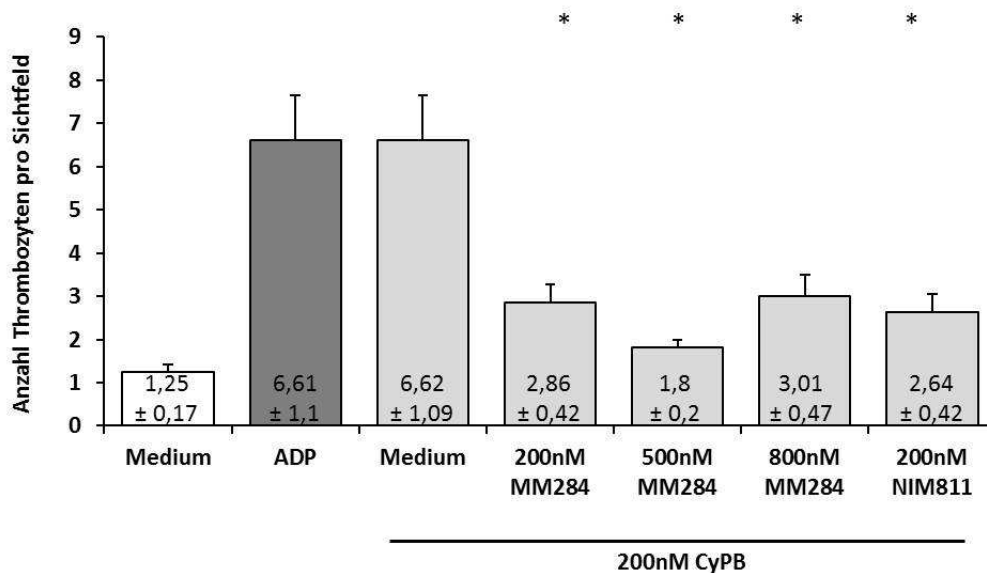


Abbildung 50: Die durch CyPB gesteigerte Adhäsion von Thrombozyten auf Kollagen wird durch die Inhibitoren NIM 811 und MM284 signifikant reduziert

Adhäsion CyPB-stimulierter bzw. NIM811- und MM284-inhibierter Thrombozyten auf Kollagen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte + S.E.M. von 9 ausgezählten Deckgläschen je Versuchsansatz. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett Test bestimmt (* $p < 0,05$ im Vergleich zum Monozytenmedium mit 200nM CyPB).

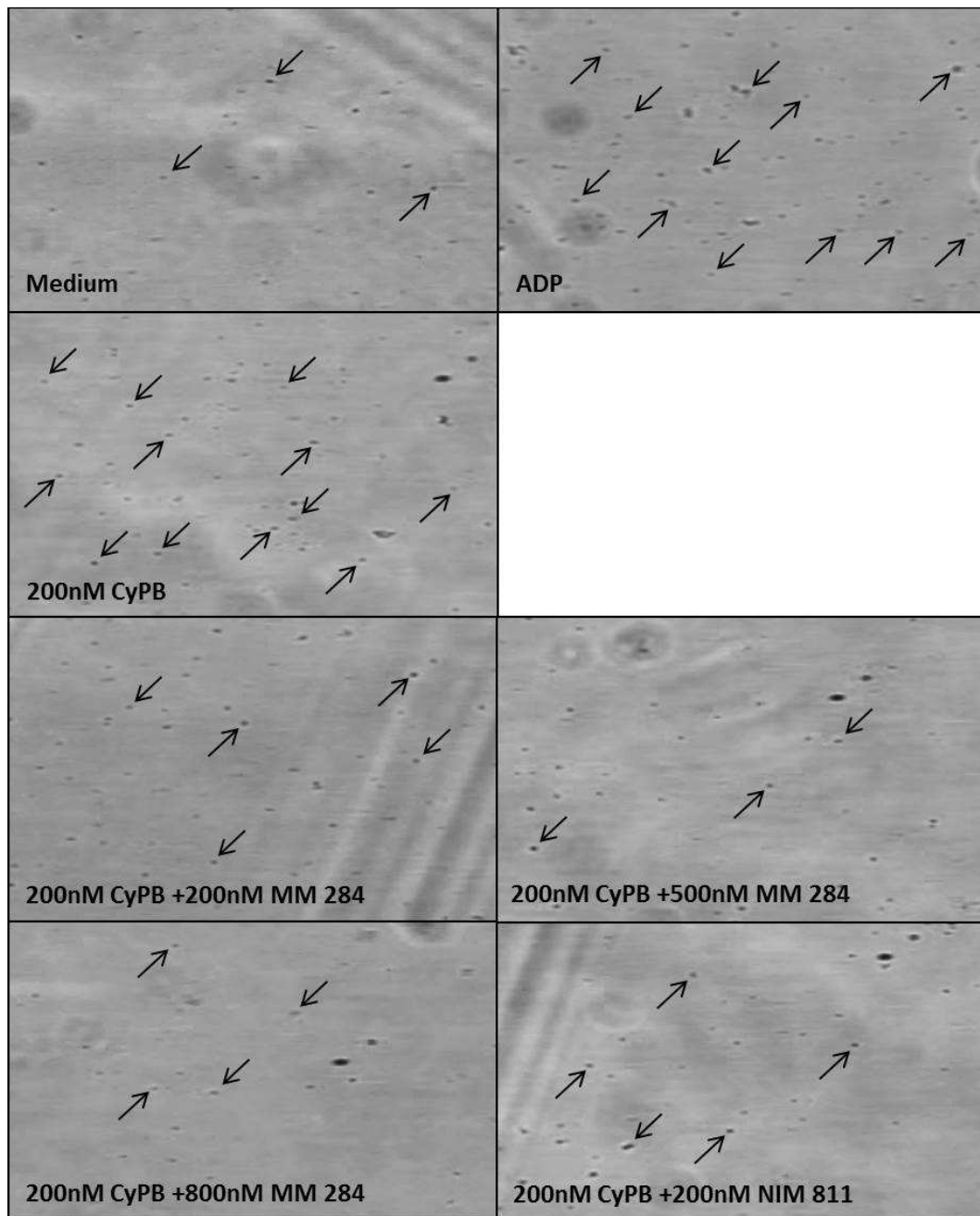


Abbildung 51: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von adhärenen Thrombozyten auf kollagenbeschichteten Deckgläschen nach Stimulation mit CyPB bzw. Inhibition der CyPB-Wirkung mit NIM811 und MM284 im Flusskammer-Versuch

Die Einzelbilder zeigen einen Bildausschnitt von 200 x 300µm bei 200facher Vergrößerung. Die Pfeile zeigen die adhärenen Thrombozyten des Bildausschnittes auf den kollagenbeschichteten Deckgläschen.

7.3 Die durch Cyclophilin B gesteigerte Adhäsion von Thrombozyten auf aktivierten humanen Endothelzellen wird durch die Cyclosporin A-Derivate NIM811 und MM284 reduziert

Im vorliegenden Flusskammer-Versuch wurde der Einfluss des sowohl extra- als auch intrazellulär wirkenden Cyclophilin-Inhibitors NIM811 mit dem des rein extrazellulär wirkenden Cyclophilin-Inhibitors MM284 auf das *rolling* und die Adhärenz CyPB-stimulierter Thrombozyten gegenüber aktivierten humanen Endothelzellen (HUVECs) verglichen.

Für den Versuch wurden zunächst Deckgläschen mit den HUVECs beschichtet und solange kultiviert bis ein dichter Zellrasen entstanden war. Vor Beginn des Versuchs wurden die Endothelzellen für 6 Stunden mit TNF- α (Konzentration: 50ng/ml) und IFN- γ (Konzentration: 20ng/ml) aktiviert. Dann wurden Thrombozyten isoliert, auf eine Zellkonzentration von 4×10^7 Zellen/ml eingestellt und für 30 Minuten im Brutschrank mit 200nM CyPB bzw. mit der Kombination aus 200nM CyPB und 200nM NIM811 oder 200nM CyPB und 500nM MM284 stimuliert. Die Inhibitoren NIM811 und MM284 wurden vor der Inkubation mit den Thrombozyten zunächst für 10 Minuten mit CyPB koinkubiert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Thrombozyten, als Positivkontrolle ADP-stimulierte Thrombozyten (Konzentration: 20 μ M).

Die in den Abbildungen 52 und 53 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, dass sowohl das durch CyPB gesteigerte *rolling* als auch die feste Adhäsion der Thrombozyten auf aktivierten humanen Endothelzellen durch das Cyclosporin A-Analogon NIM811 und sowie den neu entwickelten Cyclophilin-Inhibitor MM284 signifikant reduziert werden (*p<0,05).

Abbildung 54 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen von adhärenenten Thrombozyten auf endothelzellbeschichteten Deckgläschen nach CyPB-Stimulation bzw. Inhibition der CyPB-Wirkung mit NIM811 und MM284.

IV ERGEBNISSE

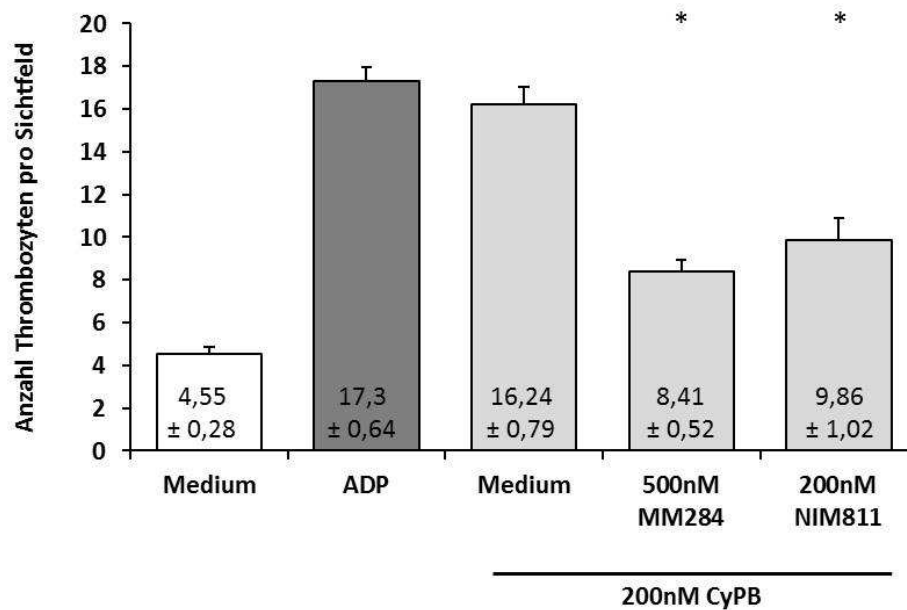


Abbildung 52: Das durch CyPB gesteigerte *rolling* von Thrombozyten auf aktivierten humanen Endothelzellen (HUVECs) wird durch die Inhibitoren NIM 811 und MM284 signifikant reduziert

Rolling CyPB-stimulierter bzw. NIM811- und MM284-inhibierter Thrombozyten auf HUVECs. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte + S.E.M. von 9 ausgezählten Deckgläschen je Versuchsansatz. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett Test bestimmt (*p < 0,05 im Vergleich zum Monozytenmedium mit 200nM CyPB).

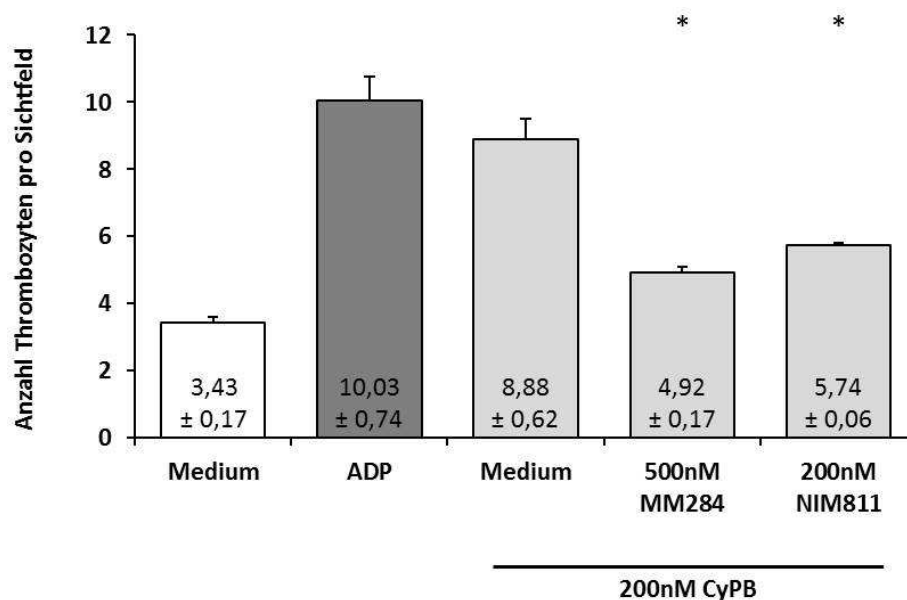


Abbildung 53: Die durch CyPB gesteigerte Adhäsion von Thrombozyten auf aktivierten humanen Endothelzellen (HUVECs) wird durch die Inhibitoren NIM 811 und MM284 signifikant reduziert

Adhäsion CyPB-stimulierter bzw. NIM811- und MM284-inhibierter Thrombozyten auf HUVECs. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte + S.E.M. von 9 ausgezählten Deckgläschen je Versuchsansatz. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett Test bestimmt (*p < 0,05 im Vergleich zum Monozytenmedium mit 200nM CyPB).

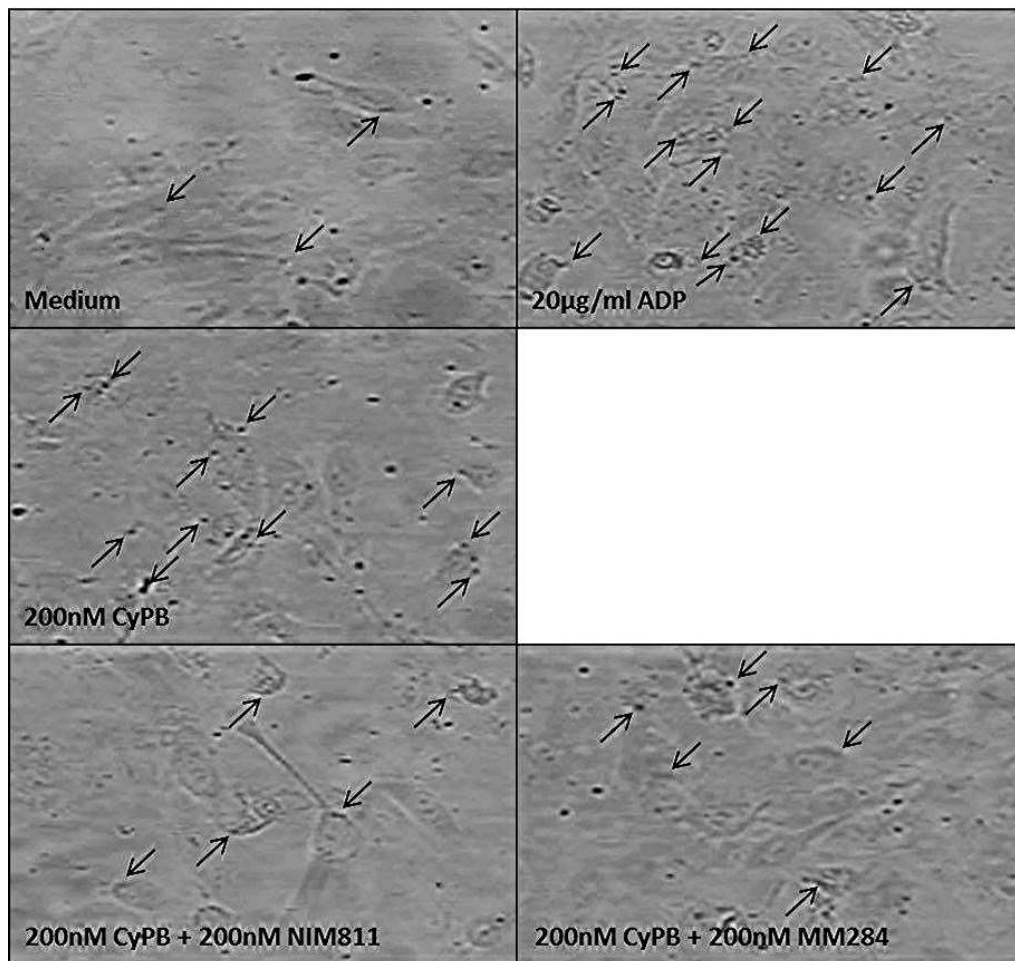


Abbildung 54: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen adhärenter Thrombozyten auf endothelzell-beschichteten Deckgläschen nach Stimulation mit CyPB und nach Inhibition der CyPB-Wirkung mit NIM811 und MM284 im Flusskammer-Versuch.

Die Einzelbilder zeigen einen Bildausschnitt von 200 x 300µm bei 200facher Vergrößerung. Die Pfeile zeigen eine Auswahl adhärenter Thrombozyten auf den HUVEC-beschichteten Deckgläschen.

8 Einfluss von Cyclophilin B auf das Migrationsverhalten von Leukozyten *in vivo* mittels Thioglykolat-induzierter Peritonitis

Die Untersuchung der Wirkung von CyPB auf die Migration von Leukozyten *in vivo* wurde an einem Peritonitis-Modell an Wildtypmäusen (Stamm: C57BL/6J) vorgenommen.

Dazu wurde den narkotisierten Tieren zu Versuchsbeginn 500µl einer 0,5%igen CyPB-Lösung (entsprechend 10µg CyPB pro Maus) intraperitoneal injiziert. Für die Positivkontrolle wurde stattdessen eine intraperitoneale Injektion von 4%igem Thioglykolat vorgenommen. Beide Substanzen waren in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Bei den Tieren, die als Negativkontrolle dienten, wurden 500µl physiologische Kochsalzlösung injiziert. Zur Schmerztherapie wurde den Tieren zu Versuchsbeginn, sowie nach 8 und 16 Stunden Buprenorphin (Dosierung: 25mg/kg Körpergewicht) subkutan verabreicht.

Nach 24 Stunden wurden die Tiere schmerzlos getötet und eine Lavage der Bauchhöhle mit PBS durchgeführt. Anschließend wurden Erythrozyten lysiert und die Gesamtzellzahl in der Lavage bestimmt.

Wie in Abbildung 55 dargestellt, konnte bei den Tieren, die eine intraperitoneale Thioglykolat-Injektion erhalten haben eine signifikante gesteigerte Zellzahl in der Bauchhöhle im Vergleich zur Negativkontroll-Gruppe festgestellt werden. Nach Injektion von CyPB konnte dieser Effekt hingegen nicht beobachtet werden.

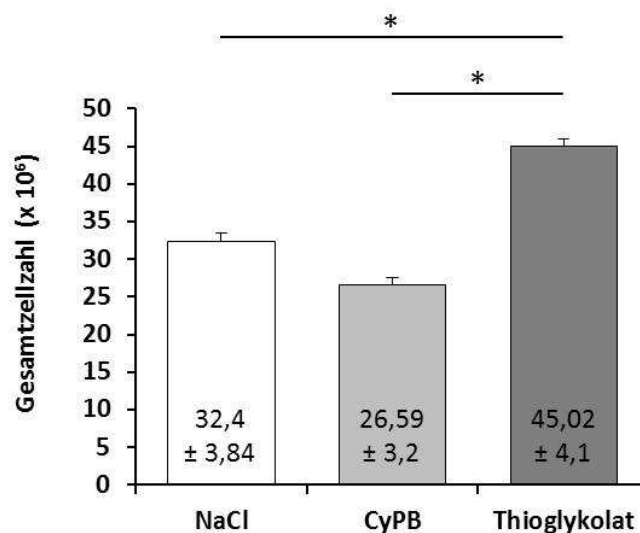


Abbildung 55: Migration von Leukozyten in die Peritonealhöhle von Mäusen nach intraperitonealer Injektion von rekombinantem CyPB, von physiologischer NaCl-Lösung (Negativkontrolle) oder von Thioglykolat (Positivkontrolle)

Gesamtzellzahl in der Bauchhöhlenlavage der Mäuse, 24 Stunden nach intraperitonealer Injektion der Substanzen (Angabe ist der Mittelwert + S.E.M. von jeweils 5 Tieren bei Thioglykolat bzw. von 7 Tieren bei NaCl und CyPB. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett Test bestimmt (*p < 0,05 im Vergleich zu Thioglykolat).

IV ERGEBNISSE

Um zu untersuchen, ob die Applikation von CyPB eventuell zu einer prozentualen Veränderung der Migration von bestimmten Leukozytensubpopulationen führt, wurden die Zellen nach einer Markierung mit Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenantigene, die spezifisch für die jeweilige Subpopulation sind, durchflusszytometrisch identifiziert.

Für die Färbung wurden jeweils 5×10^5 Zellen in 200 μ l 0,5%igem Paraformaldehyd (PFA) mit je 10 μ l F4/80-APC (Marker für Makrophagen), CD11b-APC (Marker für Monozyten, Makrophagen, Granulozyten sowie NK-Zellen), Ly-6G-APC (Marker für neutrophile Granulozyten) und CD3-APC (Marker für T-Zellen) für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden die Zellpopulationen mit Hilfe des Durchflusszytometers quantifiziert.

Dabei zeigte sich, dass es durch die intraperitoneale CyPB-Injektion nach 24 Stunden zu keiner gesteigerten Migration von F4/80-positiven, CD11b-positiven, Ly-6G-positiven oder CD3-positiven Leukozyten-Subpopulationen in die Bauchhöhle von C57BL/6-Mäusen kam (siehe Abb. 56).

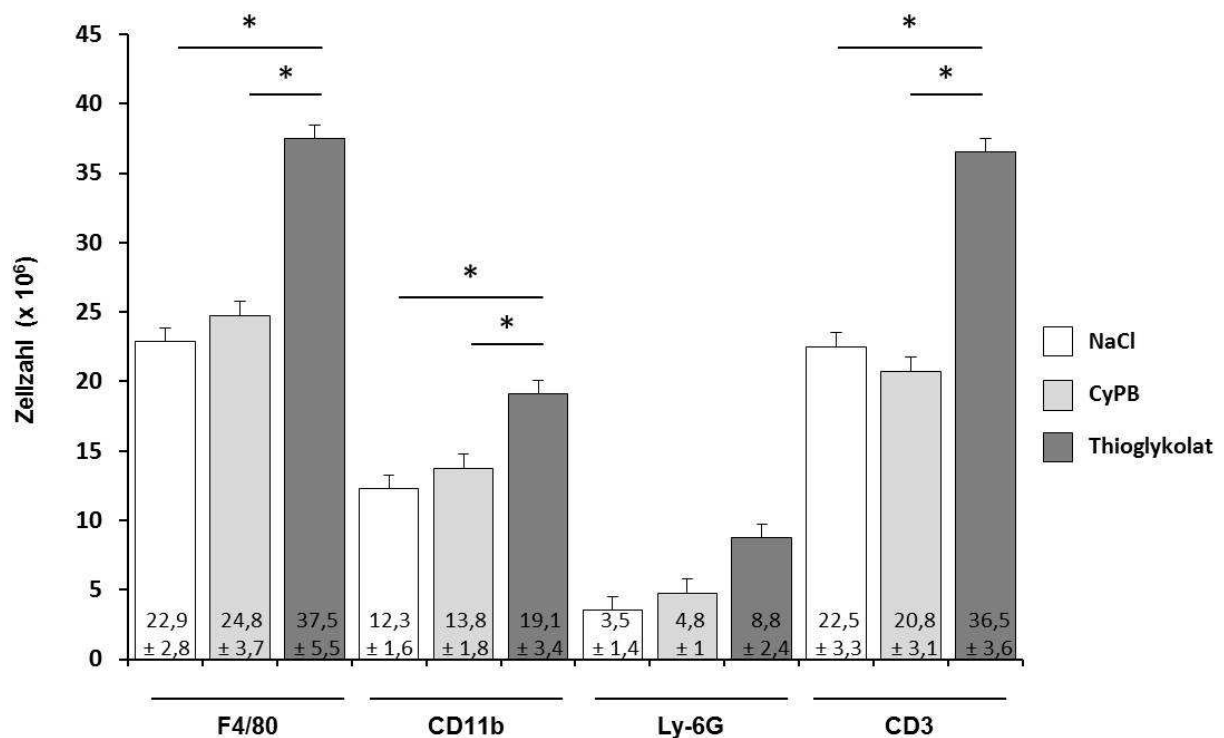


Abbildung 56: Migration von bestimmten Leukozyten-Subpopulationen in die Peritonealhöhle von Mäusen nach intraperitonealer Injektion von rekombinantem CyPB, von physiologischer NaCl-Lösung (Negativkontrolle) oder von Thioglykolat (Positivkontrolle)

Eine Migration von F4/80-positiven, CD11b-positiven, Ly-6G-positiven bzw. CD3-positiven Zellen in die Bauchhöhle von C57BL/6-Mäusen wurde 24 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 10 μ g CyPB nicht signifikant gesteigert. Angegeben ist der Mittelwert + S.E.M. von jeweils 5 Mäusen bei Thioglykolat bzw. von 7 Tieren bei NaCl und CyPB. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett Test bestimmt (*p < 0,05 im Vergleich zu Thioglykolat). n.s. = nicht signifikant;

IV ERGEBNISSE

Zur Untersuchung des systemischen Einflusses der intraperitonealen CyPB-Injektion, wurde den Mäusen 2 Tage vor den intraperitonealen Injektionen sowie 24 Stunden nach den intraperitonealen Injektionen von CyPB, physiologischer NaCl-Lösung (Negativkontrolle) sowie von Thioglykolat (Positivkontrolle) Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Die Gesamtleukozytenzahl wurde mit Hilfe eines Hämatologie-Analysegerätes bestimmt.

Wie die in Abbildung 57 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, führt die intraperitoneale Injektion von CyPB nach 24 Stunden zu keiner signifikanten Veränderung der Leukozytenzahl im peripheren Blut der Versuchstiere im Vergleich zum Ausgangswert vor der Injektion. Nach i.p. Injektion von Thioglykolat kommt es im Blutbild zu einem signifikanten Anstieg der Leukozytenzahl im Vergleich zum Ausgangswert vor der Behandlung.

Nach i.p. Injektion von CyPB kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Leukozytenzahl im peripheren Blut im Vergleich zur Negativkontroll-Gruppe (i.p. NaCl-Injektion) und Positivkontroll-Gruppe (i.p. Thioglykolat-Injektion).

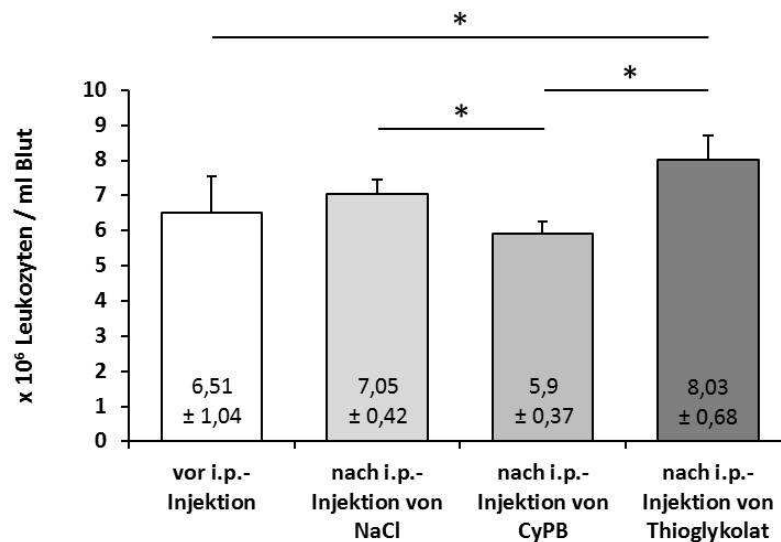


Abbildung 57: Vergleich der Leukozytenzahl im peripheren Blut von Mäusen 48 Stunden vor und 24 Stunden nach der intraperitonealen Injektion von CyPB, physiologischer NaCl-Lösung (Negativkontrolle) und Thioglykolat (Positivkontrolle)

Angegeben ist der Mittelwert + S.E.M. von 10 Mäusen vor Induktion der Peritonitis, von 4 Mäusen der NaCl-Gruppe, sowie von je 3 Mäusen der Thioglykolat- bzw. CyPB-Gruppe. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett Test bestimmt (*p < 0,05).

V Diskussion

1 Diskussion der Versuchsmethoden

1.1 Diskussion der *in vitro*-Methoden

1.1.1 Immunhistologie

Die Immunhistochemie ist eine häufig genutzte Methode, bei der Antigene wie Proteine oder Polysaccharide mit Hilfe von markierten Antikörpern spezifisch nachgewiesen werden können.³⁶¹ Die Methode kann sowohl bei Zellkulturen als auch bei Gewebeschnitten angewendet werden.

Bei der Immunhistochemie handelt es sich um eine sehr sensitive aber auch relativ fehleranfällige Methode. Die nachzuweisenden Antigene werden dabei mit Hilfe eines enzymgekoppelten Antikörpers erfasst. Das Enzym setzt sein Substrat - ein sogenanntes Chromogen - zu einem sichtbaren Farbstoff um und macht das Antigen so sichtbar.

Enzyme sind in der Lage, innerhalb kurzer Zeit große Mengen Substrat umzusetzen. Dies führt zu einer deutlichen Signalverstärkung und ist für die hohe Sensitivität der Methode verantwortlich. Jedoch ist die Enzymaktivität stark abhängig von äußeren Einflüssen wie zum Beispiel der Temperatur, dem herrschenden pH-Wert und der Substratkonzentration. Sind diese Faktoren nicht optimal aufeinander abgestimmt, so kann dies zu einer mangelhaften Qualität der Färbung führen.

Ein weiterer Grund für die Fehleranfälligkeit der Methode ist in den Bindungseigenschaften des Antikörpers zu sehen. Antikörper sollten eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber dem nachzuweisenden Antigen besitzen und möglichst keine Kreuzreaktionen eingehen. Aus diesem Grund ist es wichtig, den Antikörper in Vorversuchen umfassend zu testen und dabei gegebenenfalls auch Antikörper mehrerer Hersteller auszuprobieren. Dies kann in einigen Fällen zu nennenswerten Kosten führen.

Für die Färbung der atherosklerotischen Plaque wurde in dieser Arbeit ein kommerziell erhältliches Immunhistochemie-Kit verwendet. Demnach ist davon auszugehen, dass die einzelnen Färbekomponenten hinsichtlich pH-Wert, Pufferkapazität etc. optimal aufeinander abgestimmt sind und Fehlerquellen somit auf ein Minimum reduziert wurden. Lediglich der Primärantikörper musste in einigen Vorversuchen an das Kit angepasst werden.

Wichtig zu erwähnen ist allerdings, dass es trotz optimaler Abstimmung aller Färbekomponenten zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung insbesondere im Bindegewebe kommen kann. Hierfür sind beispielsweise das Vorkommen von endogener Peroxidase oder auch das Vorhandensein von Biotin im Bindegewebe verantwortlich. Diese Gewebsanteile können im Verlauf der Immunhistochemie mit den Färbekomponenten interagieren und so zu einer unspezifischen Braunfärbung von Bindegewebsanteilen führen.

Diese Braunfärbung kann nicht von dem Signal, das durch die mittels Antikörper detektierten Antigene entstanden ist, unterschieden werden, sodass die Färbung nicht mehr zu beurteilen wäre. Aus diesem Grund werden in jedem Versuchsansatz parallel zur Färbung mit dem spezifischen Antikörper auch Kontrollfärbungen (Negativ- und Isotyp-Kontrolle) durchgeführt. Bei der

Negativkontrolle wird die Färbung ohne einen Antikörper durchgeführt, bei der Isotyp-Kontrolle kommt ein Isotyp-Antikörper zum Einsatz, der aus derselben Tierart wie der Antikörper gegen das nachzuweisende Antigen stammt. Durch einen Vergleich der Intensität der Braunfärbungen in den verschiedenen Färbungen kann zwischen unspezifischen Reaktionen und einem spezifischen Antikörper-Signal differenziert werden.

Bei den immunhistologischen Färbungen in dieser Arbeit brachte die hier beschriebene Problematik keine großen Schwierigkeiten. Bei den Negativkontrollen (mikroskopische Aufnahmen nicht gezeigt) konnte nahezu keine unspezifische Hintergrundfärbung detektiert werden. Bei den Färbungen der Isotyp-Kontroll-Gruppe lag jedoch eine minimale Braunfärbung vor. Diese war allerdings deutlich schwächer ausgeprägt als bei den Färbungen der Gruppe mit den anti-CyPB-Antikörpern, sodass der Brauntön bei den mit dem anti-CyPB-Antikörper gefärbten Schnitten eindeutig als positives Signal gewertet werden kann.

1.1.2 Immunfluoreszenzfärbung

Bei der Immunfluoreszenz handelt es sich um eine spezielle Form der Immunhistochemie, bei der die Antikörper mit einem Fluorochrom gekoppelt sind.

Die Fluoreszenzfarbstoffe werden chemisch an die Antikörper gebunden, was die Eigenschaften der Antikörper verändern kann. Daher sind auch hier Vorversuche nötig, bei denen die Antikörper zunächst bezüglich ihrer Funktionalität getestet werden müssen.

Ein großer Vorteil von Immunfluoreszenzfärbungen liegt in ihrer einfachen und schnellen Durchführbarkeit und in ihrer hohen Sensitivität. Die indirekte Immunfluoreszenz weist gegenüber der direkten Immunfluoreszenz eine deutlich erhöhte Sensitivität auf, da mehrere fluorchrom-gekoppelte Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden können und es somit zu einer Amplifikation des Signals kommt.³⁶²

Ein weiterer Vorteil der Methode liegt in der Möglichkeit, verschiedene Antigen-Strukturen gleichzeitig in einem Präparat nachzuweisen. Dadurch ist es zum Beispiel möglich, die Lokalisation eines Proteins in einem bestimmten Zellkompartiment nachzuweisen. Ein solcher Versuchsansatz erfordert die Verwendung unterschiedlicher Fluorochrome, die durch unterschiedliche Licht-Wellenlängen angeregt werden. Dies kann allerdings durch mögliche Interaktionen zwischen den verschiedenen Antikörpern zu Schwierigkeiten bei der Färbung führen.

Ein großer Nachteil bei Immunfluoreszenzfärbungen liegt in der Instabilität der Fluorochrome. Daher muss die Färbung ab dem Zeitpunkt, bei dem der fluorchrom-gekoppelte Antikörper eingesetzt wird, möglichst im Dunkeln durchgeführt werden. Auch die Lagerung der gefärbten Präparate muss im Dunkeln geschehen, und die Auswertung sollte im Optimalfall innerhalb von ein bis zwei Tagen durchgeführt werden, da die Fluoreszenz sonst nachlassen könnte. Ebenso sollte bei der mikroskopischen Auswertung auf zügiges Arbeiten geachtet werden, da die Fluorochrome auch durch das Anregungslicht zerfallen und verblassen.

Ein weiterer Nachteil dieser Methode besteht in dem hohen apparativen Aufwand für die Auswertung. Es wird ein spezielles Fluoreszenzmikroskop sowie eine Kamera mit spezieller Software benötigt, um die Präparate auszuwerten.

Ein häufig auftretendes Problem bei Immunfluoreszenzfärbungen liegt darin, dass die Antikörper häufig unspezifische Reaktionen mit Gewebekomponenten eingehen und somit unspezifische Signale vorliegen. Dies kann sowohl von der Qualität des Antikörpers als auch von der Art des Untersuchungsmaterials abhängen. Diese beiden Faktoren sind also maßgeblich verantwortlich für die Qualität der Färbung.

Die Immunfluoreszenzfärbungen für die Versuche dieser Arbeit wurden nach einem in unserem Labor etablierten Standard-Protokoll (wie im Methoden-Teil dieser Arbeit beschrieben) durchgeführt. Somit waren auch hier potentielle Fehlerquellen auf ein Minimalmaß reduziert. Da derselbe Primärantikörper wie bei der Immunhistochemie der atherosklerotischen Plaque verwendet wurde und dieser hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften somit schon getestet war, musste lediglich noch die benötigte Arbeitskonzentration in Vorversuchen ermittelt werden.

1.1.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode dar, bei der Zellen einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet werden und dadurch identifiziert werden können. Dabei wird die Lichtbrechung (*forward und side scatter*) an den Partikeln gemessen. Diese Komponenten sind charakteristisch für verschiedene Zellen und ermöglichen so die Zuordnung zu einem bestimmten Zelltyp.³⁵⁹

Bei der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie können durch die zusätzliche Markierung der Zellen mit fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern darüber hinaus bestimmte Oberflächenantigene identifiziert und die Zellen so noch näher charakterisiert werden.³⁵⁹

Es handelt sich also um eine Methode bei der mehrere Parameter gleichzeitig erfasst werden können. Sowohl die Lichtbrechung als auch das emittierte Fluoreszenzsignal können zueinander in Bezug gebracht werden. Auf diese Weise entsteht ein genaues Bild der Zellen.

Ein weiterer Vorteil der Durchflusszytometrie ist darin zu sehen, dass sehr große Zellzahlen in kurzer Zeit ausgewertet werden können.

Ein Nachteil der Methode besteht in der Gefahr einer unspezifischen Zellaktivierung im Rahmen der Färbung der Zellen mit den fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern. Diese tritt besonders häufig bei Zellmonokulturen auf und entsteht im Rahmen der erforderlichen Zentrifugationsschritte und beim Pipettieren. Hierbei kann es zu einer Veränderung der Antigene auf der Oberfläche der zu untersuchenden Zellen kommen und somit zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse. Diese könnten sich beispielsweise als falsch positive Signale bei den Negativkontrollen oder als stark unterschiedliche und widersprüchliche Messergebnisse bei den Versuchswiederholungen zeigen. Um das Risiko einer unspezifischen Zellaktivierung zu reduzieren, erfolgte das Handling der Zellen möglichst vorsichtig und die erforderlichen Zentrifugationsschritte, die damit zusammenhängende

Resuspendierung der Zellen sowie weitere erforderliche Pipettierschritte wurden in dem angewendeten Versuchsprotokoll auf das notwendige Maß reduziert.

Ein weiterer sehr großer Nachteil der Methode ist in den hohen Anschaffungskosten des Durchflusszytometers sowie in seiner Wartung zu sehen. Außerdem ist die Handhabung des Gerätes sehr komplex und erfordert ein breites Hintergrundwissen. Aus diesem Grund wurde die Grundeinstellung des Gerätes in den Vorversuchen zusammen mit einer erfahrenen Person vorgenommen.

Darüber hinaus kann auch die zeitaufwändige Pflege des Gerätes (Reinigungs- und Spülvorgänge nach der Benutzung) als nachteiliger Faktor gewertet werden.

1.1.4 Zymographie

Matrix Metalloproteinasen sind durch den Abbau der extrazellulären Matrix wesentlich an der Destabilisierung der atherosklerotischen Plaque beteiligt. Außerdem ermöglichen sie die Auswanderung von Entzündungszellen im Rahmen der Atherogenese.

Die Gelatine-Zymographie ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Detektion der Matrix Metalloproteinasen 2 und 9 in Zelllysaten oder Zellkulturüberständen. Neben der Zymographie können zum Beispiel auch der Western-Blot oder die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) zum Nachweis von Matrix Metalloproteinasen zum Einsatz kommen.^{179,209,363,364}

Die Zymographie stellt eine sehr sensitive Methode dar. Darüber hinaus ist sie relativ kostengünstig, da keine Antikörper wie bei der PCR oder beim Western Blot benötigt werden.

Die vielen Einzelschritte bei der Durchführung einer Zymographie bergen allerdings zahlreiche Fehlerquellen.

So ist ein wichtiger Aspekt, dass die Elektrophorese bei möglichst niedriger Temperatur stattfindet. Dies ist vonnöten, damit die Enzyme inaktiviert bleiben und nicht schon während der Wanderung durch das Gel die darin enthaltene Gelatine abbauen. Im Optimalfall sollte die Elektrophorese also in einem Kühlraum stattfinden oder die Gelkammer während der Laufphase gekühlt werden. Außerdem sollte gekühlter Laufpuffer verwendet werden und eine möglichst niedrige Spannung angelegt werden, damit sich die Kammer nicht aufheizt.

Außerdem sollte die Renaturierung der Proteasen möglichst mit angewärmtem Renaturierungspuffer bei 37°C stattfinden, damit man eine möglichst vollständige Renaturierung der Enzyme erzielen kann. Auch die Verdauung der Gelatine durch die Matrix Metalloproteinasen sollte bei physiologischen Temperaturen stattfinden, da die Gelatinasen in diesem Temperaturbereich optimal arbeiten können.

Ein weiteres Problem stellt das Herausnehmen der Gele aus dem Rahmen dar. Die Gele sind im nassen Zustand sehr fragil und neigen dazu, zu reißen. Auch bei der Trocknung der Gele besteht die Gefahr des Reißens, da sie durch die Trocknung spröde werden. Daher muss die Trocknung in einem

Spannrahmen erfolgen. Außerdem sollten die Gele nach dem Trocknen eingescannt werden, damit sie für die Auswertung erhalten bleiben.

Eine weitere Fehlerquelle könnte die Vorbehandlung des Blutes nach der Entnahme darstellen. Nicht veröffentlichte Vorversuche haben gezeigt, dass diese einen wesentlichen Einfluss auf die MMP-Sekretion der Monozyten hat. Um höhere Zellzahlen zu gewinnen, wurden die Vorversuche zunächst mit Monozyten, die aus *buffy coats* (Zentrum für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Tübingen) gewonnen wurden, durchgeführt. Dabei konnten wir feststellen, dass bei diesen Zellen keine Steigerung der MMP-Sekretion durch Stimulation mit LPS erzielt werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass entweder die Gerinnungshemmung bei der Blutentnahme oder die nachfolgende Behandlung des Blutes einen Einfluss auf die Funktionalität der Monozyten haben könnte.

1.1.5 Chemotaxis-Assay

Die Migration von Entzündungszellen stellt einen Schlüsselprozess im Rahmen entzündlicher Prozesse dar. Auch für die Atherosklerose kann die Auswanderung von Monozyten als eine Grundvoraussetzung für die Entstehung der Läsionen angesehen werden.

Um die Migration von Zellen zu untersuchen, wurden im Laufe der Zeit viele verschiedene Methoden entwickelt. Das erste Modell war die sogenannte Boyden-Kammer.³⁶⁵ Sie besteht aus zwei übereinanderliegenden Kammern, die durch einen Filter getrennt werden. Die obere Kammer wird mit den beweglichen Zellen gefüllt, die untere mit den chemotaktisch wirksamen Substanzen. Die beweglichen Zellen wandern entlang des chemotaktischen Gradienten, bleiben im Filter hängen und können fixiert, gefärbt und quantifiziert werden.

Die ursprüngliche Boyden-Kammer wurde zwischenzeitlich mehrfach modifiziert.³⁶⁶⁻³⁷³ Heute sind *multiwell*-Kammern die am weitesten verbreiteten Modelle zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von Zellen. Ein großer Vorteil dieser *multiwell*-Kammern ist darin zu sehen, dass mehrere Versuchsansätze zur selben Zeit und bei identischen Bedingungen durchgeführt werden können.

Die Methode der modifizierten Boyden-Kammer ist einfach durchzuführen und bedarf keiner aufwändigen Apparaturen. Außerdem ist sie quantitativ auswertbar und somit statistisch gut bewertbar. Allerdings ist ein großer Zeit- und Arbeitsaufwand für die mikroskopische Auswertung der gefärbten Filter nötig.

Ein weiterer Nachteil der Methode ist, dass Konzentrationsgradienten in Kultur laut Literatur nicht sehr lange aufrechterhalten werden können. Daher wird für die meisten Arten von Migrationsversuchen empfohlen, Zeiträume von 4 Stunden nicht zu überschreiten.³⁷⁴

Ein Problem, das bei der Versuchsdurchführung häufig auftreten kann, ist, dass sich Luftblasen beim Befüllen der Kammer bilden. Diese führen auf dem Filter zu zellfreien Bereichen und verfälschen das Ergebnis. Daher ist es wichtig, dass beim Befüllen der Vertiefungen ein kleiner Flüssigkeitsmeniskus

entsteht. Dieser darf jedoch nicht zu groß werden, da sonst das Risiko des Ineinanderlaufens der unterschiedlichen Substanzen beim Auflegen des Filters besteht.

Auch beim Auseinandernehmen der Kammer und dem Handling des Filters während des Waschens und Färbens ist Vorsicht geboten. So darf die „Zellseite“ des Filters nicht berührt werden oder der Filter vor der Fixation austrocknen.

Für den Chemotaxis-Assay der vorliegenden Arbeit wurde eine *multiwell*-Boyden-Kammer mit 48 Migrationskammern verwendet, wodurch gewährleistet werden konnte, dass pro Versuchsdurchgang alle eingesetzten Substanzen unter denselben Versuchsbedingungen getestet wurden. Der Versuch wurde nach einer im Labor bereits etablierten Methode (wie im Methodenteil beschrieben) durchgeführt.

1.1.6 Flusskammer

Die Extravasation, also die Auswanderung von Zellen aus dem Blutgefäßsystem in das umliegende Gewebe, gilt als Schlüsselprozess bei Entzündungserscheinungen. Auch bei der Atherosklerose stellt die Auswanderung von Entzündungszellen einen wichtigen Faktor dar, der die Entstehung einer Plaque mitverursacht.

Statische Versuchsmodelle vernachlässigen die dynamischen Kräfte, die innerhalb eines Blutgefäßes auf Zellen einwirken. Somit lassen sich mit diesen Modellen keine aussagekräftigen Erkenntnisse bezüglich des Adhäsionsverhaltens von Zellen unter physiologischen Bedingungen gewinnen.

Das Flusskammermodell hingegen stellt eine weit verbreitete *in vitro*-Methode dar, mit deren Hilfe die physiologischen Strömungsverhältnisse, die in einem Blutgefäß herrschen, nachgestellt werden können.³⁷⁵⁻³⁸¹ Sie ermöglicht die Beobachtung des Adhäsionsverhaltens von Zellen an einer variablen Matrix unter (patho-)physiologischen, dynamischen Flussbedingungen. Innerhalb unseres Labors ist das Flusskammermodell gut etabliert und wurde bereits vielfach für verschiedene Versuche eingesetzt.^{316,382,383}

In Abhängigkeit von den Maßen des Flusskammerkanals sowie der Geschwindigkeit, mit der die zu untersuchenden Zellen durch die Flusskammer perfundiert werden, können unterschiedliche Scherraten erreicht werden und somit physiologische sowie pathophysiologische Flussbedingungen simuliert werden.

Je nach Fragestellung kann die Flusskammer mit Vollblut oder mit bestimmten Zelltypen perfundiert werden. Die einzelnen Zelltypen können dabei mit verschiedenen Substanzen vorbehandelt und in ihrem Verhalten beeinflusst werden. So können sie beispielsweise mit diversen Substanzen stimuliert oder inhibiert werden, oder ihre Oberflächenmoleküle können blockiert werden. Dies ermöglicht es, präzise Erkenntnisse über die Funktion verschiedener Rezeptoren zu gewinnen.

Als Untersuchungsmatrix für die stationäre Phase der Flusskammer können unterschiedlichste Substanzen dienen. So können beispielsweise Matrixbestandteile wie Kollagen, unterschiedliche Adhäsionsmoleküle oder ganze Zellen verwendet werden. Letztere können ihrerseits auch durch

V DISKUSSION

verschiedene Substanzen aktiviert oder gehemmt werden. Auf diese Weise lassen sich unter anderem spezifische Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen oder Wechselwirkungen zwischen Zellen und bestimmten Oberflächenmolekülen genauer untersuchen.

Die mannigfaltigen experimentellen Variationen, die das Flusskammermodell bietet, erlauben es, vielfältige Erkenntnisse über die Interaktionen von Zellen mit anderen Zellen, mit Rezeptoren oder mit Matrices zu gewinnen.

Ein bedeutender Vorteil der Flusskammermethode ist, dass man das Verhalten von Zellen zunächst *in vitro* untersuchen kann, bevor man auf Tiermodelle zurückgreift, um die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse *in vivo* zu verifizieren. Auf diese Weise lassen sich die benötigten Tierzahlen für Tierversuche deutlich reduzieren.

Ein weiterer Vorteil der Flusskammermethode liegt in ihrer relativ einfachen Durchführbarkeit. Es werden keine aufwändigen Gerätschaften benötigt und die Versuchsbedingungen können bei Versuchswiederholungen leicht reproduziert werden.

Trotz der einfachen Methodik des Modells gab es bei der Durchführung der Flusskammerversuche in vorliegender Arbeit auch einige Schwierigkeiten. Insbesondere die Undichtigkeit der Flusskammer war ein häufig auftretender Störfaktor. Der Spannring mit dem die Deckgläschen auf der Flusskammer-Basis befestigt wurden, stand oftmals unter Spannung, sodass er sich während des Versuchs gelöst hat und die Kammer dabei undicht wurde oder das Deckgläschen durch die Spannung plötzlich gesprungen ist, was zur Folge hatte, dass der entsprechende Versuchsansatz abgebrochen werden musste.

Auch bei den Versuchen mit den endothelzellbeschichteten Deckgläschen gab es häufiger Probleme. Durch die Kultivierung der HUVECs kommt es zu Veränderungen der Endothelzellen, die mit zunehmender Passagezahl ausgeprägter werden. Je nach Passagezahl der HUVEC-Zellen zeigten diese ein unterschiedlich gutes Adhäsionsverhalten auf den gelatinebeschichteten Deckgläschen, mit der Folge, dass sie sich durch die Scherkräfte der vorbeifließenden Zellsuspension oftmals vom Deckgläschen ablösten. Um dies zu vermeiden, wurden stets Zellen mit möglichst niedriger Passagezahl verwendet. Außerdem konnte dieser Effekt dadurch abgemildert werden, dass die Thrombozyten anstelle von PBS in HUVEC-Medium durch die Kammer perfundiert wurden.

Wichtig zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang, dass die Auswertung der Versuchsaufzeichnungen nur in den Bezirken erfolgen durfte, in denen ein konfluenter HUVEC-Zellrasen vorlag. Dadurch wurden nur diejenigen Thrombozyten ausgezählt, die an Endothelzellen hafteten.

Ein Nachteil der Flusskammermethode ist, dass andere physiologische Faktoren neben der Flussrate wie zum Beispiel eine physiologische Körpertemperatur im Modell nur bedingt nachgestellt werden können. Die Zellen wurden zwar bei 37°C inkubiert, das Perfusionsmedium vorgewärmt und die Zellsuspension bis zur Verwendung bei 37°C gelagert und auch die Temperatur hielt sich in der Spritze bei der Durchführung des Versuchs relativ gut bis zum Ende des Versuchs, jedoch war die Zellsuspension im Schlauchsystem bis zum Erreichen der Flusskammer zu einem gewissen Grad abgekühlt. Dies könnte einen Einfluss auf die Adhäsion der Zellen an der stationären Phase nehmen und zu unterschiedlichen Ergebnissen im Vergleich zum *in vivo*-Modell führen.

Auch eine pulsatile Strömung, wie sie im arteriellen Blutsystem herrscht, konnte mit dem für die Versuche genutzten Perfusor nicht hergestellt werden. Dies stellt einen weiteren Unterschied dar, der zu andersartigen Reaktionen der Zellen im Vergleich zum natürlichen System führen könnte. Dieser Unterschied könnte mit einer programmierbaren Pumpe, die in der Lage ist einen pulsatilen Fluss zu generieren, ausgeglichen werden.^{384,385}

Ein weiteres Problem stellte die Sedimentation der Zellen in der Perfusorspritze während der zehnminütigen Vorlaufzeit dar. Hierdurch veränderte sich die Zellkonzentration in der Zellsuspension mit der Zeit. Aus diesem Grund wurde für jedes Deckgläschen eine separate Perfusorspritze verwendet, die vor dem Einlegen in den Perfusor vorsichtig geschwenkt wurde, um die Zellen zu resuspendieren.

In den vorliegenden Versuchen wurden die Interaktionen von Thrombozyten mit extrazellulärer Matrix (Kollagen), mit Endothelzellen und mit immobilisiertem, rekombinanten CyPA und CyPB untersucht. Die Scherrate von 2000 s^{-1} , die durch die Kombination aus Perfusionsgeschwindigkeit und Dicke des Dichtungsringes, der die Abmessungen des Flusskanals begrenzte, eingestellt wurde, galt für alle Versuchsansätze. Sie entspricht dem Wert bei physiologischer Flussgeschwindigkeit im arteriellen Blutgefäßsystem.

1.2 Diskussion der *in vivo*-Methoden

1.2.1 Tiermodelle in der Atheroskleroseforschung und Gründe für die Wahl der Maus als Versuchstier

In der Atheroskleroseforschung kamen im Laufe der Zeit unterschiedliche Tiermodelle zum Einsatz, mit deren Hilfe die Pathomechanismen, die der Atherosklerose zugrunde liegen, genauer erforscht und neue Therapiemethoden entwickelt werden sollen.¹¹¹

Ein wichtiger Parameter bezüglich der Eignung einer Spezies als Modell für die Atheroskleroseforschung ist, dass sie Läsionen sowie die zugehörigen Komplikationen entwickelt, die denen des Menschen möglichst ähnlich sind.¹¹¹

Die verwendeten Tiermodelle lassen sich in 4 verschiedene Kategorien einteilen:¹¹²

- Modelle, bei denen die Läsionen durch unterschiedliche Methoden induziert werden: hierzu kommen neben diätetischen Induktionsmethoden auch physikalische, chemische oder immunologische Methoden zum Einsatz;¹¹¹
- Modelle, bei denen sich die Läsionen spontan entwickeln;
- nichtreaktive Modelle;
- Modelle, für die es kein Pendant beim Menschen gibt;

Das erste Tiermodell, an welchem die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen untersucht wurde, war das Kaninchen.³⁸⁶ Kurze Zeit später konnte Anitschkow beweisen, dass diese

Veränderungen durch die Fütterung von großen Mengen Cholesterin hervorgerufen werden können.³⁸⁷

In den frühen Phasen der Atheroskleroseforschung wurden häufig auch nichtmenschliche Primaten und Schweine verwendet.³⁸⁸⁻³⁹² Die Ähnlichkeiten zwischen Mensch und nichtmenschlichen Primaten (beispielsweise die Thrombozytenfunktion, das fibrinolytische System oder die Pharmakokinetik von Medikamenten) sprachen für die Nutzung dieser Modelle zur Erforschung kardiovaskulärer Pathologien. Auch das Schwein bietet einige Vorteile, die es zu einem guten Modell zur Erforschung der Atherosklerose machten. Wie bereits beschrieben, entwickelt es spontan atherosklerotische Läsionen. Außerdem ähnelt die Anatomie des Herzens derjenigen des Menschen. Gegen die Nutzung dieser Tierarten sprechen einerseits die hohen Haltungskosten, der große Platzbedarf und ein nicht unkompliziertes Handling der Tiere. Eine ungenaue genetische Charakterisierung, ein Mangel an verfügbaren Antikörpern sowie transgener Tiermodelle sind weitere nachteilige Eigenschaften dieser Tierarten. Darüber hinaus sprechen ethische Bedenken, insbesondere bei den Primaten, gegen die Nutzung dieser Tierarten in der Atheroskleroseforschung.³⁸⁹

Neben diesen Tierarten wurden im Laufe der Zeit auch viele andere Tierarten wie Ratten, Hunde, Hamster, Meerschweinchen und Tauben als Versuchstiere eingesetzt.^{111,112,393-397}

Keines dieser Tiermodelle ist jedoch optimal zur Erforschung aller Phasen der Atherosklerose geeignet. Einige dienen besser zur Erforschung der Initiation, andere für die Erforschung der Progression oder von Atherosklerose-Endstadien.¹¹² Hunde, Hamster, Meerschweinchen und Vögel unterliegen insbesondere in Bezug auf die Haltungsbedingungen außerdem vielen limitierenden Faktoren, die zur Folge haben, dass sie seltener für die Atheroskleroseforschung eingesetzt werden.³⁹⁷

Heute werden in der Atheroskleroseforschung in erster Linie Mäuse und Kaninchen als Versuchstiere verwendet.¹¹²

Wichtige Gründe für die Wahl der Maus als Versuchstier sind vor allem in der relativ einfachen und kostengünstigen Haltung zu sehen. Weitere Vorteile der Maus liegen beim geringen Platzbedarf für Haltung und Versuche, im einfachen Handling, sowie in der kurzen Generationszeit und einer hohen Reproduktionsrate. Auch ist die Maus relativ unempfindlich gegenüber Umwelteinflüssen (wie z.B. Geräuschen) und stellt keine besonderen Ansprüche an ihre Ernährung.

Das Genom der Maus ist vollständig entschlüsselt. Dies bietet die Möglichkeit, genetische Manipulationen vorzunehmen und *knockout*-Stämme zu schaffen. Bei diesen können die Auswirkungen des Fehlens bestimmter Gene und der entsprechenden Genprodukte untersucht werden.

Einige Gen-*knockouts* führen dazu, dass die Tiere bestimmte Erkrankungen entwickeln, die denen des Menschen ähneln. Diese „Krankheitsmodelle“ können gezielt gezüchtet werden und bieten die Möglichkeit, die Pathomechanismen, die den entsprechenden Erkrankungen des Menschen zugrunde liegen, aufzudecken.

Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da genetisch unveränderte Mäuse keine atherosklerotischen Läsionen entwickeln. Dies ist auf ihren Lipidstoffwechsel zurückzuführen, der

sich von demjenigen des Menschen stark unterscheidet. Cholesterin wird bei ihnen größtenteils in HDL-ähnlichen Partikeln transportiert.³⁸⁹ Aus diesem Grund wurden transgene Mauslinien wie die Apolipoprotein E-defiziente Maus (ApoE^{-/-}-Maus) und die LDL-Rezeptor-defiziente Maus (LDL^{-/-}-Maus) gezüchtet.³⁹⁸

Vor der Verfügbarkeit dieser modifizierten Maus-Stämme, war die Wildtypmaus (C57BL6/J-Maus oder *Black six*-Maus) das am häufigsten genutzte Modell in der Atheroskleroseforschung.^{388,399,400} Sie gilt als sehr robust, langlebig, fortpflanzungsfreudig und tumorresistent. Bei normaler Fütterung entwickelt dieser Mausstamm keine atherosklerotischen Veränderungen und kann daher auch gut als Modell für vielfältige andere Versuche eingesetzt werden.⁴⁰¹ Unter entsprechender atherogener Diät (cholesterin- und lipidreich, auch als *Western-type-Diet* bezeichnet) bilden sie nach einigen Wochen atherosklerotische Veränderungen in der Aorta aus.⁴⁰¹ Diese unterscheiden sich allerdings von denjenigen des Menschen. Sie ähneln ausgedehnten *fatty streaks*, die große Mengen von Schaumzellen und teilweise glatten Muskelzellen enthalten.^{388,400} Außerdem finden sich die Läsionen im Gegensatz zum Menschen hauptsächlich im Aortenstamm.³⁸⁸

Seit der Entwicklung der transgenen Mauslinien, ist die ApoE-*knockout*-Maus das am häufigsten verwendete Modell zur Erforschung der Atherosklerose.³⁹⁸ ApoE-*knockout*-Mäuse entwickeln bereits ohne diätetische Beeinflussung eine schwere Hypercholesterinämie und zeigen schon im Alter von 3 Monaten *fatty streaks* in der Aorta, die mit zunehmendem Alter weiter fortschreiten.^{388,402} Diese Eigenschaften machen die ApoE^{-/-}-Maus zu einem geeigneten Modell für die Erforschung der Atherogenese und den daraus resultierenden Veränderungen.⁴⁰²

Durch die Fütterung einer *Western-type-Diet* kann die Hypercholesterinämie bei diesen Mäusen noch zusätzlich verstärkt werden. In der Folge kommt es zu erhöhten Plasma-Konzentrationen von *very low density-lipoprotein*, *intermediate lipoprotein* und *low density-lipoprotein* und zu einer deutlich frühzeitigeren Atherogenese.³⁸⁸

Die atherosklerotischen Veränderungen dieser Linie sind denen des Menschen sehr ähnlich und umfassen das gesamte Spektrum der Läsionen, die während der Atherogenese des Menschen auftreten.^{388,403} Sie beginnt mit der Adhäsion von Monozyten an Gefäßen, der Bildung von schaumzellreichen *fatty streaks* und endet mit Fibroatheromen, bei denen ein nekrotischer Kern von einer *fibrous cap* bedeckt ist, die große Mengen glatter Muskelzellen enthält.^{388,398} Im Gegensatz zum Menschen kommt eine Plaqueruptur jedoch praktisch nicht vor.⁴⁰⁴

Ein weiterer Grund, der für die Wahl der Maus als Tiermodell für die Atheroskleroseforschung spricht, ist ihre geringe Größe. Aufgrund derer werden nur kleine Mengen von Medikamenten und Narkosemitteln sowie von Testsubstanzen benötigt. Dies bedeutet eine zusätzliche Kostenersparnis bei der Durchführung von Versuchen mit Mäusen gegenüber größeren Tierarten.

Die geringe Körpergröße der Maus kann sich für manche Versuchsvorhaben jedoch auch als nachteilig erweisen, da bestimmte Eingriffe hierdurch erschwert oder sogar unmöglich gemacht werden.

Auch bezüglich der Narkose ist bei der Maus, ebenso wie bei anderen Kleinsäugetieren, besondere Vorsicht geboten. Es besteht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer kardiovaskulären Depression mit konsekutivem Kreislaufversagen. Aus diesem Grund wurde die Narkose mit Isofluran

durchgeführt. Dieses flutet schnell an- und ab und macht die Narkose somit sehr gut steuerbar. Außerdem bewirkt es nur eine geringgradige kardiovaskuläre Depression.^{405,406}

Darüber hinaus muss bei der Narkose darauf geachtet werden, dass die Körpertemperatur der Mäuse in einem relativ konstanten Bereich gehalten wird. Mäuse, bzw. Kleintiere im Allgemeinen, haben im Verhältnis zu ihrer Körpergröße eine relativ große Körperoberfläche. Dies bedingt einen hohen Wärmeverlust, sodass sie sehr schnell auskühlen. Dies kann zu einer zusätzlichen kardiovaskulären Depression mit Bradykardien führen.

Weiterhin ist zu beachten, dass die Maus im Herz-Kreislaufsystem viele physiologische Unterschiede gegenüber dem Menschen aufweist. So liegt die durchschnittliche Herzfrequenz beim Menschen bei 73 Schlägen pro Minute, bei der Maus hingegen zwischen 450 und 550 Schlägen pro Minute. Weiterhin bestehen deutliche Unterschiede in der Atemfrequenz (12 Atemzüge pro Minute beim Menschen gegenüber 106-163 Atemzügen pro Minute bei der Maus) und beim durchschnittlichen arteriellen Blutdruck. Dieser liegt beim Menschen bei 120/80mmHg und bei der Maus bei 112-124/48-62mmHg.⁴⁰⁵

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden zwei Mausstämme verwendet. Zum einen der Wildtypmausstamm C57BL/6J für den *in vivo*-Versuch und zum anderen der ApoE-*knockout*-Stamm B6.129P2-Apoe^{tm1Unc}/J für die immunhistochemische Untersuchung der atherosklerotischen Plaque.

1.2.2 Peritonitis-Modell

Die Migration von Leukozyten an die Stelle des inflammatorischen Stimulus spielt eine zentrale Rolle beim Entzündungsgeschehen. Es handelt sich um einen sehr komplexen Prozess, der die Zellaktivierung, Adhäsion, Chemotaxis und Transmigration umfasst.⁴⁰⁷

Ein großer Teil unseres Wissens über die unterschiedlichen Mediatoren und Zelltypen, die an akuten Entzündungen beteiligt sind, konnte durch das Modell der sterilen Peritonitis gewonnen werden.⁴⁰⁸ Es stellt eine relativ einfach durchführbare und kostengünstige Methode dar.

In der Regel werden für dieses Modell Kleinnager verwendet. Bisweilen kommen auch größere Tierarten zum Einsatz.⁴⁰⁷

Die Peritonealhöhle stellt einen präformierten Hohlraum dar, in den inflammatorisch wirksame Substanzen injiziert werden können.⁴⁰⁷ Durch diese Injektion werden die typischen Kennzeichen einer Entzündung wie Schmerz, die Infiltration von Leukozyten und die Synthese von Entzündungsmediatoren ausgelöst.⁴⁰⁸ Je nach injizierter Substanz können unterschiedliche Entzündungsmediatoren, Enzyme oder Rezeptoren die Rekrutierung der Leukozyten beeinflussen.⁴⁰⁷

Ein häufig verwendeter Mediator zur Induktion einer Peritonitis ist Thioglykolat, das Salz der Mercaptoessigsäure. Auch Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien, und Zymosan, ein Polysaccharid aus Glucose aus der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*, werden häufig zur Peritonitis-Induktion verwendet.^{407,408}

V DISKUSSION

Die Bauchhöhle ist auch im Normalzustand von Entzündungszellen kolonisiert. Es finden sich dort Makrophagen, T- und B-Zellen, NK-Zellen, Mastzellen und dendritische Zellen.^{409,410}

Nach Induktion einer Peritonitis mit Thioglykolat kommt es zu einem raschen und starken Anstieg der Gesamtzellzahl in der Peritonealflüssigkeit. Nach 24 Stunden kann bereits eine bis zu zehnfach erhöhte Zellzahl gemessen werden, nach 3 Tagen sogar eine mehr als zwanzigfach erhöhte Zellzahl.⁴¹¹

Die Betrachtung der Zelltypen zeigt, dass es zunächst zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten kommt. Diese beginnt nach 4 Stunden und erreicht nach 24 Stunden ihren Höhepunkt. Erste Makrophagen können nach 24 Stunden in der Bauchhöhle gefunden werden. Nach 3-4 Tagen erreichen sie dort ihre Höchstwerte.⁴¹¹

Durch die Thioglykolat-Injektion kommt es außerdem zum Anstieg diverser Entzündungsmediatoren wie zum Beispiel MCP-1, TNF- α , IFN- γ sowie IL-6, -7, -10 und -11. Diese erreichen ihre Höchstwerte bereits nach 24 Stunden und sinken bis zum dritten Tag wieder ab.⁴¹¹

Bei derartigen Peritonitis-Induktionen kann es zu einigen Schwierigkeiten kommen, welche die Versuchsergebnisse verfälschen können.

Da die Injektion der Thioglykolatlösung in die Bauchhöhle blind erfolgt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dabei der Darm perforiert wird. Hierdurch kann es zur Auswanderung von Bakterien aus dem Darm in die Bauchhöhle kommen, was zur Entstehung einer septischen Peritonitis führt, mit der Folge, dass sich die zellulären Reaktionen deutlich von denen bei der sterilen Peritonitis unterscheiden.

Neben dem Risiko einer Darmperforation bei der intraperitonealen Injektion, besteht auch die Möglichkeit, ein Gefäß zu verletzen. Durch die dabei entstehende Blutung kann die Zusammensetzung der Entzündungszellen in der peritonealen Lavageflüssigkeit verändert sein. Das Risiko derartiger Verletzungen ist insbesondere am wachen Tier groß. Plötzliche Abwehrbewegungen der Tiere können zum Verrutschen der Kanüle führen und die oben genannten Verletzungen nach sich ziehen. Aus diesem Grund wird die Injektion häufig - wie auch in dieser Untersuchung - am narkotisierten Tier durchgeführt.

Ein anderes Modell zur kontrollierten und reproduzierbaren Schaffung von Entzündungsreaktionen stellt das *air pouch*-Modell dar. Bei diesem Modell wird durch mehrmalige Injektion von steriler Luft in die Unterhaut zwischen den Schulterblättern eine kleine Tasche (*pouch*) generiert. Durch die wiederholte Luftinjektion bildet sich eine Epithelschicht an den Begrenzungen der Gewebstasche. Nachdem sich diese gebildet hat, kann in diese Tasche ein chemotaktischer Faktor oder ein Entzündungsmediator injiziert werden und das Exsudat auf Entzündungsmediatoren oder migrierte Entzündungszellen untersucht werden.^{407,412} Diese Methode ist ebenso wie das Peritonitis-Modell relativ kostengünstig und technisch nicht sehr anspruchsvoll. Jedoch erfordert die Ausbildung des *pouches* eine mehrtägige Vorbereitungszeit. Somit ist diese Methode wesentlich zeitaufwändiger als das Peritonitis-Modell. Aus diesem Grund wurde zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von Leukozyten in dieser Arbeit das Peritonitismodell bevorzugt.

Ein drittes Modell zur Untersuchung entzündlicher Reaktionen stellt das Ischämie-Reperfusionsmodell dar. Durch das Ligieren eines Blutgefäßes wird dort eine Ischämie provoziert, wodurch das Endothel, das sich normalerweise in einem antikoagulatorischen und antiinflammatorischen Zustand befindet, in einen prothrombotischen Zustand versetzt wird.⁴¹³ Es wird aktiviert und entwickelt adhäsionsvermittelnde Eigenschaften, was bedeutet, dass es vermehrt Adhäsionsrezeptoren wie P-Selektin und ICAM-1 exprimiert.^{413,414} Außerdem kommt es zur einer gesteigerten Freisetzung von Chemokinen, Wachstumsfaktoren und einer erhöhten Permeabilität.⁴¹³ Dieser Zustand ähnelt dem Zustand bei der Initiation der Atherosklerose und kann zur Untersuchung der dabei ablaufenden entzündlichen Vorgänge eingesetzt werden. Auch dieses Modell ist wie das *air pouch*-Modell im Vergleich zum Peritonitismodell deutlich zeitaufwändiger und komplexer in der Durchführung. Die zu erlernende Operationstechnik ist wesentlich schwieriger als die Injektionstechnik für das Peritonitismodell. Außerdem ist für die Versuchsdurchführung eine längerdauernde Narkose erforderlich, da das Gefäß für die Ischämiephase etwa eine Stunde lang ligiert bleiben muss. Aufgrund dessen besteht bei dieser Methode ein erhöhtes Narkoserisiko. Darüber hinaus ist die Auswertung des Ischämie-Reperfusionsmodells sehr zeitintensiv, da hier einzelne Zellen ausgezählt werden müssen.

Mit dem vorliegenden Versuchsansatz sollte zunächst die grundsätzliche Frage geklärt werden, ob es durch CyPB zu einer gesteigerten Migration von Entzündungszellen kommt. Da die hierfür relevanten Informationen auch durch das Peritonitismodell gewonnen werden konnten, wurde die Wirkungsweise von CyPB für diese Arbeit lediglich in diesem Modell untersucht.

2 Diskussion der Ergebnisse

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung, die durch eine chronische Entzündung der Gefäßwand gekennzeichnet ist.⁴¹⁵ Beim Menschen spielt die Atherosklerose eine bedeutende Rolle. Weltweit starben im Jahr 2012 rund 17,5 Millionen Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen.² Der Großteil davon ist auf atherosklerotische Veränderungen zurückzuführen.⁴ Somit stellt die Atherosklerose nach Krebserkrankungen eine der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt dar.²

Innerhalb des Tierreiches hingegen spielen atherosklerotische Veränderungen nur eine untergeordnete Rolle. Lediglich bei Vögeln kommt sie mit einer gewissen Häufigkeit vor. Bei Hunden, die in Folge einer Schilddrüsenunterfunktion eine Hypercholesterinämie entwickeln, können gelegentlich atherosklerotische Veränderungen gefunden werden, und auch bei alternden Schweinen (sowohl Haus- als auch Wildschwein) können diese vorkommen.⁸ Aufgrund der häufig sehr begrenzten Nutzungsdauer dieser Tiere, können bei ihnen jedoch nur Atherosklerose-Frühstadien gefunden werden.⁷

Während Atherogenese werden verschiedene Stadien durchlaufen. Im Verlauf der Plaquebildung kommt es in der Gefäßwand zu vielfältigen Interaktionen zwischen Entzündungszellen und anderen aktivierten Zellen wie Makrophagen/Schaumzellen, Lymphozyten und glatten Muskelzellen.³¹⁴

Der Einfluss des Immunophilins CyPA als Mediator für kardiovaskuläre Erkrankungen stand in den letzten Jahren im Zentrum des Interesses vieler Forschungsprojekte.^{30,32,314} Einerseits stellt es einen wichtigen Mediator für kardiovaskuläre Entzündungsprozesse dar.³² Andererseits nimmt es auch auf die im Rahmen der Atherosklerose ablaufenden Entzündungsprozesse (siehe Abb. 58) auf verschiedenen Ebenen Einfluss.⁵¹

CyPA stellt einen Verbindungsfaktor zwischen verschiedenen Risikofaktoren (wie Hyperlipidämie, Bluthochdruck oder Diabetes) und der Entstehung atherosklerotischer Veränderungen dar (siehe Abb. 58A).^{51,416-418}

Außerdem wird es durch verschiedene entzündliche Stimuli von Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen, Schaumzellen, glatten Muskelzellen und Thrombozyten freigesetzt (siehe Abb. 58A und 58B).^{312,314,318,319,325,333,334} Diese Zelltypen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose.

CyPA nimmt desweiteren Einfluss auf die Initiation der Atherosklerose. Es ist in der Lage, Endothelzellen zu schädigen und ihre Apoptose auszulösen (siehe Abb. 58A).³¹⁵ Dieser Prozess wird als ein entscheidender Faktor für die Initiation der Atherosklerose vermutet.³¹⁵

Eine weitere atherogene Eigenschaft von CyPA stellt seine Fähigkeit zur entzündlichen Aktivierung von Endothelzellen dar, was sich in einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 äußert (siehe Abb. 58A).³¹⁵

Auch Thrombozyten werden durch CyPA beeinflusst. Die Bindung von CyPA an CD147 (EMMPRIN) auf der Plättchenoberfläche bewirkt deren Aktivierung.^{316,336} Dies führt zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Plättchenoberfläche⁴¹⁹ und schließlich zur Adhäsion von Thrombozyten

am Endothel.³³⁶ Diese können als Brückenzellen zwischen Endothelzellen und Leukozyten fungieren und so deren Rekrutierung begünstigen (siehe Abb. 58C).¹²⁴

CyPA besitzt außerdem eine potente chemotaktische Wirkung auf Entzündungszellen wie beispielsweise Monozyten und T-Lymphozyten (siehe Abb. 58B).^{51,296,420} Außerdem bewirkt es bei Endothelzellen über die Induktion von Adhäsionsrezeptoren und einer gesteigerten IL-6-Expression, die Rekrutierung von Entzündungszellen in atherosklerotische Läsionen (siehe Abb. 58B).^{115,315,322,324}

Darüber hinaus ist CyPA in der Lage, die Expression von *Scavenger*-Rezeptoren zu regulieren (siehe Abb. 58B). Auf diese Weise beeinflusst es die Aufnahme von LDL in die Gefäßwand³¹⁵ und die Entstehung von *fatty streaks*.¹¹⁵

Neben Endothelzellen ist CyPA auch in der Lage, Entzündungszellen zu aktivieren.⁵¹ So löst es die Sekretion von M-CSF und MMPs bei Makrophagen aus (siehe Abb. 58B und 58C).³¹⁴ M-CSF begünstigt die Umwandlung von Makrophagen zu Schaumzellen.³¹⁵ MMPs begünstigen die Plaquebildung, indem sie die Einwanderung von Entzündungszellen und glatten Muskelzellen in die Gefäßwand vereinfachen (siehe Abb. 58C).^{176,177,178,351} Auch Schaumzellen werden durch die Bindung von CyPA an CD147 (EMMPRIN) zur MMP-Sekretion angeregt (siehe Abb. 58C).^{314,334} Außerdem vermitteln sie durch ihre proteolytische Aktivität die Plaquestabilisierung.²⁴

CyPA nimmt darüber hinaus Einfluss auf die Plaqueruptur sowie auf thrombotische Geschehnisse, die zur Komplikation atherosklerotischer Prozesse führen.^{312,314,421,422}

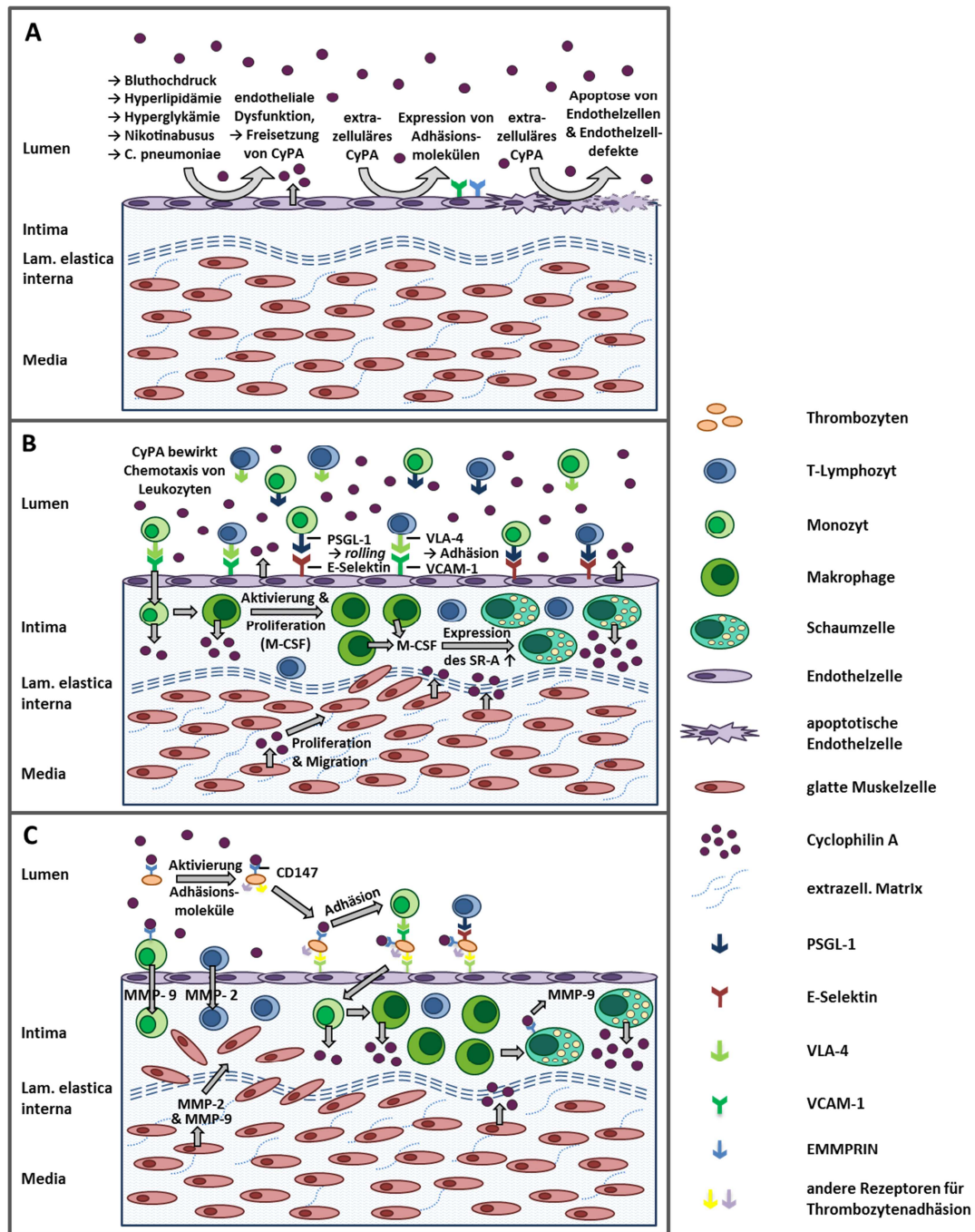


Abbildung 58: Wirkung von CyPA in der Atherosklerose (Zusammenfassung der zugehörigen Literatur)

A) Atherosklerose-Risikofaktoren führen zur Freisetzung von CyPA durch Endothelzellen sowie zur Expression von Adhäsionsmolekülen und der Apoptose von Endothelzellen. **B)** Freies CyPA wirkt chemotaktisch auf Entzündungszellen und bewirkt über eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen die Leukozytenrekrutierung in die Intima. Über die Auslösung der M-CSF-Sekretion bei Makrophagen fördert es die Umwandlung von Monozyten zu Schaumzellen. Im Rahmen dieser Differenzierung kommt es zu einer gesteigerten CyPA-Sekretion durch die 3 Zelltypen. CyPA wird auch von glatten Muskelzellen freigesetzt und bewirkt deren Proliferation und Migration in die Intima. **C)** CyPA bewirkt die Sekretion von MMPs bei Monozyten, glatten Muskelzellen und Schaumzellen. Auf diese Weise fördert es die Rekrutierung der Zellen in die Intima und die Destabilisierung der Plaque. Bei Thrombozyten bewirkt CyPA eine Aktivierung, was mit einer gesteigerten Adhäsion am dysfunktionellen Endothel einhergeht. Durch ihre Wirkung als Brückenzellen verstärken Thrombozyten so zusätzlich die Rekrutierung von Entzündungszellen.

Über die Rolle von CyPB für die Entstehung der Atherosklerose konnten in der Literatur keine Angaben gefunden werden. Seine enge strukturelle Verwandtschaft zu CyPA, das extrazelluläre Vorkommen beider Vertreter, sowie seine *in vitro* nachgewiesene chemotaktischen Wirkung gegenüber neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten lassen jedoch die Spekulation zu, dass es ebenso wie CyPA an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sein könnte.^{33,250,259,296,302,336,352} Seine bereits aufgezeigte Beteiligung bei anderen entzündlichen Erkrankungen wie Sepsis, Asthma oder rheumatoider Arthritis bestärkt diese Vermutung zusätzlich.^{293,297,298}

In der vorliegenden Arbeit konnte das Vorkommen von CyPB in der atherosklerotischen Plaque erstmals nachgewiesen werden (siehe Abb. 33). Die Tatsache, dass es auch im Zytoplasma und im Zellkern von Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen sowie auf der Oberfläche thrombin-stimulierter Thrombozyten nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 34-40), legt die Vermutung nahe, dass CyPB auch in der Pathogenese der Atherosklerose eine Rolle spielen könnte.

In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluss auf die oben genannten Zelltypen genauer untersucht. Es sollten dabei mögliche Pathomechanismen von CyPB im Rahmen der Atherogenese aufgedeckt werden.

Die Daten der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass CyPB keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Leukozyten, insbesondere demjenigen von Monozyten nimmt (siehe Abb. 44, 45, 55 und 56). Jedoch konnte im Blutbild nach intraperitonealer Applikation des Proteins eine leichte Reduktion der Gesamtleukozytenzahl beobachtet werden (siehe Abb. 57). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die proteolytische Aktivität von Monozyten durch CyPB gesteigert wird (siehe Abb. 41-43).

Darüber hinaus konnte bestätigt werden, dass aktivierte Thrombozyten ein gesteigertes Adhäsionsverhalten gegenüber immobilisiertem CyPA und CyPB aufweisen (siehe Abb. 46-48).

Außerdem wurde der Einfluss der nicht immunsuppressiven Cyclosporin A-Derivate NIM811 und MM284 auf das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten untersucht (siehe Abb. 49-54). Während das zellpermeable Derivat NIM811 sowohl die Wirkung intra- als auch extrazellulärer Cyclophiline inhibieren kann, ist die Wirkung von MM284 aufgrund seiner Zellimpermeabilität auf die Inhibierung extrazellulärer Cyclophiline beschränkt. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die stimulierende Wirkung von CyPB auf das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten im Flusskammerversuch durch beide Cyclosporin A-Derivate in gleichem Maße inhibiert wird.

2.1 Pathophysiologische Relevanz der Cyclophilin B- Expression in der atherosklerotischen Plaque, auf Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen sowie auf aktivierten Thrombozyten.

In der vorliegenden Arbeit konnte das Vorkommen von CyPB in der atherosklerotischen Plaque ApoE-defizienter Mäuse (Stamm: B6.129P2-Apoe^{tm1Unc}/J) mit Hilfe der Immunhistochemie erstmalig nachgewiesen werden. CyPB reichert sich innerhalb der Plaque vermehrt im Bereich der fibrösen Schutzkappe an. Somit ist die Lokalisation in der Plaque ähnlich der von CyPA.³⁸²

Dieser Nachweis bestärkte unsere Hypothese, dass CyPB ebenso wie CyPA an den entzündlichen Prozessen, die im Rahmen der Atherosklerose ablaufen, beteiligt sein könnte.

In der Literatur konnten lediglich allgemeine Aussagen zum Vorkommen von CyPB gefunden werden. Es findet sich intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum und im Zellkern.^{254,255,259} Zudem kann es extrazellulär vorkommen und wird von Chondrozyten spontan sezerniert.^{247,293}

Monozyten und die daraus entstehenden Makrophagen und Schaumzellen spielen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose.¹¹³ In der Literatur konnten allerdings keine konkreten Angaben über die Expression von CyPB in ruhenden bzw. aktivierten Monozyten, Makrophagen oder Schaumzellen gefunden werden. Deshalb wurde in weiteren Versuchen das Vorkommen von CyPB in diesen Zelltypen untersucht.

Mittels Immunfluoreszenzfärbung gelang es uns folgendes (siehe Abb. 34-39) aufzuzeigen: Die Expression von CyPB auf der Oberfläche sowie im Zytoplasma von ruhenden Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen ist gegeben. Die Oberflächenexpression konnte durch Stimulation mit LPS bei allen drei Zelltypen noch zusätzlich verstärkt werden. Die Stimulation von Makrophagen und Schaumzellen mit LPS führte darüber hinaus zu einer vermehrten Expression von CyPB im Zellkern. Dieser Effekt konnte bei Monozyten jedoch nicht beobachtet werden. Schaumzellen zeigten nach LPS-Stimulation außerdem eine leicht gesteigerte CyPB-Expression im Zytoplasma.

Monozyten/Makrophagen können durch verschiedene Stimuli aktiviert werden: Ein wichtiger Stimulus ist beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS), der Hauptbestandteil der Zellmembran gram-negativer Bakterien, der beim Zerfall derselben freigesetzt wird. Durch die Bindung von LPS werden eine Reihe von Signalkaskaden aktiviert, die letztlich zur Stimulation von Transkriptionsfaktoren wie NF-κB führen.^{423,424} Auf derartige Prozesse könnte das gesteigerte Vorkommen von CyPB im Zellkern (siehe Abb. 37 C1-C3 und 39 C1-C3), im Zytoplasma (siehe Abb. 37 C1-C3 und 39 C1-C3) sowie auch seine gesteigerte Oberflächenexpression nach Stimulation mit LPS (siehe Abb. 34 C1-C3, 36 C1-C3 und 38 C1-C3) zurückzuführen sein.

Die Stimulation von Monozyten mit LPS führte im Gegensatz zu derjenigen von Makrophagen und Schaumzellen zu keiner gesteigerten CyPB-Expression im Zellkern (siehe Abb. 35 C1-C3). Bei Monozyten handelt es sich um noch nicht ausdifferenzierte Zellen. Sie reifen erst nach Verlassen der Blutbahn im Gewebe zu reifen Effektorzellen aus.⁴²⁵ Hierin könnten die unterschiedlichen Reaktionen von Monozyten und Makrophagen/Schaumzellen auf die Stimulation mit LPS begründet sein.

V DISKUSSION

Neben Monozyten/Makrophagen spielen auch Thrombozyten eine wichtige Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen.⁹ Sie fungieren als wichtige Entzündungszellen, welche die Rekrutierung von Leukozyten vermitteln und durch die Sekretion von Chemokinen andere Zellen anlocken.^{9,13,14,124,129}

Auch über das Vorkommen von CyPB bei Thrombozyten konnten in der Literatur keine Daten gefunden werden.

In der vorliegenden Arbeit gelang es uns mit Hilfe der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie nachzuweisen, dass CyPB auf der Oberfläche von ruhenden Thrombozyten nicht exprimiert wird. Auch die Stimulation mit ADP, TRAP oder CRP - Substanzen, die gängige Stimulantien für Thrombozyten darstellen - nahm keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von CyPB. Jedoch konnte nach Stimulation mit Thrombin eine signifikant gesteigerte Expression von CyPB auf der Thrombozytenoberfläche gemessen werden (siehe Abb. 40).

Die unterschiedliche Reaktion der Thrombozyten gegenüber Thrombin und den anderen verwendeten Stimulantien könnte dadurch erklärt werden, dass verschiedenen Substanzen zum Teil unterschiedliche Signalwege bei den Thrombozyten aktivieren.

So aktiviert ADP Thrombozyten über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (englisch: *G protein-coupled receptor*, GPCR). Dabei handelt es sich um eine Familie von 7 Transmembranrezeptoren, die die Signale über heterotrimere G-Proteine in die Blutplättchen übertragen.⁴²⁶ Die Aktivierung der Thrombozyten durch ADP erfolgt dabei im Speziellen über die Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂.⁴²⁶⁻⁴²⁸

Bei *Collagen-related peptide* (CRP) handelt es sich um ein synthetisches Peptid, das ebenso wie Kollagen eine tripelhelicale Struktur besitzt.⁴²⁹⁻⁴³² Erst nach Quervernetzung in der Quartärstruktur kommt ein Molekül zustande, das eine potente und selektive agonistische Wirkung zu GPVI besitzt.^{133,432-435} Die Aktivierung der Thrombozyten durch CRP erfolgt über einen Tyrosinkinase-vermittelten Signalweg, der die Kinasen Syk und Phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) beinhaltet.⁴³⁷⁻⁴⁴¹ Die experimentelle Verwendung von CRP birgt häufig Schwierigkeiten, da es durch die Ausbildung der Quartärstruktur immer zu einer unterschiedlichen Aktivität des Proteins kommt.⁴⁴²

Die Thrombin-induzierte Aktivierung von Thrombozyten ist über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR), einer Untergruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermittelt. Beim Menschen wird die Aktivierung der Thrombozyten über PAR1 und PAR4 vermittelt, bei Mäusen über PAR3 und PAR4.^{426,443,444}

Bei *Thrombin receptor-activating peptide* (TRAP) handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes Hexapeptid, das mit den Aminosäuren 42 bis 47 des Thrombinrezeptors interagiert und die Effekte von Thrombin wie beispielsweise die Thrombozytenaggregation, eine gesteigerte Phosphorylierung von Tyrosin, die reduzierte Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), sowie eine erhöhte zytosolische Calcium-Konzentration, nachahmt.⁴⁴⁵⁻⁴⁴⁸ Dabei unterscheidet sich jedoch die durch Thrombin und TRAP induzierte Art der Rezeptoraktivierung: Während der PAR nach der Bindung von Thrombin aktiviert wird, indem das aminoterminal Ende des Rezeptors abgespalten wird, verläuft die Rezeptoraktivierung durch TRAP unabhängig von dieser Abspaltung.⁴⁴⁹ Da Thrombin und TRAP über denselben Signalweg wirken, wäre es naheliegend, dass beide Substanzen dieselbe Reaktion bei Thrombozyten hervorrufen. Die durch TRAP ausgelöste CyPB-Expression fällt

jedoch in dem hier durchgeführten Versuch um etwa 45% schwächer aus als die Thrombin-vermittelte. Eine Erklärung hierfür könnte beispielsweise in der unterschiedlichen Affinität der beiden Substanzen zu ihrem Rezeptor gesehen werden. Auch die unterschiedliche Art der Rezeptoraktivierung könnte zu einer unterschiedlich starken Aktivierung der durch die Rezeptorbindung ausgelösten nachgeschalteten Signalwege führen. Eine weitere Möglichkeit für die schwächere Wirkung von TRAP könnte in einer nicht optimal gewählten Konzentration der Substanz für die Stimulation des Thrombinrezeptors liegen. Dies ließe sich durch eine Wiederholung des Versuchs mit unterschiedlichen Konzentrationen von TRAP ausschließen.

2.2 Bedeutung von Cyclophilin B für die proteolytische Aktivität in der atherosklerotischen Plaque

Nachdem in den vorherigen Versuchen das Vorkommen von CyPB in der atherosklerotischen Plaque sowie in monozytären Zellen und Thrombozyten nachgewiesen werden konnte, sollte im nächsten Schritt festgestellt werden, ob CyPB Einfluss auf weitere Stufen der Atheroskleroseentstehung haben könnte. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss von CyPB auf die Sekretion der MMPs 2 und 9 untersucht.

Matrix Metalloproteinasen spielen eine bedeutende Rolle für die Progression der Atherosklerose. Sie vermitteln unter anderem das *remodeling* der Gefäßwand, indem sie die Einwanderung glatter Muskelzellen in die Plaque ermöglichen.¹⁷⁸ Außerdem erleichtern sie die Einwanderung von Entzündungszellen in die Plaque. Dabei wird die Einwanderung von Monozyten in die Intima über MMP-9 und MT1-MMP vermittelt.^{177,351} Des Weiteren spielen MMPs eine wichtige Rolle für den Abbau des Kollagens in der fibrösen Schutzkappe und somit für die Plaquestabilisierung.²⁴

Auch bei der Entstehung von Komplikationen im Rahmen der Atherosklerose spielen Matrix Metalloproteinasen eine wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang sind vor allem MMP-2 und MMP-9 zu erwähnen.^{23,182,450,451} Sie werden mit der Entstehung vulnerabler, rupturgefährdeter Plaques in Verbindung gebracht.^{23,186,187,452} MMP-2 wird vorrangig von glatten Muskelzellen und Endothelzellen gebildet.⁴⁵³ MMP-9 findet sich vor allem in der Schulterregion der Plaque und in Bereichen der *fibrous cap* und korreliert somit positiv mit den hier nachzuweisenden Makrophagen- und T-Zell-Infiltraten.⁴⁵⁴

Makrophagen sind die vorherrschenden Entzündungszellen in atherosklerotischen Plaques.⁴⁵⁵ Durch Einlagerung von Lipiden entstehen aus ihnen Schaumzellen.⁴⁵⁶ Beide Zelltypen sezernieren ein breites Spektrum von MMPs. Das MMP-Spektrum aktivierter Makrophagen umfasst MMP-1, -2, -3, -8, -9 und -14.¹⁸³ Die Hauptproduzenten der MMPs-1, -2, -3, -7 und -9 stellen jedoch Schaumzellen dar.^{25,181,182} Auch in Monozyten konnte ein breites Spektrum von MMPs nachgewiesen werden.⁴⁵⁷ Dieses umfasst die MMPs -1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -14, -17, -19 und MMP-25.^{453,457}

Im vorliegenden Versuch konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Monozyten mit CyPB zu einer gesteigerten Sekretion der MMP-9 führt (siehe Abb. 41 und 43). Die Sekretion von MMP-2 wurde durch die Wirkung von CyPB nicht beeinflusst (siehe Abb. 41 und 42).

Da als Reaktion auf entzündliche Stimuli große Mengen CyPB in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden können,²⁹⁶ kann man davon ausgehen, dass auch im Rahmen der entzündlichen Prozesse der Atherosklerose zu erhöhten Blutkonzentrationen von CyPB kommt. Dieses könnte über eine verstärkte Freisetzung von MMP-9 aus Monozyten folglich die bereits beschriebene, durch MMP-9 begünstigte Einwanderung von Monozyten aus dem Blutgefäßsystem in die Intima^{177,351} verstärken und so Einfluss auf die Plaqueprogression nehmen.

Da MMP-9 außerdem am Kollagenabbau beteiligt ist und daher eine wichtige Rolle im Rahmen der Entstehung vulnerabler Plaques spielt,²⁴ besteht die Möglichkeit, dass das in der atherosklerotischen Plaque verstärkt exprimierte CyPB über die Freisetzung von MMP-9 aus Monozyten außerdem Einfluss auf die Plaquedestabilisierung und folglich auf die Entstehung von Komplikationen wie dem akuten Myokardinfarkt nehmen könnte.

Im Fall von CyPA wird die Freisetzung von MMP-9 aus Monozyten durch seine Bindung an CD147 (EMMPRIN) vermittelt.^{314,382} CyPA ist einer der wichtigsten Liganden von CD147 (EMMPRIN).⁴⁶⁵ Neben CyPA ist auch CyPB ein wichtiger Bindungspartner von CD147 (EMMPRIN).³⁰² Dies legt die Vermutung nahe, dass CD147 (EMMPRIN) auch für die CyPB-vermittelte MMP-Sekretion als signalgebender Rezeptor fungiert. Dieser Zusammenhang müsste in weiteren Versuchen, bei denen die Monozytenkulturen vor der Stimulation mit CyPB mit blockierenden Antikörpern gegen CD147 (EMMPRIN) behandelt werden, belegt werden.

Die möglichen Mechanismen über die CyPB Einfluss auf die Plaqueprogression sowie auf die Entstehung vulnerabler Plaques nehmen könnte, sind in Abbildung 59 dargestellt.

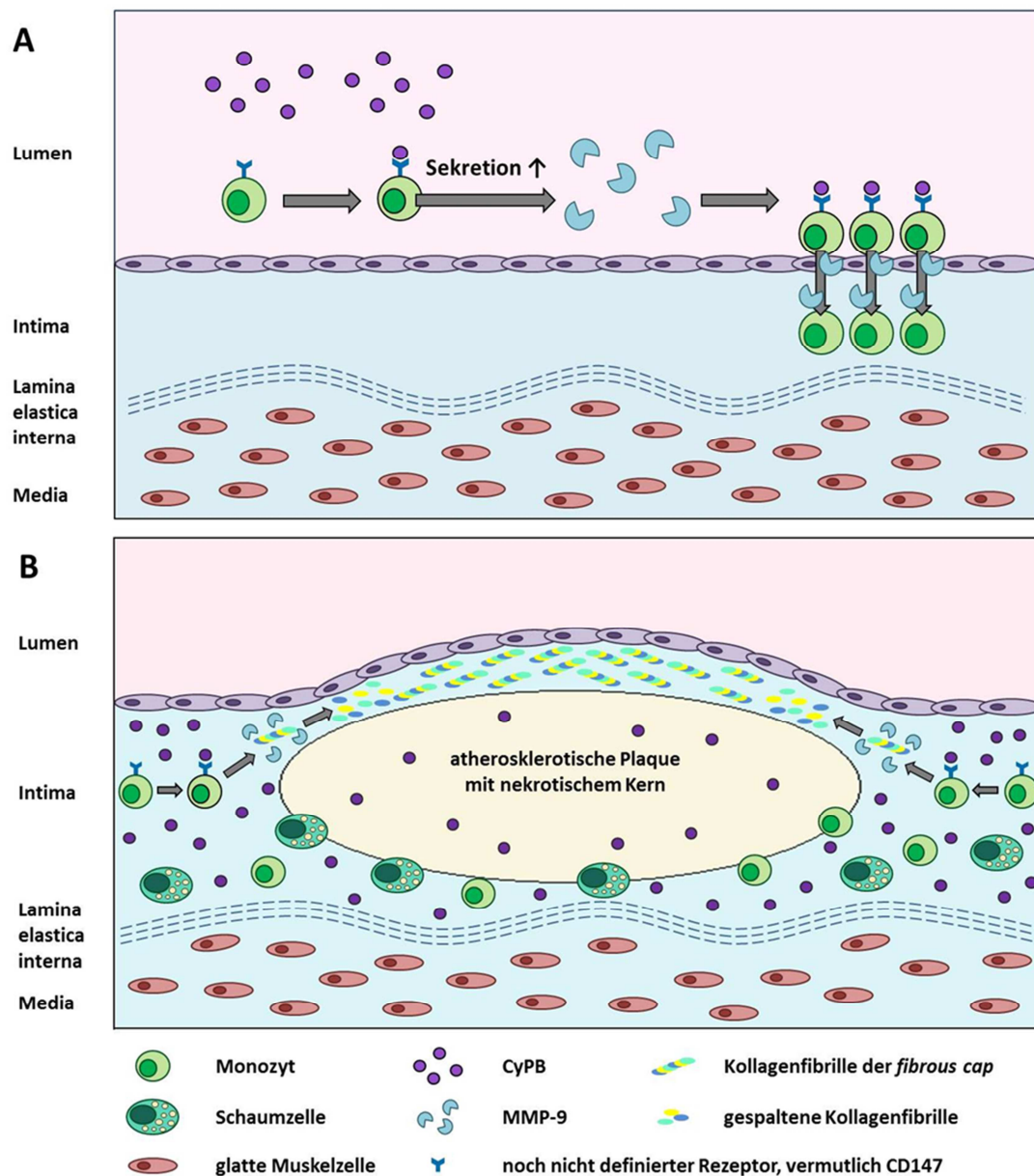


Abbildung 59: Darstellung der hypothetischen Förderung der Plaqueprogression (A) sowie der Plaquedestabilisierung (B) über die CyPB-vermittelte Freisetzung von MMP-9 aus Monozyten

Bar-Or et al. zeigten in einem ähnlichen Versuchsansatz, dass es nach Stimulation von Monozyten zu einer *down-regulation* von MMP-9 und anderen MMPs kommt.⁴⁵⁷ Jedoch erfolgte die Stimulation in den dort beschriebenen Versuchen zunächst für 2 Stunden mit 10U/ml IFN- γ und anschließend mit 100ng/ml LPS für 6 Stunden.

Bei dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuch wurde eine deutlich höhere LPS-Konzentration von 2 μ g/ml gewählt. Außerdem wurde eine Inkubationszeit von 18 Stunden gewählt. Hierin könnte ein Grund für die andersartige Reaktion der Zellen in den beiden Versuchen gesehen werden.

Auch durch die Kultivierung von Monozyten kann es zu einer Veränderung des sezernierten MMP-Spektrums kommen. So exprimieren frisch isolierte humane Monozyten hohe Mengen von MMP-8, -11, -17, -23 und -25. Durch eine Kultivierung kommt es nach einiger Zeit zu einer *down*-Regulation aller MMPs außer von MMP-11 und gleichzeitig zu einer Aufregulierung der MMPs-1, -2, -3, -7, -9, -10, -12, -14 und -19.⁴⁵³

Neben der Veränderung des MMP-Spektrums durch die Kultivierung der Monozyten, könnte auch eine „Verunreinigung“ der Monozyten-Monokultur mit Fremdzellen, wie beispielsweise T-Zellen, einen Einfluss auf das Spektrum der Matrix Metalloproteinasen nehmen. Die Bindung von CD40L auf der Oberfläche von T-Zellen an CD40 auf der Monozytenoberfläche könnte hierbei zu einer gesteigerten MMP-9-Expression durch Monozyten führen.⁴⁵⁸

Darüber hinaus wird die MMP-Expression auch durch das Vorhandensein von Zytokinen beeinflusst. So steigert beispielsweise das Vorhandensein von TNF- α oder IL-1 β die Expression von MMP-9 und MMP-12.⁴⁵⁹⁻⁴⁶¹

2.3 Einfluss von Cyclophilin B auf das Migrationsverhalten von Monozyten *in vitro*

Die Auswanderung von Monozyten aus dem Blutgefäßsystem in die Intima stellt eine Schlüsselrolle für die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen dar.^{52,53,57} Die Auswanderung verläuft dabei in einem mehrstufigen Prozess, der das *rolling* und die feste Adhäsion der Entzündungszellen am aktivierten Endothel und schließlich die Diapedese in die Intima entgegen eines MCP-1-Gradienten umfasst.^{22,55,56,57,65} Die ausgewanderten Monozyten differenzieren dann in der Intima zu Makrophagen und Schaumzellen.²²

CyPB besitzt *in vitro* eine starke chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten, die über CD147 (EMMPRIN) vermittelt wird.^{296,302} Auch die Migration von Makrophagen konnte durch CyPB ausgelöst werden.²⁹⁵ Dies gab Anlass zur Vermutung, dass CyPB auch eine chemotaktische Aktivität gegenüber Monozyten haben könnte.

Weitere Faktoren, die diese Vermutung bestärkten, lagen in den bisherigen Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit - zum einen die verstärkte Expression von CyPB in der atherosklerotischen Plaque (siehe Abb. 33), und zum anderen die verstärkte Oberflächenexpression von CyPB auf aktivierten Makrophagen und Schaumzellen (siehe Abb. 36 und 38), die in großen Mengen in der atherosklerotischen Plaque vorkommen. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass Makrophagen nach LPS-Stimulation CyPA sezernieren.^{325,326} Aufgrund dieser Tatsachen kann man vermuten, dass auch CyPB von diesen Zellen, sowie von Schaumzellen freigesetzt wird. Sie könnten somit als mögliche Quelle für das in der Plaque exprimierte CyPB angesehen werden.

Weitere mögliche Quellen für das in der Plaque exprimierte CyPB könnten außerdem glatte Muskelzellen der Gefäßwand darstellen. Diese setzen CyPB als Reaktion auf oxidativen Stress frei.²⁸⁸

Auch Gewebszellen wie Fibroblasten, die CyPB konstitutiv sezernieren, könnten eine Quelle für CyPB darstellen.³²

Mit der Untersuchung der chemotaktischen Wirkung von CyPB auf Monozyten sollte die Frage geklärt werden, ob CyPB einen Einfluss auf die Auswanderung von Monozyten in die Gefäßwand im Rahmen der Atherogenese nehmen kann, und ob die Migration der Monozyten durch das auf den Makrophagen und Schaumzellen in der Plaque exprimierte CyPB somit zusätzlich verstärkt wird.

Der durchgeführte Chemotaxis-Assay zeigte jedoch, dass CyPB bei der *in vitro* genutzten Standard-Konzentration von 200nM keine Migration von Monozyten bewirkt. Auch durch eine Steigerung der CyPB-Konzentration auf bis zu 800nM oder durch den Einsatz von nur 100nM CyPB konnte keine Migration der Monozyten ausgelöst werden (siehe Abb. 45).

Marcant et al. konnten *in vitro* eine deutliche Zunahme der Migration von Makrophagen entlang eines CyPB-Gradienten feststellen.^{295,304} Eine Ursache für die unterschiedliche Reaktion der beiden Zelltypen könnte in der Veränderung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche und der damit einhergehenden Veränderungen der Zellstoffwechselvorgänge im Rahmen der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen liegen. Eine weitere Ursache könnte in den Unterschieden bei der verwendeten Migrationskammer oder dem angewendeten Versuchsprotokoll gesehen werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Migrationsversuche über einen Zeitraum von 4 und von 18 Stunden durchgeführt. Laut Literatur kann der Konzentrationsgradient von Zytokinen in Kultur nicht sehr lange aufrechterhalten werden. Daher werden für die meisten Arten von Migrationsversuchen Zeiträume von 4 Stunden üblicherweise nicht überschritten.³⁷⁴ Nachdem in der vorliegenden Arbeit im 4-Stunden-Ansatz keine Steigerung der Monozytenmigration durch CyPB ausgelöst werden konnte, sollte mit dem 18-Stunden-Ansatz getestet werden, ob durch eine verlängerte Inkubationszeit eine höhere Ausbeute migrierter Zellen erreicht werden kann. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass auch eine verlängerte Inkubationszeit keinen Einfluss auf die Zahl migrierter Monozyten entlang des CyPB-Gradienten nimmt (siehe Abb. 44 A und B).

Um eine Diffusion der verwendeten Substanzen durch den Filter und somit einen Ausgleich des Konzentrationsgradienten im Verlauf der auf 18 Stunden verlängerten Inkubationszeit auszuschließen, müsste man die Konzentrationen von CyPB und MCP-1 in der oberen und unteren Kammer zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmen. Jedoch ist MCP-1 mit einer atomaren Masse von 13kDa ein kleineres Protein als CyPB mit 21kDa.^{247,462} Ein Konzentrationsausgleich wäre also eher bei MCP-1 zu erwarten als bei CyPB. MCP-1 konnte jedoch sowohl nach 4 sowie nach 18 Stunden eine (quantitativ vergleichbare) signifikant gesteigerte Migration von Monozyten bewirken. Daher ist davon auszugehen, dass dieser Effekt im vorliegenden Versuch keine Bedeutung hat.

2.4 Einfluss von Cyclophilin B auf das Migrationsverhalten von Leukozyten *in vivo*

Für die Auswanderung von Leukozyten aus dem Gefäßsystem in die Bauchhöhle sind dieselben Mechanismen verantwortlich wie für die Wanderung in den subendothelialen Raum. Im vorliegenden Versuch wurde zur Untersuchung der Leukozytenmigration *in vivo* ein Peritonitis-Induktionsmodell an Mäusen gewählt. Die Zellmigration wird hierbei durch die Injektion proinflammatorischer Stimuli getriggert.

Bisher noch nicht publizierte Daten unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass CyPA nach intraperitonealer Injektion die Migration von Leukozyten in die Bauchhöhle auslöst. Dies veranlasste uns dazu, die chemotaktische Wirkung von CyPB ebenfalls *in vivo* im Peritonitis-Modell zu prüfen, obwohl der *in vitro*-Versuch (siehe Abb. 45) keinen Hinweis auf eine chemotaktische Wirksamkeit von CyPB gegenüber Monozyten ergab.

CyPA und CyPB werden von vielen unterschiedlichen Zelltypen durch verschiedene Stimuli freigesetzt und kommen deshalb auch extrazellulär vor.^{259,287,325,463}

CyPA ist ein stark chemotaktisch wirksames Agens für Monozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten.^{326,420} Gegenüber T-Lymphozyten zeigt es eine nur mäßige chemotaktische Wirkung.²⁹⁶ Wie bereits beschrieben, wirkt auch CyPB *in vitro* als potentes chemotaktisches Agens gegenüber neutrophilen Granulozyten, T-Lymphozyten und Makrophagen.^{295,296,302}

Diese chemotaktischen Wirkungen von CyPA und von CyPB sind abhängig von ihrer Bindung an CD147 (EMMPRIN).^{296,302,308,328}

Im Gegensatz zu CyPA, konnte nach intraperitonealer Injektion von CyPB keine Zunahme der in die Peritonealhöhle migrierten Leukozyten festgestellt werden. Auch eine gesteigerte Migration einer bestimmten Leukozyten-Subpopulation konnte nicht festgestellt werden (siehe Abb. 55 und 56).

So kam es nach der intraperitonealen Injektion von CyPB bei den Ly-6G-positiven Zellen (neutrophile Granulozyten) nur zu einem äußerst geringen Anstieg der Zellzahl in der Bauchhöhlenlavage (siehe Abb. 56). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen des Chemotaxis-Assays von Yurchenko et al.³⁰² In seiner Untersuchung konnte eine signifikante Zunahme der Migration von neutrophilen Granulozyten entlang eines CyPB-Gradienten festgestellt werden. Gemäß Literatur ist 24 Stunden nach Injektion von Thioglykolat die höchste Konzentration von neutrophilen Granulozyten in der Bauchhöhle nachzuweisen.⁴¹¹ Demnach ist davon auszugehen, dass die von uns gewählte Versuchsdauer zur Beurteilung der Wirkung von CyPB auf neutrophile Granulozyten für dieses Vorhaben geeignet war. Möglicherweise weichen unsere Ergebnisse von denen von Yurchenko et al.³⁰² deshalb ab, weil letztere in *in vitro*-Versuchen mit humanen Zellen durchgeführt wurden und unsere in *in vivo*-Versuchen an der Maus erzielt wurden. Die neutrophilen Granulozyten der Maus könnten ein andersartiges Spektrum von Oberflächenrezeptoren exprimieren als diejenigen des Menschen und daher eine schwächere Reaktion gegenüber CyPB aufweisen. Eine andere Erklärung könnte darin liegen, dass die Zellmigration im komplexen natürlichen System noch von einer Reihe anderer Faktoren beeinflusst wird, und die Reaktion der Zellen gegenüber CyPB *in vivo* daher anders ausfällt als im *in vitro*-Modell.

Auch bei den F4/80-positiven Zellen (Makrophagen) konnten wir keine signifikante Steigerung der Zellmigration detektieren (siehe Abb. 56). Dagegen konnte mittels eines Chemotaxis-Assays von Marcant et al. jedoch eine Migration von Makrophagen entlang eines CyPB-Gradienten ausgelöst werden.^{295,304} Nach einem Literaturhinweis wird die größte Anzahl von Makrophagen nach Peritonitis-Induktion mit Thioglykolat erst nach 3-4 Tagen erreicht.⁴¹¹ Möglicherweise war die von uns gewählte Versuchsdauer zur Beurteilung der Wirkung von CyPB auf Makrophagen nicht ausreichend. Um dies zu klären, sollte der Peritonitis-Versuch mit einer Versuchsdauer von 3-4 Tagen wiederholt werden.

Bei den CD3-positiven Zellen (T-Lymphozyten) und den CD11b-positiven Zellen (die sowohl Monozyten, Makrophagen, Granulozyten sowie auch NK-Zellen beinhalten) konnte in der CyPB-Gruppe im Vergleich zur Negativkontrollgruppe ebenfalls keine signifikante Veränderung der Migration dieser Zellen festgestellt werden (siehe Abb. 56).

Die Ergebnisse unseres Migrationsversuchs legen die Vermutung nahe, dass zumindest *in vivo* CyPB im Gegensatz zu CyPA keinen Einfluss auf die Zellmigration nimmt. Diese Unterschiede könnten darin begründet sein, dass CyPA im Gegensatz zu CyPB in der Lage ist, Entzündungsmediatoren (wie beispielsweise TNF- α , IL-1 β , IL-8 und MCP-1) freizusetzen.³³³ Diese Prozesse werden über die Aktivierung der Proteinkinasen ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*), p38-MAPK (p38-*mitogen-activated protein kinase*), JNK (c-Jun N-terminale Kinasen) und den NF- κ B-Signalweg vermittelt.^{313,333,334,464}

Marcant stellte sogar die Vermutung auf, dass CyPB einen antiinflammatorischen Effekt auf Makrophagen ausüben könnte.³⁰⁴ Dies ließe sich dadurch begründen, dass eine Vorinkubation von Makrophagen mit CyPB die Sekretion von Entzündungsmediatoren nach LPS-Applikation hemmt.^{295,304}

Auch einige Ergebnisse dieser Arbeit haben die Hypothese von Marcant bestärkt. Zum einen lieferte die Untersuchung des Blutbilds bei der Opferung der Mäuse, 24 Stunden nach Induktion der Peritonitis, einen Hinweis auf einen möglichen antiinflammatorischen Effekt von CyPB. Bei der Gruppe der Mäuse, die eine intraperitoneale CyPB-Injektion erhielten, konnte im Vergleich zur Negativkontrollgruppe (NaCl-Injektion) eine signifikant reduzierte durchschnittliche Leukozytenzahl im Blut nachgewiesen werden (siehe Abb. 57). Ebenso lag die in der Bauchhöhlenlavage ermittelte Gesamtzellzahl bei der Gruppe der Mäuse, die eine intraperitoneale CyPB-Injektion erhalten haben, zumindest tendenziell niedriger als bei der Gruppe, bei der eine NaCl-Injektion vorgenommen wurde (allerdings nicht signifikant) (siehe Abb. 55).

2.5 Aktivierte Thrombozyten weisen eine gesteigerte Adhärenz auf immobilisiertem CyPA und CyPB auf

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass aktivierte Thrombozyten ein gesteigertes Adhäsionsverhalten sowohl auf immobilisiertem CyPA als auch auf immobilisiertem CyPB aufweisen (siehe Abb. 46 und 47 sowie 60). Dabei wurde das *rolling* auf immobilisiertem CyPB im Gegensatz zur Negativkontrolle (BSA) um etwa 470% gesteigert. Bei immobilisiertem CyPA betrug die Steigerung etwa 410%. Die feste Adhäsion der aktivierten Thrombozyten auf immobilisiertem CyPB wurde um etwa 200% gesteigert, auf immobilisiertem CyPA konnte eine Steigerung von 190% ermittelt werden. Somit zeigt CyPB eine geringgradig (jedoch nicht signifikant) stärkere adhäsionsvermittelnde Wirkung als CyPA.

Die Thrombozyten zeigten die stärkste Reaktion (sowohl bezüglich des *rollings* als auch der festen Adhäsion) gegenüber immobilisiertem CD147 (EMMPRIN), das in den vorliegenden Versuchen mit einem Wert von 100% als Positivkontrolle diente.

Die adhäsive Wirkung der Thrombozyten gegenüber CyPA bzw. CyPB fiel nur geringgradig schwächer aus als bei CD147 (EMMPRIN). Dabei konnten bei CyPB etwa 8% weniger rollende Zellen als bei CD147 (EMMPRIN) ermittelt werden, und bei CyPA etwa 18% weniger. Bei der festen Adhäsion waren es bei CyPB etwa 12% weniger Zellen und bei CyPA etwa 17% weniger.

Ein Versuch von Allain et al.³⁵³ sowie kürzlich durchgeführte Versuche unserer Arbeitsgruppe³¹⁶ haben gezeigt, dass Thrombozyten sowohl durch CyPA als auch durch CyPB stimuliert werden können. Dies äußert sich *in vitro* in einer gesteigerten Adhäsion der Plättchen (*rolling* und feste Adhäsion) sowohl auf Kollagen als auch auf aktiviertem Endothel.³⁵³ Die Stimulation der Thrombozyten wird dabei über die Bindung von CyPB an CD147 (EMMPRIN) vermittelt.³¹⁶

CD147 (EMMPRIN) ist ein Rezeptor, der auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert wird, und zwar bei ruhenden Thrombozyten nur in geringen Mengen. Nach der Stimulation von Thrombozyten mit Stimulatoren wie Thrombin, ADP oder Kollagen kommt es zum Transfer von CD147 (EMMPRIN) aus dem offenen kanalikulären System auf die Plättchenoberfläche und damit zu einer gesteigerten Oberflächenexpression.³⁵⁰

CD147 (EMMPRIN) stellt einen signalgebenden Rezeptor für CyPA und CyPB dar.^{302,308,465} Er nimmt beispielsweise Einfluss auf die Migration von neutrophilen Granulozyten. Deren Migration kann durch die Blockierung von CD147 (EMMPRIN) mittels anti-CD147-Antikörper gehemmt werden.³²⁷

Durch CD147-CD147 (EMMPRIN-EMMPRIN)-Interaktionen kommt es als Zeichen der Aktivierung der Thrombozyten zu einer erhöhten Expression von P-Selektin auf deren Oberfläche.³⁵⁰ Auch die Bindung von CyPA und CyPB an CD147 (EMMPRIN) führt zu einer gesteigerten P-Selektin-Expression auf der Plättchenoberfläche.⁴¹⁹ Dies zeigt, dass die beiden Cyclophiline eine stimulierende Wirkung auf Thrombozyten ausüben.

Neben seiner Funktion als signalgebender Rezeptor kann CD147 (EMMPRIN) auch als Adhäsionsrezeptor fungieren. So wird durch die bereits erwähnte direkte Interaktion zwischen CD147 (EMMPRIN)-Molekülen das *rolling* von CD147 (EMMPRIN)-exprimierenden Zellen über CD147 (EMMPRIN)-Moleküle auf der Matrix vermittelt.⁴⁶⁶ Auch die feste Adhäsion von T-Zellen an die

V DISKUSSION

extrazelluläre Matrix wird über CD147 (EMMPRIN) vermittelt. Dabei fungiert CyPB als Bindungspartner für CD147 (EMMPRIN).²⁹⁶

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse (siehe Abb. 46 und 47) lassen vermuten, dass auch die feste Adhäsion der ADP-stimulierten Thrombozyten auf immobilisiertem CyPA und CyPB über CD147 (EMMPRIN) auf der Thrombozytenoberfläche vermittelt wird. Wenn dies zutrifft, so könnte man auch vermuten, dass durch CD147-CD147 (EMMPRIN-EMMPRIN)-Interaktionen nicht nur ein gesteigertes *rolling* von Zellen hervorgerufen werden kann,⁴⁶⁶ sondern auch die feste Adhäsion vermittelt werden kann.

Die hierbei zugrundeliegenden Mechanismen und andere eventuell beteiligte Rezeptoren müssen in weiteren Versuchen genauer geklärt werden.

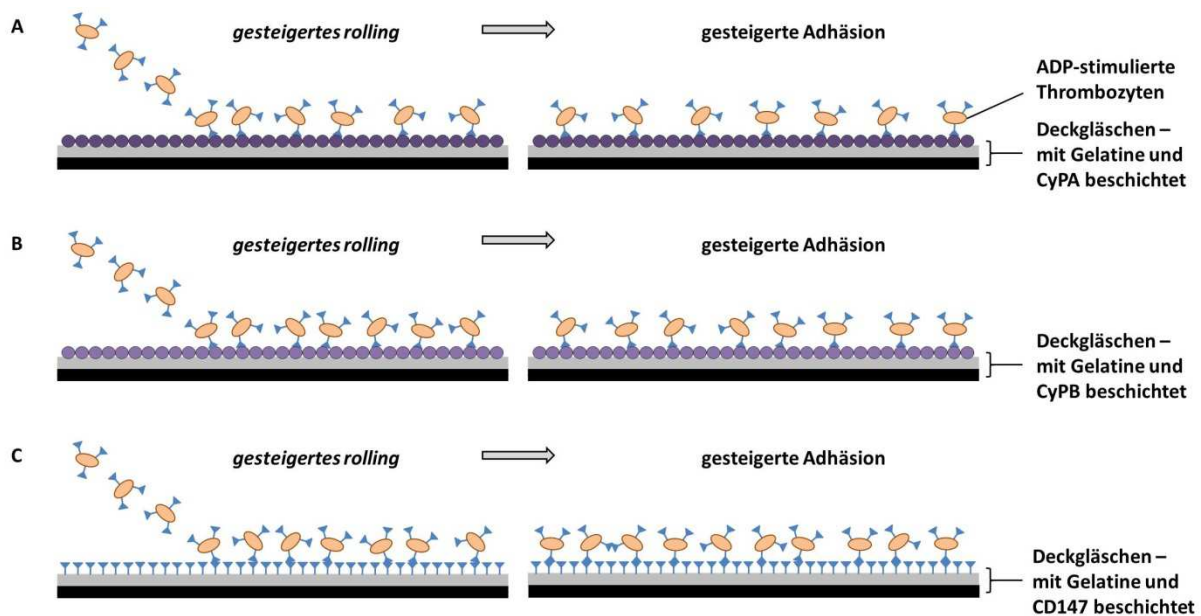


Abbildung 60: Adhäsionsverhalten (*rolling* und feste Adhäsion) ADP-stimulierter Thrombozyten auf immobilisiertem CyPA (A), CyPB (B) und CD147 (EMMPRIN) (C)

ADP-stimulierte Thrombozyten weisen *in vitro* eine gesteigerte Adhäsion (sowohl *rolling* als auch feste Adhäsion) auf immobilisiertem CyPA, auf immobilisiertem CyPB, sowie auf immobilisiertem CD147 (EMMPRIN) auf.

2.6 Die Wirkung der nicht immunsuppressiven Cyclophilin-Inhibitoren NIM811 und MM284 auf das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten *in vitro*

Cyclophiline nehmen Einfluss auf verschiedene Immun- und Entzündungsreaktionen, die mit der Entwicklung der Atherosklerose in Verbindung stehen.³⁴⁷ Neuere Forschungen zeigen, dass die Antagonisierung der Cyclophilin-Wirkungen eine therapeutische Möglichkeit darstellen könnte, entzündliche Erkrankungen, die mit der Wanderung von Leukozyten einhergehen, zu reduzieren.³³⁷ Auch die Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen könnte demzufolge durch den Einsatz von Cyclophilin-Inhibitoren moduliert werden.

Neben Leukozyten spielen auch Thrombozyten eine bedeutende Rolle bei der Initiation und Progression der Atherosklerose und bei den sich daraus entwickelnden Komplikationen wie dem akuten Myokardinfarkt.⁹ Zum einen können sie die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen fördern, indem sie an aktiviertes Endothel adhären und dadurch die Rekrutierung von Leukozyten in die Gefäßwand begünstigen.^{13,124,135,467} Zum anderen spielen sie eine wichtige Rolle bei der Entstehung thrombotischer Komplikationen im Zusammenhang mit atherosklerotischen Veränderungen. Durch den Kontakt mit Kollagen, wie er im Rahmen einer Plaqueruptur oder -erosion vorkommt, werden die Thrombozyten aktiviert und binden an die extrazelluläre Matrix. Dies führt zur konsekutiven Thrombusbildung und ischämischen Krankheitsbildern.^{13,90,126,133,134,467}

Allain et al. konnten in einem statischen Versuchsansatz zeigen, dass die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen nach Stimulation mit CyPB gesteigert werden kann.³⁵³ Dieser Prozess ist abhängig vom Vorhandensein von extrazellulärem Ca^{2+} und geht mit einem Ca^{2+} -Einstrom in die Thrombozyten einher. Die durch CyPB vermittelte Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen konnte in diesem Versuch durch die Zugabe von Cyclosporin A reduziert werden.

Kürzlich gewonnene Untersuchungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe haben belegt, dass sowohl die Stimulation mit CyPA als auch mit CyPB unter dynamischen Bedingungen zu einer Aktivierung und einer gesteigerten Adhäsion (*rolling* und die feste Adhäsion) der Plättchen auf verschiedenen Matrices wie Kollagen oder HUVECs führt.³¹⁶ Mittels der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Flusskammerversuche konnte der Effekt von CyPB auf die Plättchenadhäsion nochmals bestätigt werden.

Wie bereits beschrieben, ist es wahrscheinlich, dass auch bei den inflammatorischen Prozessen im Rahmen der Atherosklerose erhöhte CyPB-Plasmakonzentrationen vorliegen. Dies legt die Vermutung nahe, dass CyPB auch *in vivo* eine Rolle bei der Thrombozytenaktivierung und in der Folge bei der Plaqueprogression und der Entstehung thrombotischer Komplikationen spielen könnte.

Diese Vermutung wird durch die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene verstärkte Expression von CyPB auf thrombinstimulierten Thrombozyten noch weiter bestärkt. Da in einer Untersuchung unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden konnte, dass CD147 (EMMPRIN) in der atherosklerotischen Plaque verstärkt exprimiert wird³⁸² und die Adhäsion von Thrombozyten vermutlich teilweise auch über CD147 (EMMPRIN) vermittelt wird, könnte die Entstehung von Thromben im Rahmen von Plaquerupturen oder -erosionen durch derartige Interaktionen gefördert werden.

Aus diesen Erkenntnissen lässt sich folgern, dass durch den therapeutischen Einsatz von Cyclophilin-Inhibitoren bereits die Entstehung der Atherosklerose und die Entwicklung thrombotischer Geschehnisse im Rahmen der Plaqueruptur beeinflusst werden könnten. So führte beispielsweise im Falle des akuten Myokardinfarktes die Behandlung mit Cyclosporin A zu einer reduzierten Infarktgröße bei den betroffenen Patienten.⁴⁶⁸

Die Behandlung mit Cyclosporin A bringt jedoch auch eine Reihe an unerwünschten Wirkungen mit sich.³⁴⁰ In diesem Zusammenhang ist insbesondere die immunsupprimierende Wirkung von Cyclosporin A zu erwähnen.

Im Gegensatz zu der oben genannten Studie von Piot et al.,⁴⁶⁸ bei der ein positiver Effekt für Cyclosporin A im Rahmen der Atherosklerose-Behandlung nachgewiesen werden konnte, gibt es auch eine Reihe von Studien, die zeigen, dass die Behandlung mit Cyclosporin A eine erhöhte Disposition für die Entstehung der Atherosklerose mit sich bringt.^{340,469,470}

So nimmt Cyclosporin A beispielsweise Einfluss auf den Lipoprotein-Metabolismus und führt unter Langzeitbehandlung zur Entwicklung einer Hyperlipidämie.^{340,469,470}

Außerdem beeinflusst es die Funktionen von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen - Zelltypen, die an der Entstehung der Atherosklerose maßgeblich beteiligt sind - auf unterschiedliche Art und Weise. Dabei vermittelt es auch hier teils proatherogene und teils antiatherogene Effekte.³⁴⁰

Bei Endothelzellen hemmt Cyclosporin A beispielsweise den Transkriptionsfaktor *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) und dadurch ihre Proliferation.³⁴⁰ Auch CyPA-vermittelte proinflammatorische Effekte, wie die Sekretion von *tissue factor* und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, werden durch Cyclosporin A inhibiert. Auf diese Weise könnte es einen atheroprotektiven Effekt auf das Endothel ausüben.³⁴⁰

Bei glatten Muskelzellen führt es zu einer verminderten MPC-1-Sekretion und reduziert dadurch wahrscheinlich die Infiltration von Makrophagen und die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen.⁴⁷¹ Außerdem hemmt es die Proliferation und die Migration von glatten Muskelzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.⁴⁷¹ Andererseits ruft Cyclosporin A bei glatten Muskelzellen auch eine gesteigerte Sekretion von Interleukin 8 hervor, wodurch es die Rekrutierung von Makrophagen begünstigen könnte.⁴⁷² Des Weiteren trägt es über verschiedene Mechanismen, wie z.B. eine gesteigerte Bildung von Angiotensin II und Vasopression, zur Entstehung einer Hypertension bei, wodurch es die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen begünstigen kann.^{473,474}

Bei Makrophagen hemmt Cyclosporin A die LPS-vermittelte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und IL-8 und könnte dadurch antiatherogen wirken.⁴⁷⁵ Andererseits hemmt es die Sekretion von ApoE bei Schaumzellen,⁴⁷⁶ welches starke antiatherogene Eigenschaften hat und die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen verhindern kann.⁴⁷⁷

Cyclosporin A bewirkt außerdem die Sekretion von CyPB bei Keratinozyten und HeLa-(Zervixkarzinom-)Zellen.^{255,267} Im Rahmen der Ergebnisse dieser Arbeit könnte in einer gesteigerten Freisetzung von CyPB ein weiterer Mechanismus gesehen werden, über den Cyclosporin A die

V DISKUSSION

Entwicklung atherosklerotischer Prozesse begünstigt (die Hypothesen zu den zugrundeliegenden Mechanismen werden in Kapitel 2.7 näher ausgeführt).

Aus der Auflistung der letztgenannte Cyclosporin A-Wirkungen lässt sich schlussfolgern, dass es zur Behandlung der Atherosklerose kaum geeignet ist. Aufgrund dieser Gegebenheit steht die Entwicklung von Cyclosporin A-Derivaten mit einem veränderten biologischen Verhalten im Zentrum vieler Untersuchungen. Das Ziel dabei ist es, die durch Cyclosporin A hervorgerufenen unerwünschten Nebenwirkungen und das Risiko vaskulärer Veränderungen abzuschwächen.

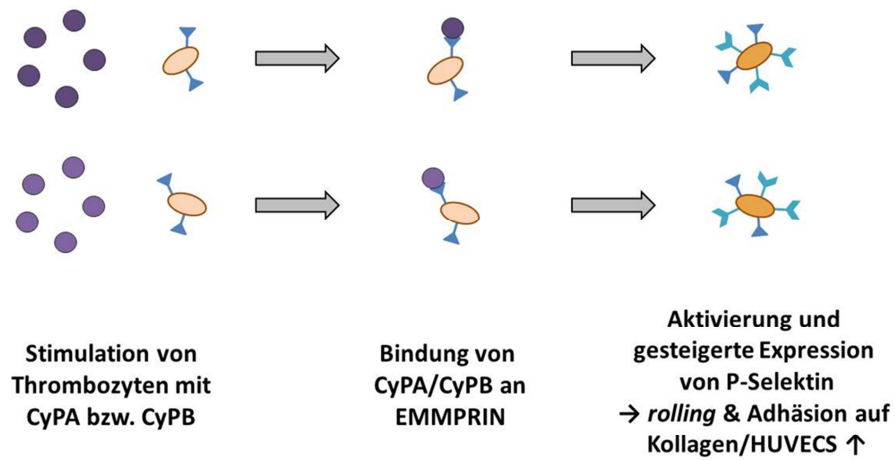
Die strukturellen Veränderungen bei den Cyclosporin A-Derivaten NIM811 und MM284 führen z.B. dazu, dass die Aktivität von Calcineurin nicht mehr beeinflusst werden kann, wodurch bei beiden Derivaten die immunsuppressive Wirkung verlorenght.^{337,341,343}

NIM811 und der neu entwickelte Cyclophilin-Inhibitor MM284 unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, die Zellmembran zu penetrieren: Während NIM811 dazu in der Lage ist, und somit sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Cyclophiline in ihrer Wirkung inhibieren kann, ist MM284 auf Grund der Substitution eines polaren Restes am Cyclosporin-Grundgerüst nicht mehr in der Lage, die Zellmembran zu penetrieren. Dadurch kann nur die Wirkung extrazellulärer Cyclophiline inhibiert werden, während die biologischen Effekte intrazellulärer Cyclophiline sowie intrazelluläre Signalwege von seinen Wirkungen unberührt bleiben.^{337,343,347}

In neueren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das durch CyPB ausgelöste gesteigerte *rolling* und die gesteigerte Adhäsion von Thrombozyten durch die gemeinsame Inkubation von CyPB mit dem intra- und extrazellulär wirkenden Cyclosporin A-Derivat NIM811 signifikant reduziert werden konnte.³¹⁶

Im vorliegenden Versuch wurde die Wirkung von NIM811 auf das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten mit derjenigen von MM284 verglichen (siehe Abb. 61). Bisher war MM284 nur im Hinblick auf seine inhibierende Wirkung gegenüber extrazellulärem CyPA untersucht worden.³³⁷ Der vorliegende Versuch zeigte, dass MM284 ebenfalls eine inhibierende Wirkung gegenüber extrazellulärem CyPB aufweist und dass MM284 die stimulierende Wirkung von CyPB auf die Adhärenz von Thrombozyten im selben Maße hemmt wie NIM811 (siehe Abb. 49-54).

A



B

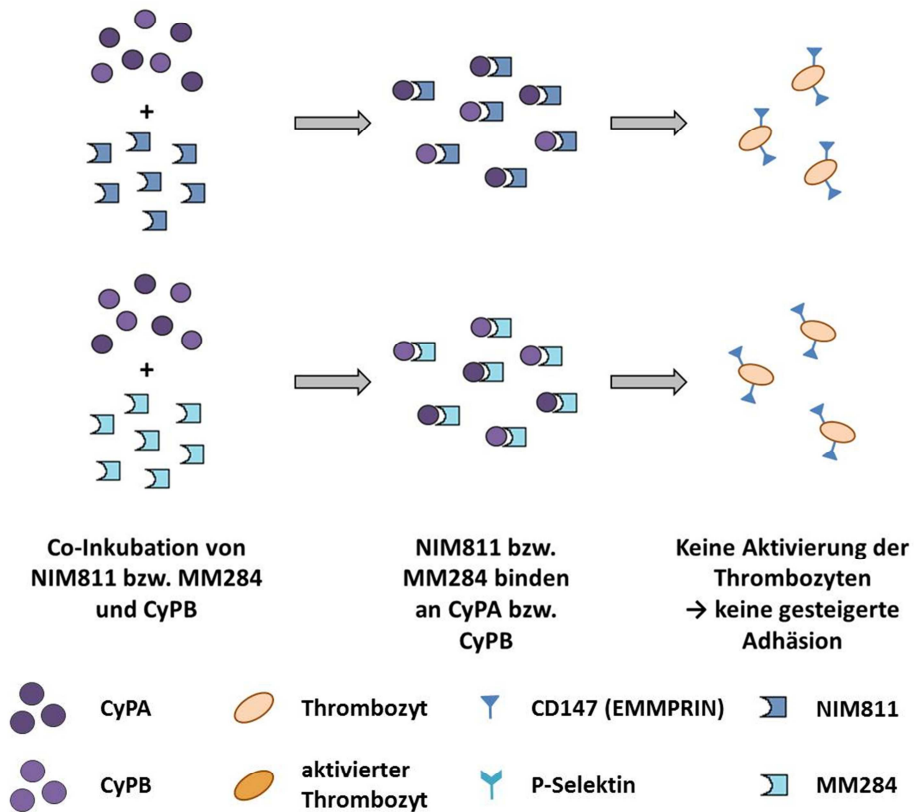


Abbildung 61: Einfluss von CyPA und CyPB (A) sowie von NIM811 und MM284 (B) auf den Aktivierungszustand von Thrombozyten

A) Die Bindung von CyPA bzw. CyPB an CD147 (EMMPRIN) führt zur Aktivierung und in der Folge zu einer gesteigerten Adhäsion (*rolling* und feste Adhäsion) von Thrombozyten auf Kollagen und HUVECS. **B)** Dieser Effekt kann sowohl durch den Cyclophilin-Inhibitor NIM811 als auch durch MM284 inhibiert werden.

In einer aktuellen Untersuchung unserer Arbeitsgruppe wurde die Wirkung der beiden Cyclosporin A-Derivate auf die Thrombusbildung *in vivo* untersucht.³³⁶ Hierzu wurde ein Versuchsmodell gewählt, bei dem Darmarteriolen durch Eisen(III)Chlorid verletzt wurden.

Bei NIM811 handelt es sich, wie bereits beschrieben, um ein zellpermeables Cyclosporin A-Derivat, das sowohl die Wirkung extra- als auch intrazellulärer Cyclophiline inhibiert. Bei seiner Verwendung kann also nicht zwischen der Unterdrückung von intra- und extrazellulären Signalwegen unterschieden werden.³³⁷ Im Gegensatz dazu handelt es sich bei MM284 um ein zellimpermeables Cyclosporin A-Derivat, das nur die Wirkung der extrazellulären Cyclophiline inhibiert.³³⁷

Um zwischen dem Einfluss extrazellulärer und intrazellulärer Cyclophiline auf die Thrombusformation zu unterscheiden, wurden beide Cyclophilin-Inhibitoren im Tierversuch eingesetzt.

Die Ergebnisse des vorliegenden Versuchs zeigten eine deutliche Verzögerung der Thrombusbildung bei den Mäusen, die mit MM284 bzw. NIM811 behandelt wurden im Vergleich zu der Gruppe, die lediglich mit Lösungsmittel (PBS) behandelt wurden. Dabei führte der Einsatz von MM284 zu einer ähnlich verzögerten Thrombusbildung wie der Einsatz von NIM811. Daraus lässt sich folgern, dass die Adhäsion von Thrombozyten in erster Linie durch die Wirkung extrazellulärer Cyclophiline stimuliert wird.

Mit diesem Versuchsansatz kann allerdings nicht zwischen dem Einfluss von CyPA und CyPB auf die Thrombozyten differenziert werden, da die eingesetzten Inhibitoren hemmende Wirkung gegenüber beiden Cyclophilinen aufweisen. Welche Rolle CyPA bzw. CyPB für die Thrombusbildung spielen, müsste in weiteren Versuchsansätzen näher untersucht werden.

Hierzu müssten Methoden zum Einsatz kommen, bei denen trotz der engen strukturellen Verwandtschaft zwischen CyPA und CyPB, ein selektiv hemmender Effekt gegenüber CyPA oder CyPB erzielt werden kann. Erste, noch nicht publizierte Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass eine präferentielle Hemmung von CyPA mit einer Antikörper-basierten Strategie möglich ist.

2.7 Verknüpfung der hier gewonnenen Erkenntnisse mit den bisher bekannten Abläufen bei der Atherosklerose

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CyPB in der atherosklerotischen Plaque exprimiert wird. Auch Monozyten, Makrophagen, Schaumzellen und aktivierte Thrombozyten, die eine wichtige Rolle bei der Atherogenese spielen, exprimieren CyPB auf ihrer Oberfläche.

An den Prädispositionsstellen für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen entwickeln sich die initialen Veränderungen zunächst unter einem intakten, aktivierten und dysfunktionellen Gefäßendothel, das jedoch eine erhöhte Permeabilität aufweist. In späteren Stadien können die Endothelzellen abschilfern und es entstehen über den bereits fortgeschrittenen Läsionen endothelzellfreie Bezirke.⁵⁶ In diesen Regionen lassen sich Thrombozyten und Monozyten nachweisen, die an dem freiliegenden subendothelialen Gewebe adhären.¹¹⁴

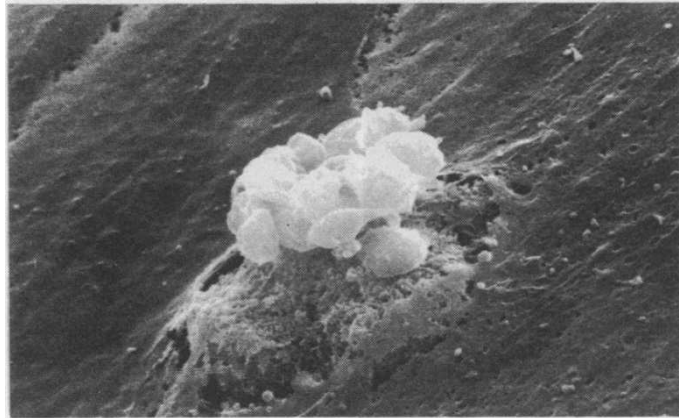


Abbildung 62: Typische lokale Thrombozytenadhäsion über einem Endotheldefekt (Abbildung aus Davies et al. 1988¹¹⁴).

Thrombozyten adhären an der subendothelialen Matrix unter einer einzelnen abgeschilften Endothelzelle. Teilweise ist eine Formveränderung der Thrombozyten zu erkennen (Vergrößerung 3570-fach).

Eine Ursache für den Endothelzellverlust kann in der Wirkung von CyPA auf Endothelzellen gesehen werden. Endothelzellen sezernieren CyPA unter der Wirkung hoher Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies, die u.a. von Makrophagen in der Läsion freigesetzt werden.³¹⁵ Einerseits löst dies die Apoptose von Endothelzellen aus, mit einem lokalen Verlust von Endothelzellen in der Folge. Andererseits können dadurch Endothelzellen aktiviert werden.³¹⁵ An diesen aktivierten Endothelzellen können wiederum Thrombozyten adhären.¹³ Auch diese sind durch die Einwirkung reaktiver Sauerstoffspezies zur Sekretion von CyPA fähig und können so einer zusätzlichen Steigerung der Apoptoserate von Endothelzellen führen.⁵¹

Durch das Fehlen der Endothelzellschicht wird subendotheliales Kollagen (vom Typ I) bzw. *tissue factor* freigelegt.^{84,135} Dieses führt zur Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten sowie zu einer Thrombusbildung.^{84,90}

Die Ausdehnung der so entstandenen endothelzellfreien Bezirke kann von sehr kleinen Arealen mit mikroskopisch kleinen Thromben, die keine klinische Relevanz haben, bis hin zu großen Bezirken reichen, die mit ausgedehnten, fibrin- und plättchenreichen Thromben einhergehen.⁸⁴ Bei fortgeschrittenen Läsionen findet sich in der Regel immer eine fokale Thrombozytenablagerung.⁴⁷⁸

Die Ergebnisse des Flusskammerversuchs der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass aktivierte Thrombozyten an immobilisiertem CyPB adhären (siehe Abb. 46-48). Im Rahmen der oben beschriebenen Vorgänge könnte es durch einen Verlust der Endothelzellschicht auf der Plaqueoberfläche zum Kontakt des in der Plaque befindlichen CyPB mit den Thrombozyten im Blutstrom kommen. Auf diese Weise könnte es zu einem gesteigerten *rolling* und zur gesteigerten Adhäsion von Thrombozyten auf dem freigelegten subendothelialen Gewebe kommen. Dies könnte in der Folge zur Entstehung einer Koronarthrombose mit den bekannten Komplikationen führen (siehe Abb. 63).

V DISKUSSION

Der geschilderte Mechanismus könnte nicht nur im Fall einer Erosion, sondern auch bei der Ruptur einer atherosklerotischen Plaque, die Entstehung solcher akuter Komplikationen begünstigen.

Im vorliegenden Flusskammerversuch konnte nicht nur eine Adhäsion aktivierter Thrombozyten an immobilisiertem CyPB, sondern auch an immobilisiertem CyPA nachgewiesen werden. CyPA wird ebenso wie CyPB in der atherosklerotischen Plaque exprimiert.³¹¹⁻³¹⁵ Im Falle einer Plaqueerosion oder -ruptur könnte also neben CyPB ebenfalls das in der Plaque exprimierte CyPA über den oben beschriebenen Mechanismus für die Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten mitverantwortlich sein.

CD147 (EMMPRIN) stellt einen gemeinsamen, oberflächlichen Rezeptor für beide Cyclophiline dar und vermittelt einen großen Teil der Wirkungen extrazellulär vorkommender Cyclophiline.³⁰² Außerdem kann er als Adhäsionsrezeptor fungieren.⁴⁶⁶

Da CD147 (EMMPRIN) auf aktivierten Thrombozyten verstärkt exprimiert wird,³⁵⁰ ist es naheliegend, dass auch die Adhäsion der Thrombozyten im vorliegenden Flusskammerversuch über CD147 (EMMPRIN) vermittelt wird.

Trifft diese Vermutung zu, so kann man davon ausgehen, dass auch *in vivo* die Adhäsion von Thrombozyten über die Bindung von CD147 (EMMPRIN) auf der Thrombozytenoberfläche an das in der Plaque exprimierte CyPA und CyPB vermittelt wird und CyPB demnach an den Pathomechanismen, die für die Entstehung einer Koronarthrombose verantwortlich sind, beteiligt ist.

Aus diesem Grund muss diese Hypothese zunächst in weiteren Versuchen mit blockierenden Antikörpern gegen CD147 (EMMPRIN) bestätigt werden.

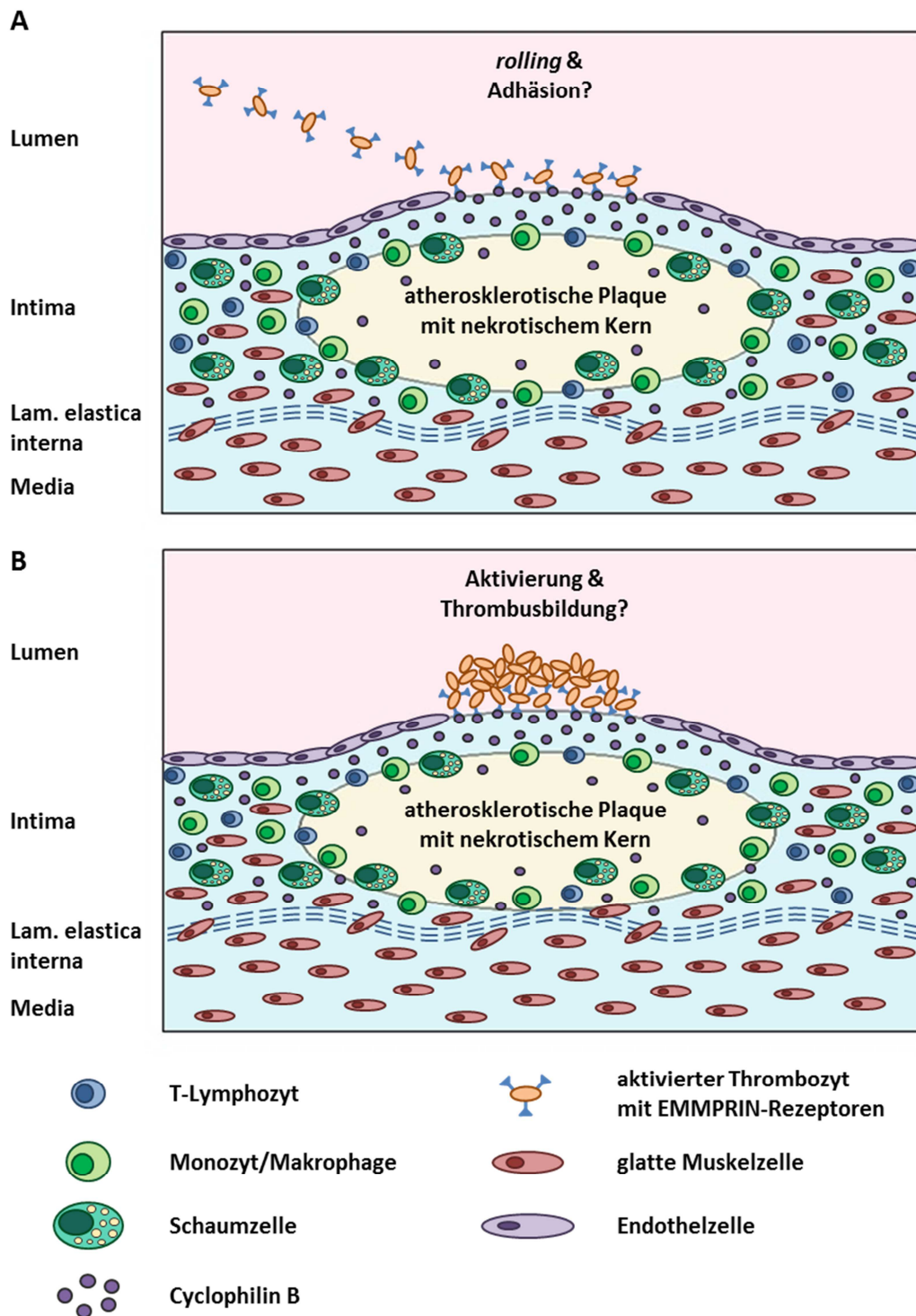


Abbildung 63: Darstellung der hypothetischen Wirkung von CyPB nach Plaqueerosion oder -ruptur auf die Thrombozytenadhäsion (*rolling* und feste Adhäsion auf CyPB im subendothelalem Gewebe) (A) und die Thrombusbildung (B)

Gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit wird CyPB auch auf der Oberfläche der Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen exprimiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde dies in der Abbildung nicht eingezeichnet.

Die Ruptur einer Plaque stellt kein seltenes Ereignis während der Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen an den Koronargefäßen dar. Auf das Aufbrechen der Plaqueoberfläche folgt eine mehr oder weniger starke Blutung in die Plaque hinein und eine unterschiedlich stark ausgeprägte, luminale Thrombusbildung.⁵⁶ Diese muss nicht unbedingt so ausgedehnt sein, dass sie eine Ischämie in den distal liegenden Versorgungsgebieten des Koronargefäßes auslöst und ein Myokardinfarkt entsteht. Eine weniger ausgeprägte Thrombusbildung kann oft klinisch inapparent bleiben und durch die nachfolgenden Heilungsprozesse das Wachstum der Plaque stimulieren und dadurch zu einer schnellen Progression der Plaque führen.^{56,479,480}

Im Rahmen des Heilungsprozesses wird der Thrombus zunächst mehr oder weniger stark lysiert. In der Folge kommt es zur Proliferation glatter Muskelzellen. Diese synthetisieren neues Kollagen, um die verletzte Intima wiederherzustellen. Schließlich kommt es zur Re-Endothelialisierung.^{84,479} Derartige Heilungsprozesse führen zu einem schnellen Wachstum der Läsion, die von einer milden Vergrößerung der Plaque bis hin zu einer hochgradigen Stenose des Gefäßes reichen kann.⁴⁷⁹

Dieser Ablauf könnte eine Erklärung dafür darstellen, warum die in Serienangiografien beobachtete Progression atherosklerotischer Läsionen eher episodisch als linear vonstattengeht.^{479,480}

Im Rahmen der in Abbildung 63 zusammengefassten Abläufe, könnte das in der Plaque exprimierte und bei der Plaqueruptur freigelegte CyPA und CyPB an einer schnellen, nicht vorhersehbaren Weiterentwicklung atherosklerotischer Läsionen beteiligt sein. Dabei rufen die dort exprimierten Cyclophiline möglicherweise zunächst über eine verstärkte Adhäsion von Thrombozyten an der Rupturstelle die Entstehung eines Thrombus hervor. Diese Gefäßläsion könnte in der Folge über den oben beschriebenen Heilmechanismus abgebaut werden und eine schnelle Progression der Läsion bewirken (siehe Abb. 64).

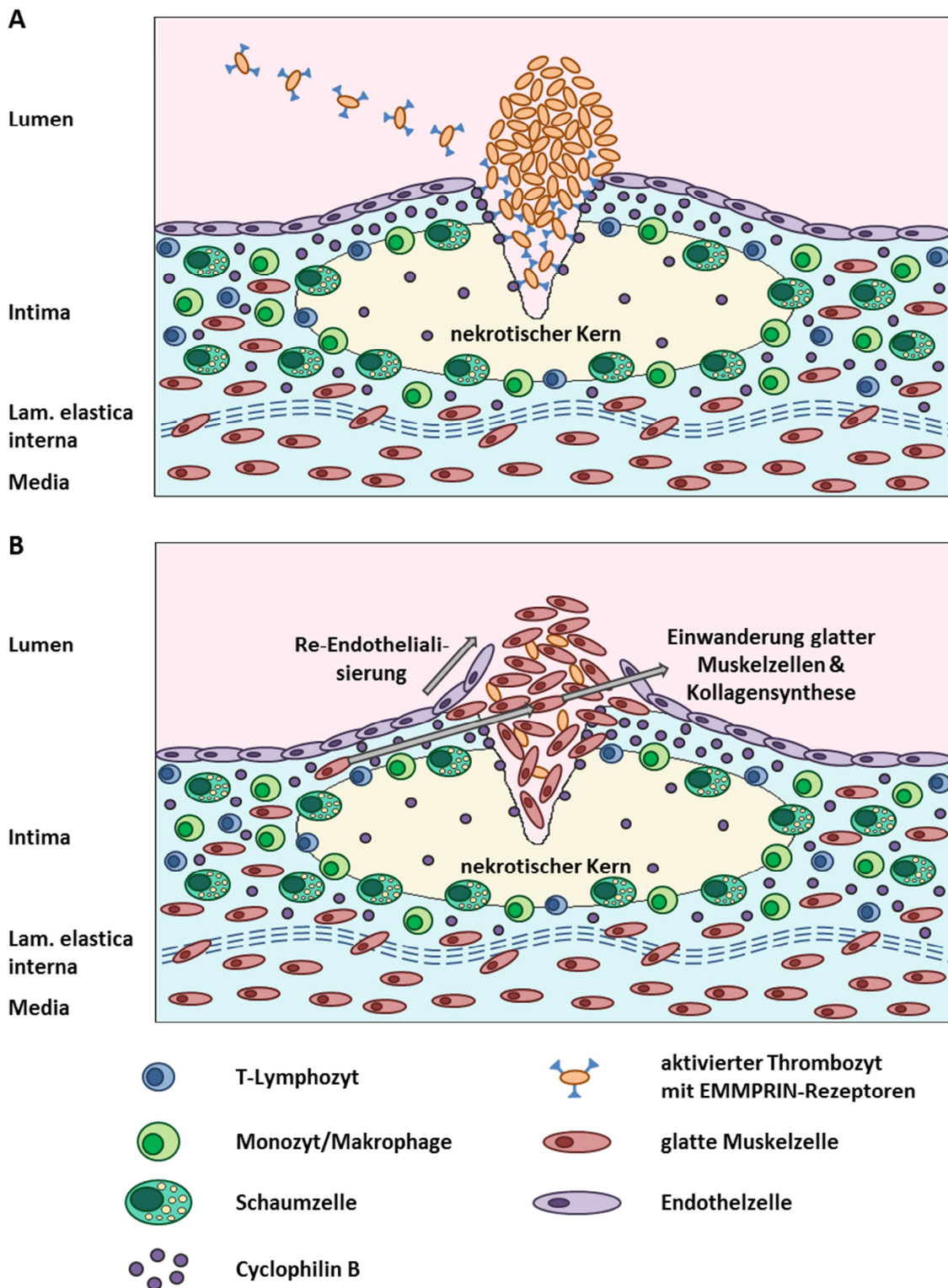


Abbildung 64: Darstellung der hypothetischen Beteiligung von CyPB an der schnellen Plaqueprogression nach Plaqueruptur mit konsekutiver Thrombusbildung (A) und Reorganisation der Gefäßwand durch Thrombolyse, Einwanderung glatter Muskelzellen, Synthese von Kollagen und Re-Endothelialisierung (B)

Gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit wird CyPB auch auf der Oberfläche der Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen exprimiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde dies in der Abbildung nicht eingezeichnet.

V DISKUSSION

Thrombozyten stellen wichtige Entzündungszellen im Rahmen der Atherosklerose dar.^{13,14,15} Sie adhären am dysfunktionellen Endothel, setzen Entzündungsmediatoren frei, die Leukozyten anlocken und begünstigen die Anheftung von Leukozyten am Endothel, indem sie eine „klebrige Oberfläche“ ausbilden auf der die Leukozyten bevorzugt adhären (siehe Abb. 65). Hierdurch wird die Auswanderung der Entzündungszellen in die Gefäßwand erleichtert.^{4,9,124,126,135,136}

Carpentier et al. konnten nachweisen, dass CyPB sowohl an Endothelzellen von Kapillaren der Blut-Hirn-Schranke als auch an Endothelzellen von Kapillaren anderer Gewebearten binden kann.⁴⁸¹ Es ist daher davon auszugehen, dass CyPB auch an Endothelzellen anderer Blutgefäße, wie beispielsweise an diejenigen von Koronargefäßen, binden kann.

Die im Blut zirkulierenden Thrombozyten könnten an das aus dem Plasma stammende und an den Endothelzellen der Koronargefäße gebundene CyPB adhären und somit dort ihre Wirkung als Entzündungszellen entfalten. Dieser Vorgang stellt eine weitere Möglichkeit dar, wie CyPB die Progression der Atherosklerose vorantreiben könnte.

CyPB kommt im Plasma gesunder Blutspender in einer Konzentration von etwa 5nmol/l vor.^{247,353} Die von Allain et al. beschriebene Aktivierung von Thrombozyten erfordert allerdings deutlich höhere CyPB-Blutspiegel.³⁵³ Als Reaktion auf entzündliche Stimuli können große Mengen CyPB in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden.²⁹⁶ Beispielsweise bei septischen Zuständen wurden CyPB-Spiegel im Plasma erreicht werden, die zu einer Aktivierung von Thrombozyten führen.³⁵³

Es ist demnach davon auszugehen, dass es auch im Rahmen der inflammatorischen Prozesse der Atherosklerose zu erhöhten CyPB-Plasmakonzentrationen kommt. Hierdurch könnte der bereits beschriebene progressionsfördernde Effekt von CyPB noch zusätzlich verstärkt werden.

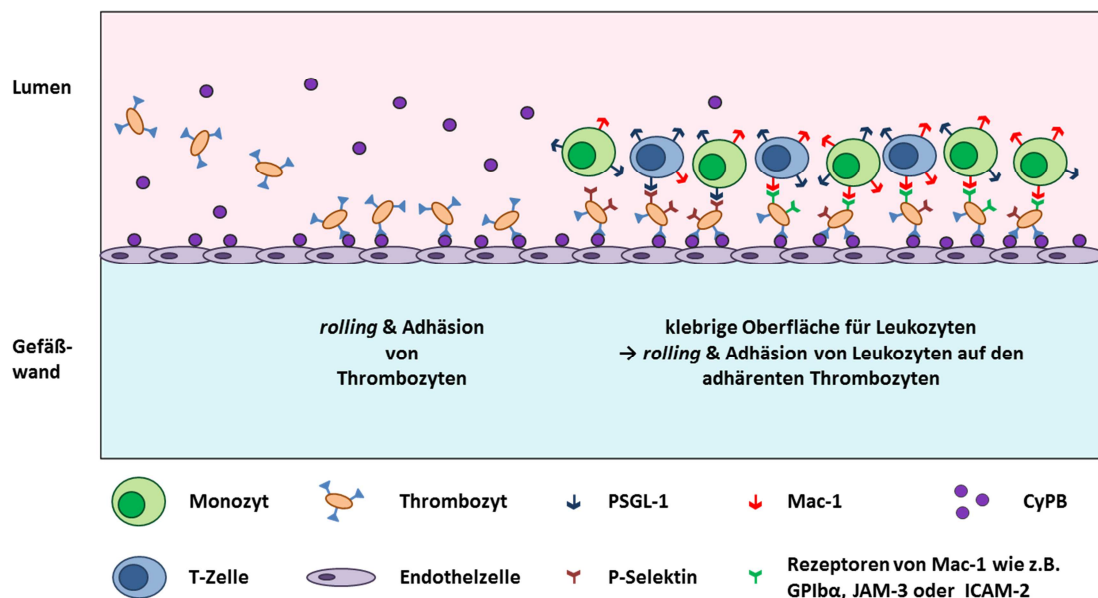


Abbildung 65: Darstellung der hypothetischen CyPB-vermittelten Rekrutierung von Leukozyten in die Gefäßwand

Thrombozyten adhären an CyPB, das an Endothelzellen gebunden ist. Dadurch begünstigen sie möglicherweise die Auswanderung von Leukozyten in die Gefäßwand und in der Folge die Plaqueprogression.

CyPB bindet in der extrazellulären Matrix an Heparansulfat-Proteoglykane, von welchen es durch MMPs in einer aktiven Form freigesetzt werden kann.⁴⁸² Es wird als Reaktion auf entzündliche Stimuli und oxidativen Stress verstärkt exprimiert und sezerniert, und es wird ihm eine Rolle bei der Modulation entzündlicher Reaktionen zugesprochen.^{292,293} Man vermutet, dass Proteoglykane dazu dienen, ein „Gewebereservoir“ für CyPB zu schaffen. Das dort immobilisierte CyPB kann einwandernden Leukozyten präsentiert werden. Außerdem kann hierdurch die Akkumulation von hohen Konzentrationen am Ort des inflammatorischen Stimulus gewährleistet, und so die Interaktion mit den Entzündungszellen vermittelt werden.⁴⁸² Darüber hinaus konnten Melchior et al. zeigen, dass es durch die Bindung von CyPB an Makrophagen zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine kommt.⁴⁸² Dies weist darauf hin, dass CyPB eine modulierende Funktion bei inflammatorischen Geschehnissen einnehmen könnte.

Übertragen auf die Situation der Atherosklerose könnte das bedeuten, dass das in der Plaque exprimierte CyPB auch an der Modulation der Entzündungsprozesse, die sich im Rahmen der Atherogenese abspielen, beteiligt ist. Unsere Vermutung in diesem Zusammenhang war, dass CyPB neben anderen Zytokinen die Rekrutierung von Monozyten in die Intima beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit konnte zwar *in vitro* kein Einfluss von CyPB auf die Migration von Monozyten nachgewiesen werden (siehe Abb. 44 und 45), was unsere Hypothese widerlegt, dass es die Wirkung von MCP-1, das die Rekrutierung von Monozyten in die Intima bewirkt, zusätzlich unterstützen könnte. Marcant et al. konnten allerdings zeigen, dass CyPB *in vitro* eine chemotaktische Wirkung gegenüber Makrophagen besitzt.²⁹⁵ Bei dem in vorliegender Arbeit durchgeführten Peritonitis-Versuch konnte jedoch kein Einfluss von CyPB auf das Migrationsverhalten von Makrophagen nachgewiesen werden (siehe Abb. 56). Möglicherweise war jedoch die Versuchsdauer in unserem Versuch nicht lange genug, um die Möglichkeit auszuschließen, dass CyPB Einfluss auf die Einwanderung von Makrophagen in die Plaque nehmen könnte.

Im Falle einer Plaqueruptur kommt das thrombogene Material des nekrotischen Kerns in Kontakt mit Blutbestandteilen, aktiviert die Gerinnungskaskade und löst die Thrombusbildung aus.^{52,483} Eine Plaqueruptur tritt bevorzugt dort auf, wo die Schutzkappe am dünnsten und am stärksten von Schaumzellen infiltriert ist.²¹ Auch Makrophagen können in diesen Bereichen in großer Zahl gefunden werden.⁹⁷ Makrophagen und Schaumzellen produzieren ein breites Spektrum an MMPs und sind am Abbau der *fibrous cap* maßgeblich beteiligt.^{24,161}

Wie vorab beschrieben, wird das an Heparansulfat-Proteoglykane gebundene CyPB durch MMPs in aktiver Form aus seinem „Gewebereservoir“ freigesetzt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Monozyten mit CyPB zu einer gesteigerten MMP-Sekretion führt (siehe Abb. 41 und 42). Durch diese gesteigerte MMP-Freisetzung könnte es wiederum zu einer gesteigerten Abspaltung von CyPB aus seinem „Gewebereservoir“ kommen. Dieses stünde seinerseits somit zur Aktivierung anderer CD147 (EMMPRIN)-exprimierender Zellen oder zur weiteren Stimulation der MMP-Produktion zur Verfügung. Auf diese Weise könnte CyPB die Destabilisierung der *fibrous cap* zusätzlich fördern.

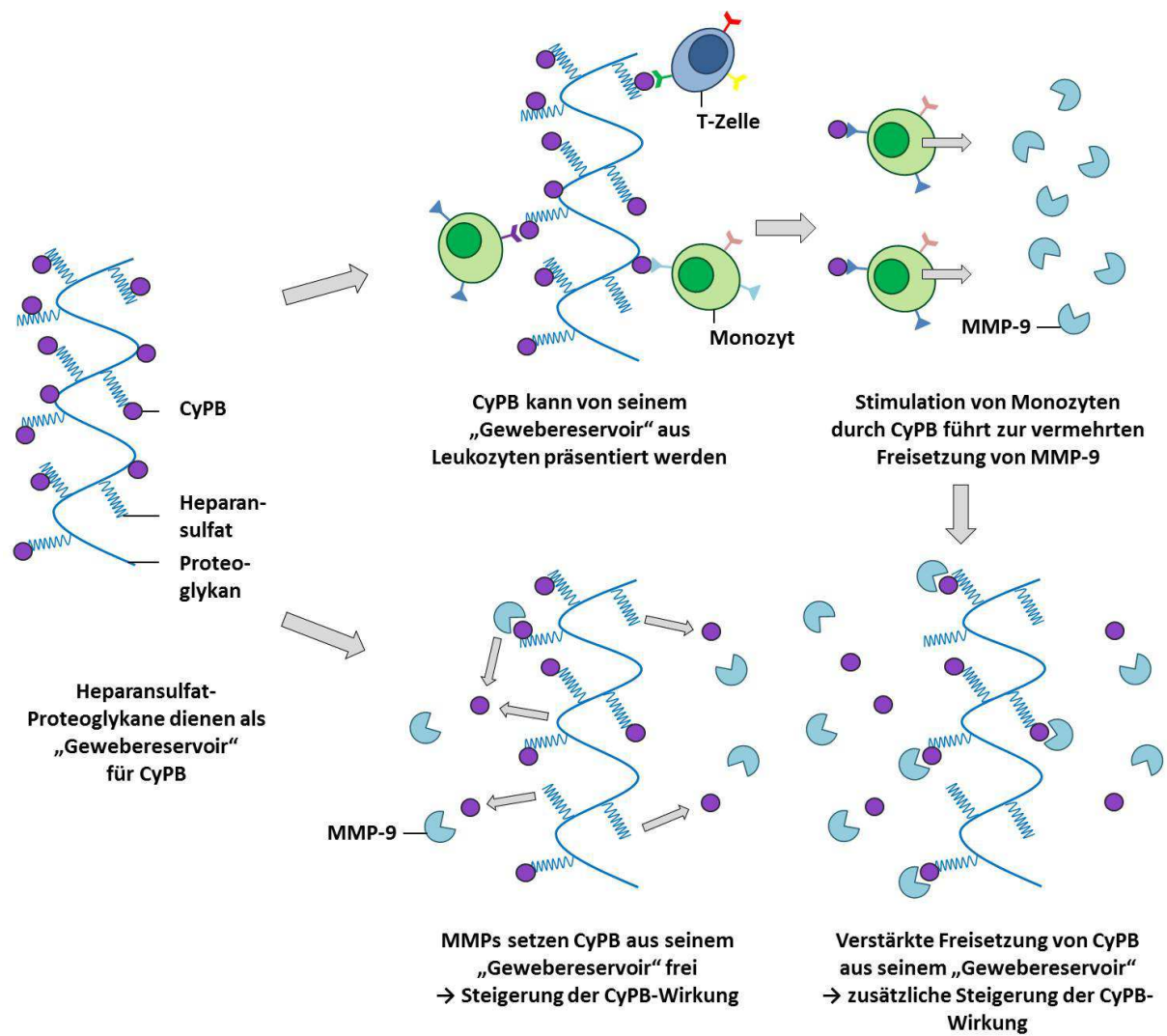


Abbildung 66: Darstellung der hypothetischen Wirkung von CyPB bei der Modulation von Entzündungsprozessen bei der Atherosklerose

Der Einsatz von Cyclosporin A und seinen Derivaten stellt einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt bei der Behandlung entzündlicher Erkrankungen, die mit der Wanderung von Leukozyten einhergehen, dar.³³⁷

Der inhibierende Effekt des sowohl intra- als auch extrazellulär wirkenden Cyclosporin A-Derivates NIM811 auf die stimulierende Wirkung von CyPA und CyPB gegenüber Thrombozyten wurde bereits in Flusskammerversuchen unserer Arbeitsgruppe untersucht³¹⁶ und konnten in der vorliegenden Arbeit nochmals bestätigt werden. Darüber hinaus konnte in den hier durchgeführten Versuchen gezeigt werden, dass die stimulierende Wirkung von CyPB auf Thrombozyten im Flusskammermodell auch durch das rein extrazellulär wirkende Cyclosporin A-Derivat MM284 inhibiert werden kann (siehe Abb. 49-54).

Dieser Befund eröffnet die Möglichkeit für einen potentiellen künftigen therapeutischen Einsatz des Cyclosporin A-Derivates bei thrombotischen Komplikationen im Rahmen von Plaquerupturen oder -erosionen. So könnte die Wirkung des nach Plaqueruptur oder -erosion oberflächlich exprimierten CyPB auf die Adhäsion von Thrombozyten durch MM284 gehemmt werden. Die dadurch induzierte Verhinderung des *rollings* und der Adhäsion der Thrombozyten könnte auch zu einer reduzierten Thrombusbildung führen. Hierdurch könnten ischämische Reaktionen distal der Rupturstelle verhindert oder reduziert werden und somit das Risiko der Entstehung von Komplikationen (wie z.B. einer instabilen Angina pectoris oder eines Myokardinfarktes) eingedämmt bzw. deren Ausmaß reduziert werden.

Die Hypothese zum Ablauf der möglichen therapeutischen Wirkung der beiden Cyclosporin A-Derivate findet ihre Darstellung in Abbildung 67.

Die Ergebnisse des vor kurzem in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten *in vivo*-Versuchs der Thrombusformation an den Darmgefäßen, bei denen sowohl NIM811 als auch MM284 zu einer signifikanten Verzögerung der Thrombusbildung geführt haben,³³⁶ bekräftigen die Ergebnisse des Flusskammerversuchs zusätzlich.

Jedoch ist hier davon auszugehen, dass die verzögerte Thrombusbildung im Tiermodell nicht nur auf die Blockierung der CyPB-Wirkung, sondern zusätzlich auf die Blockierung von CyPA zurückzuführen ist. Um die Effekte der CyPA-Inhibierung von denen der CyPB-Inhibierung abzugrenzen, könnte der Versuch zum einen mit CyPA/CyPB-*knockout*-Tieren wiederholt werden. Eine andere Möglichkeit könnte der Einsatz von Antikörpern mit präferentieller Wirkung gegenüber CyPA darstellen.

Ob die beiden Cyclosporin A-Derivate NIM811 und MM284 ebenso wie Cyclosporin A zu einer Sekretion von CyPB durch die an der Atheroskleroseentstehung beteiligten Zellen führen, wodurch dann die in dieser Arbeit beschriebenen möglichen Effekte von CyPB im Rahmen der Atherogenese verstärkt werden könnten, sollte in künftigen Versuchen geklärt werden. Dies könnte beispielsweise mittels eines *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) aus den Überständen von Zellkulturen, die mit NIM811 bzw. MM284 behandelt wurden, geschehen.

Um genauer beurteilen zu können, ob die Cyclosporin A-Derivate NIM811 und MM284 zur Therapie der Atherosklerose geeignet sein könnten, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. So müsste z.B. geklärt werden, ob die beiden Substanzen ebenso wie Cyclosporin A das Entstehen atherosklerotischer Prozesse fördern. Diese Erkenntnisse könnten nach einer umfassenden

V DISKUSSION

Darstellung von weiteren biologischen Effekten der Cyclosporin A-Derivate durch deren Einsatz in klinischen Studien gewonnen werden.

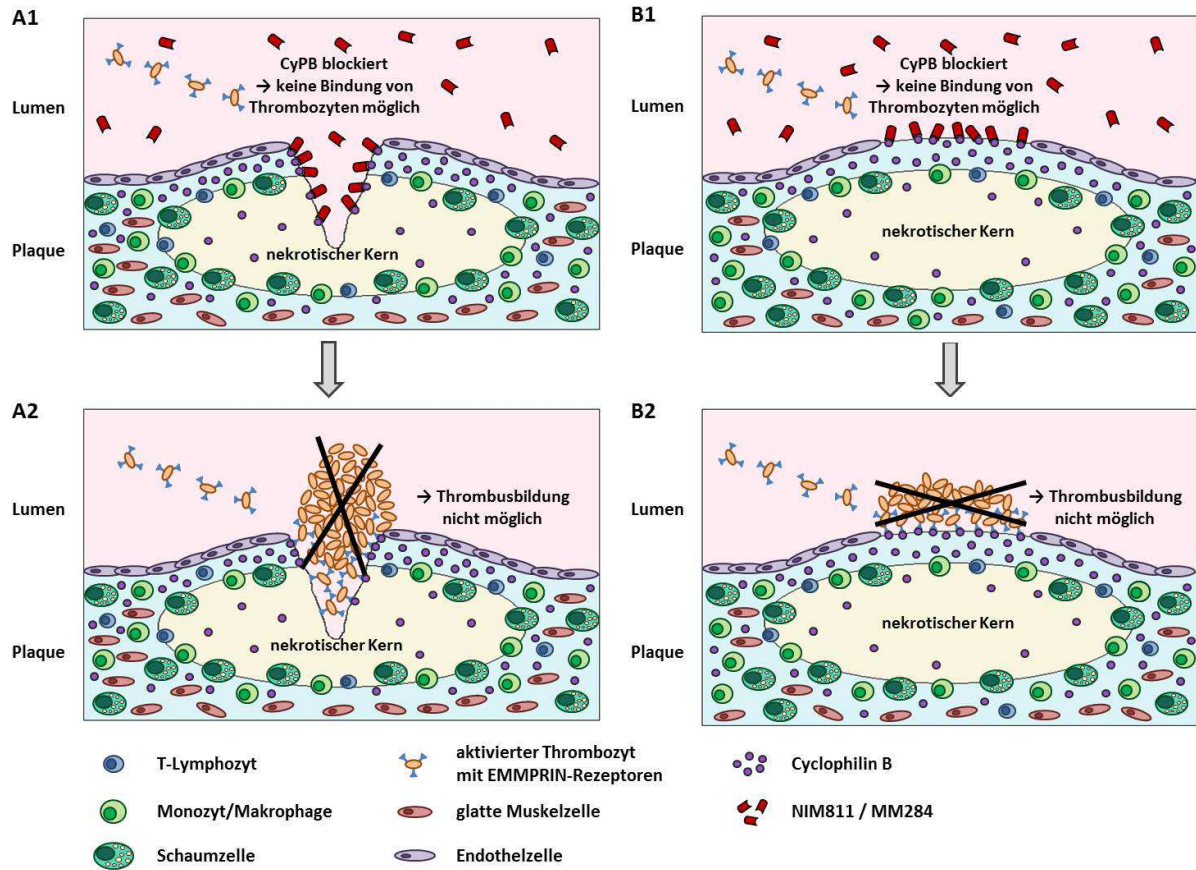


Abbildung 67: Darstellung einer hypothesierten therapeutischen Wirkung von NIM811 bzw. MM284: Durch Blockade des nach Plaque-ruptur (A1) oder -erosion (B1) oberflächlich in der Plaque exprimierten CyPB wird eine mögliche CyPB-vermittelte Thrombusbildung verhindert (A2 und B2)

3 Schlussfolgerung

CyPA und CyPB spielen eine wichtige Rolle bei einer breiten Palette von entzündlichen Erkrankungen wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis,²⁹³ bei septischen Zuständen,²⁹⁷ unterschiedlichen Viruserkrankungen^{248,258,299,484} oder Asthma.²⁹⁸

Während in diversen Untersuchungen eine Beteiligung von CyPA bei der Entstehung der Atherosklerose und beim akuten Myokardinfarkt belegt werden konnte, ist die Rolle von CyPB in Bezug auf diese Krankheitsbilder bisher noch unklar. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnte die Bedeutung von CyPB für die Atherosklerose genauer charakterisiert werden.

CyPB wird in der atherosklerotischen Plaque exprimiert. Außerdem konnte CyPB im Zytoplasma und im Zellkern von Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen, sowie auf der Oberfläche thrombinstimulierter Thrombozyten nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um Zelltypen, die maßgeblich an der Entstehung und der Weiterentwicklung atherosklerotischer Veränderungen beteiligt sind. Dies lässt die Spekulation zu, dass CyPB ebenso wie CyPA einen Einfluss auf die Atherogenese nehmen könnte. Dabei legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Vermutung nahe, dass CyPB über seine Wirkungen auf Thrombozyten und Monozyten sowohl die Progression der Atherosklerose fördern könnte als auch an der Destabilisierung der Plaque und der Entstehung von thrombotischen Ereignissen beteiligt sein könnte.

Der Einsatz von Cyclosporin A-Derivaten steht seit einiger Zeit als möglicher Therapieansatz zur Beeinflussung entzündlicher Erkrankungen, die mit der Migration von Leukozyten einhergehen, im Zentrum des Forschungsinteresses.³³⁷ Die vorliegenden Versuche zeigen, dass durch die Cyclosporin A-Derivate NIM811 und MM284 ebenfalls deutliche Effekte auf das Adhäsionsverhalten von Blutplättchen erzielt werden können. So konnte die adhäsionssteigernde Wirkung von CyPB auf Thrombozyten im Flusskammer-Modell durch beide Cyclosporin A-Derivate signifikant reduziert werden.

Thrombozyten sind nicht nur für die fatalen Komplikationen der Atherosklerose, die mit der Entstehung von Thromben einhergehen, verantwortlich, sie spielen im Rahmen der Atherosklerose auch eine bedeutende Rolle als Entzündungszellen, die die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen fördern, indem sie andere Entzündungszellen anlocken und als „Brückenglied“ fungieren, um deren Einwanderung zu begünstigen.

Über inhibierende Wirkung der beiden Cyclosporin A-Derivate auf die CyPB-vermittelte Thrombozytenadhäsion könnte möglicherweise auch *in vivo* Einfluss auf die Atherogenese genommen werden. So besteht die Möglichkeit, dass durch eine reduzierte Thrombozytenadhäsion am Endothel oder der geschädigten Gefäßwand sowohl die Progression der Atherosklerose in einem frühen Stadium verlangsamt oder sogar unterbunden werden kann, als auch die Entstehung fataler Thrombosen verhindert, beziehungsweise deren Ausmaß verringert werden kann.

Auch die CyPB-vermittelte proteolytische Aktivität von Monozyten könnte durch den Einsatz von Cyclosporin A-Derivaten möglicherweise reduziert werden. Auf diese Weise könnte die Destabilisierung der fibrösen Kappe der Plaque verhindert und somit das Risiko für eine Plaqueruptur reduziert werden.

V DISKUSSION

Die durch die Ergebnisse der vorliegenden Versuche initiierten und in den Abbildungen 59 und 63 bis 66 dargestellten Hypothesen bezüglich des Einflusses von CyPB auf die unterschiedlichen Atherosklerosestadien sind naheliegend. Ihre Richtigkeit sollte in künftigen Versuchen jedoch noch bestätigt werden.

Hierbei sollte insbesondere geklärt werden, welche Rolle CD147 (EMMPRIN) bzw. andere Rezeptoren für die Wirkung von CyPB auf Monozyten und Thrombozyten einnehmen. Dieses Wissen eröffnet die Möglichkeit, die CyPB-vermittelten Effekte zu beeinflussen und so neue Behandlungsstrategien zu entwickeln mit denen Einfluss auf die verschiedenen Stadien der Atherogenese genommen werden kann.

Da auch die neuartige Generation von Cyclophilin-Inhibitoren als mögliche Therapeutika im Rahmen entzündlicher Erkrankungen in Betracht gezogen werden und über sie möglicherweise Einfluss auf den Verlauf der Atherogenese genommen werden kann, sollte der Einfluss von NIM811 und MM284 auf die Zelltypen, die an der Atherogenese beteiligt sind, näher untersucht werden, und die in dieser Arbeit formulierten Hypothesen über Einfluss der beiden Cyclosporin-A-Derivate bei der Plaqueerosion und -ruptur in weiteren Versuchen überprüft werden.

VI Zusammenfassung

**Zur Rolle von Cyclophilin B in der Pathogenese der Atherosklerose:
Eine experimentelle Untersuchung zu seiner Expression in murinen atherosklerotischen
Plaques, zu seiner Wirkung auf das Migrationsverhalten von Monozyten und deren
Matrix Metalloproteinasen-Aktivität, auf das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten
sowie auf das Migrationsverhalten von Leukozyten**

Obwohl die durch die koronare Herzkrankheit ausgelöste Mortalitätsrate beim Menschen in den letzten Jahrzehnten deutlich zurückgegangen ist, steigt die Morbidität für diese Erkrankung noch immer kontinuierlich an. Die Hauptursache für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit liegt nahezu immer in atherosklerotischen Veränderungen der Koronargefäße. Da Thrombozyten im Rahmen der Atherogenese auch als Entzündungszellen fungieren können, rücken sie immer mehr ins Zentrum des Forschungsinteresses. Darüber hinaus sind sie für die Entstehung thrombotischer Komplikationen wie dem akuten Myokardinfarkt verantwortlich. Auch Monozyten und die daraus entstehenden Makrophagen und Schaumzellen spielen bei der Entwicklung der Atherosklerose eine Schlüsselrolle, indem sie die entzündlichen Prozesse in der Gefäßwand durch Sekretion von Entzündungsmediatoren und proteolytischen Enzymen vorantreiben. Ein wichtiges Anliegen der heutigen Forschung zur Pathogenese der Atherosklerose besteht deshalb darin die Funktionen dieser Zellen sowie deren Mediatoren möglichst umfassend darzustellen.

Vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob CyPB als proinflammatorischer Mediator eine wichtige Funktion bei der Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen spielt.

So konnte mit Hilfe der Immunhistochemie in dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen werden, dass CyPB in der atherosklerotischen Plaque verstärkt exprimiert wird. Außerdem konnte CyPB mit Hilfe der Immunfluoreszenz in und auf Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen sowie mittels Durchflussszytometrie auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten nachgewiesen werden.

Es lag deshalb nahe, den Einfluss von CyPB auf die oben genannten Zellarten weiter zu untersuchen. So wurde der Einfluss von CyPB auf das Migrationsverhalten von Monozyten mit Hilfe einer modifizierten Boyden-Kammer *in vitro* untersucht. Dabei zeigte sich, dass CyPB keine chemotaktische Wirkung gegenüber Monozyten ausübt. In einem zusätzlichen Tierversuch, bei dem die Migration von Leukozyten durch die Auslösung einer sterilen Peritonitis untersucht wurde, konnte die fehlende chemotaktische Wirkung von CyPB nochmals verifiziert werden. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu Befunden, bei denen eine chemotaktische Wirkung von CyPB auf humane T-Lymphozyten sowie neutrophile Granulozyten nachgewiesen wurden.^{296,302}

Der Einfluss von CyPB auf die durch Monozyten vermittelte proteolytische Aktivität in der Plaque wurde mit Hilfe der SDS-Gelatine-Zymographie untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Sekretion der MMP-9 durch CyPB (Konzentration: 200nM) um ca. 40% gesteigert werden konnte.

Aufgrund der in dieser Arbeit nachgewiesenen deutlichen Expression von CyPB in der atherosklerotischen Plaque, wurden zunächst die Interaktionen von immobilisiertem CyPB mit aktivierten Thrombozyten im Flusskammermodell untersucht. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass sowohl das *rolling* als auch die feste Adhäsion aktivierter Thrombozyten auf immobilisiertem

VI ZUSAMMENFASSUNG

CyPB (Konzentration: 200nM) gegenüber der Negativkontrolle signifikant gesteigert werden konnte (*rolling*: um 470%, feste Adhäsion: um 200% gesteigert). Da CyPA ebenso wie CyPB verstärkt in der atherosklerotischen Plaque exprimiert wird, lag es nahe auch die Interaktionen von CyPA (Konzentration: 200nM) mit aktivierten Thrombozyten zu untersuchen. Auch hierfür konnte ähnlich zum CyPB eine Steigerung des *rollings* (um ca. 410%) und der festen Adhäsion der aktivierten Thrombozyten (um etwa 190%) gegenüber der Negativkontrolle festgestellt werden.

Nachdem in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden konnte, dass CyPB in der Lage ist, Thrombozyten zu stimulieren und ihre Adhäsion (*rolling* und feste Adhäsion) auf Kollagen und Endothelzellen auszulösen, lag es nahe, in vorliegender Arbeit die Inhibierung der CyPB-Wirkungen zu untersuchen. Dies war insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung von möglichen neuartigen Therapeutika zur Unterdrückung thrombotischer Komplikationen infolge atherosklerotischer Veränderungen von besonderem Interesse. Hierzu wurde der rein extrazellulär wirksame Cyclophilin-Inhibitor MM284 und der sowohl intra- als auch extrazellulär wirksame Cyclophilin-Inhibitor NIM811 in ihrem Einfluss auf das Adhäsionsverhalten CyPB-stimulierter Thrombozyten getestet und verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Einsatz sowohl von NIM811 als auch von MM284 zu einer signifikanten Reduktion des *rollings* und der festen Adhäsion von CyPB-stimulierten Thrombozyten führt. So konnte auf Kollagen das *rolling* durch NIM811 um etwa 58% vermindert werden und die feste Adhäsion um etwa 60%. Im Vergleich dazu konnte das *rolling* auf Kollagen durch MM284 um 70% reduziert werden und die feste Adhäsion um etwa 73%. Auch auf Endothelzellen konnte der inhibierende Effekt der beiden Substanzen auf das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten beobachtet werden. So führte NIM811 zu einer um ca. 40% reduzierten Rate rollender Thrombozyten. Deren feste Adhäsion wurde um 35% vermindert. MM284 führte zu einer Reduktion rollender Zellen von 48% und fest adhärenter Zellen von ca. 45%.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass CyPB mit großer Wahrscheinlichkeit eine Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Veränderungen spielt. Jedoch ist seine Funktion in diesem Zusammenhang noch nicht ausreichend detailliert untersucht. Es müsste noch näher charakterisiert werden, welche Funktionen es während der verschiedenen Atherosklerosestadien ausübt, über welche Rezeptoren seine Wirkung vermittelt wird und welche Mediatoren zu seiner Freisetzung führen.

Auch in Bezug auf die Inhibierung der CyPB-Wirkungen bei Thrombozyten durch die beiden nicht immunsuppressiven Cyclosporin A-Analoga NIM811 und MM284 sind noch viele Fragen offen. Um den therapeutischen Einsatz dieser Stoffe für die Behandlung der Atherosklerose empfehlen zu können, sind ebenfalls noch weitere Versuche vonnöten, insbesondere um gewünschte und unerwünschte Effekte bei der Anwendung der beiden Substanzen sowie deren Effizienz genauer beurteilen zu können.

VII Summary

**About the role of Cyclophilin B in the pathogenesis of atherosclerosis:
an experimental study on its expression in murine atherosclerotic plaques, its effects on
the migration of monocytes and their expression of matrix metalloproteinases, the
adhesive properties of platelets as well as the migration of leukocytes**

Although mortality rates from coronary heart disease in the western countries have declined in the last few decades morbidity caused by this disease is increasing. Coronary heart disease is almost always caused by atherosclerosis. Because platelets can act as inflammatory cells in atherogenesis, they have become more and more subject to scientific research. In addition, they are responsible for the development of thrombotic complications. Furthermore, monocytes as well as macrophages and foam cells that subsequently develop out of monocytes play a key role in the development of atherosclerosis as they promote the inflammatory processes in the arterial wall by secretion of inflammatory mediators and proteolytic enzymes. Because of this it is a fundamental concern of modern research to better understand the functions of the different mediators involved in the pathogenesis of atherosclerosis.

The main objective of this study was to find out if CyPB plays a role as proinflammatory mediator in the development of atherosclerotic lesions.

We could proof for the first time by means of immunohistochemistry that CyPB is expressed in atherosclerotic plaques. Immunofluorescence stainings revealed that CyPB is expressed in monocytes, macrophages and foam cells. In flow cytometric analysis we could show that CyPB is expressed on the surface of activated platelets.

Based on these findings we further analyzed the effects of CyPB on these cells. We investigated the influence of CyPB on the migration of monocytes *in vitro* by using a modified Boyden-chamber. We observed that CyPB has no chemotactic effect on this cell type. In an additional animal experiment investigating the effects of CyPB on the migratory properties of leukocytes by inducing a sterile peritonitis, the lacking chemotactic effect of CyPB could be confirmed once again. These results however, are contradictionary to results in which a chemotactic effect of CyPB on human T-lymphocytes as well as granulocytes could be detected.^{296,302}

The influence of CyPB on the proteolytic activity in the atherosclerotic plaque, mediated by monocytes, was analyzed by means of SDS-gelatin-zymography. Thereby we could show that the CyPB-mediated secretion of MMP-9 (concentration of CyPB: 200nM) in monocytes was increased by 40%.

Furthermore, the Influence of CyPB on the function of platelets was a focus of our research. Because of the considerable expression of CyPB in atherosclerotic plaque proven in this study we investigated the interactions of immobilized CyPB and activated platelets. Thereby we could show that both, rolling and firm adhesion of activated platelets on immobilized CyPB (concentration: 200nM), could significantly be enhanced compared to negative control (enhancement of rolling by 470%, enhancement of firm adhesion by 200%). Additionally, we investigated the interactions of CyPA (concentration: 200nM) with activated platelets as a comparison. The results showed

VII SUMMARY

comparable values to that of CyPB, with an increase of rolling cells by 410% and an increase of adherent cells by 190%.

After we had shown in preliminary studies of our working group that CyPB activates platelets and triggers their adhesion (rolling and firm adhesion) to collagen and endothelial cells, one aim of this study was to examine the inhibition of CyPB mediated effects. This is of particular importance for the development of new therapeutic approaches to suppress thrombotic complications resulting from atherosclerotic lesions. For this purpose we tested and compared the influence of two types of cyclophilin-inhibitors: the novel and merely extracellular active Cyclosporin A-derivative MM284 and the extracellular as well as intracellular active Cyclosporin A-derivative NIM811.

Thereby we could show that both derivatives significantly reduced rolling and firm adhesion of CyPB-stimulated platelets. On collagen NIM811 reduced the amount of rolling cells by about 58% and the amount of firmly adherent cells by about 60%. Compared to that, MM284 reduced the amount of rolling cells on collagen by about 70% and that of firmly adherent cells by about 73%. The inhibiting effect of both derivatives on the adhesional properties of platelets could also be verified on endothelial cells. In this case, NIM811 reduced the amount of rolling cells by about 40% and the amount of firmly adherent cells by about 35%. MM284 reduced the amount of rolling cells on endothelial cells by about 48% and that of firmly adherent cells by about 45%.

The present study shows that CyPB is in all probability involved in atherosclerotic processes. However, its role in this regard has not sufficiently been analyzed in detail yet. Further studies will be necessary to better characterize its role in the different stages of atherosclerosis, and to determine which receptors mediate its functions, and which compounds lead to its release.

The inhibitory effects of the two non-immunosuppressive Cyclosporin A-derivatives regarding the effects of CyPB are only insufficiently clarified. However, further studies will be required to be able to recommend the use of these substances in therapy of atherosclerosis. In particular, it is important to research the desired and adverse effects of these substances and their range of efficiency.

VIII Literaturverzeichnis

- 1 **Meens, M.J., Pfenninger, A., Kwak, B.R. (2012)** Risky communication in atherosclerosis and thrombus formation. *Swiss Med Wkly*, 142, w13553.
- 2 **World Health Organisation (2012)** Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen im Jahr 2012 weltweit. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> (Version vom 17.08.2015, 09:12Uhr).
- 3 **statistisches Bundesamt (2013)** <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html> (Version vom 17.08.2015, 08:32Uhr).
- 4 **Lusis, A.J. (2000)** Atherosclerosis. *Nature*, 407(6801), 233-41.
- 5 **Skjõt-Arkil, H., Barascuk, N., Register, T., Karsdal, M.A. (2010)** Macrophage-mediated proteolytic remodeling of the extracellular matrix in atherosclerosis results in neoepitopes: a potential new class of biochemical markers. *Assay Drug Dev Technol*, 8(5), 542-52.
- 6 **Bohorquez, F., Stout, C. (1972)** Aortic atherosclerosis in exotic animals. *Atherosclerosis*. 16(2), 225-31.
- 7 **Dahme, E., Weiss, E. (1999)** Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. *Enke-Verlag, Stuttgart, 1999, Auflage 5*, 34.
- 8 **Van Fleet, J.F., Ferrans, V.J. (2009)** Herz und Kreislaufsysteme; In: *Mc Gavin, D.M., Zachary, J.F. (2009) Pathologie der Haustiere: Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie. S. 523-570, Abb. 10.82 - S. 559, Abb. 10.83 - S. 560 & Abb. 14.85 - S. 840; Urban & Fischer Verlag, München, Auflage 1.*
- 9 **Ross, R. (1999)** Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340(2), 115-26.
- 10 **Libby, P., Okamoto, Y., Rocha, V.Z., Folco, E. (2010)** Inflammation in atherosclerosis: Transition from theory to practice. *Circ J*, 74(2), 213-20.
- 11 **Woollard, K. J., Geissmann, F. (2010)** Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*, 7(2), 77-86.
- 12 **Yu, X.H., Fu, Y.C., Zhang, D.W., Yin, K., Tang, C.K. (2013)** Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, 424, 245-52.
- 13 **Gawaz, M. (2006)** Platelets in the onset of atherosclerosis. *Blood Cells Mol Dis*, 36(2), 206-10.
- 14 **Von Hundelshausen, P., Weber, C. (2007)** Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res*, 100(1), 27-40.
- 15 **Morrell, C.N., Aggrey, A.A., Chapman, L.M., Modjeski, K.L. (2014)** Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood*, 123(18), 2759-67.
- 16 **Fuster, V., Badimon, J.J., Chesebro, J.H. (1998)** Atherothrombosis: mechanisms and clinical therapeutic approaches. *Vasc Med*, 3(3), 231-9.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- 17 Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W. Jr., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W. (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 92(5), 1355-74.
- 18 Constantinides, P. (1966) Plaque fissures in human coronary thrombosis. *J Atheroscler Res*, 1966, 6, 1-17.
- 19 Falk, E. (1983) Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi. *Br Heart J*, 50(2), 127-34.
- 20 Davies, M.J., Thomas, A.C. (1985) Plaque fissuring--the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J*, 53(4), 363-73.
- 21 Falk, E., Shah, P.K., Fuster, V. (1995) Coronary plaque disruption. *Circulation*, 92(3), 657-71.
- 22 Hansson, G.K. (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 352(16), 1685-95.
- 23 Brown, D.L., Hibbs, M.S., Kearney, M., Loushin, C., Isner, J.M. (1995) Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation*, 91(8), 2125-31.
- 24 Shah, P.K. (1998) Role of inflammation and metalloproteinases in plaque disruption and thrombosis. *Vasc Med*, 3(3), 199-206.
- 25 Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Kränzhöfer, R., Clark, S., Libby, P. (1995) Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(2), 402-6.
- 26 Sarén, P., Welgus, H.G., Kovanen, P.T. (1996) TNF- α and IL-1 β selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol*, 157(9), 4159-65.
- 27 Gawaz, M. (1999) Das Blutplättchen. Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung. *Thieme Verlag, Stuttgart, Auflage 1*, S1-41.
- 28 statistisches Bundesamt (2013) https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2014/11/PD14_421_232.html (Version vom 17.08.2015, 08:39Uhr).
- 29 statistisches Bundesamt (2013) <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Sterbefaellnsgesamt.html> (Version vom 17.08.2015, 08:45Uhr).
- 30 Nigro, P., Pompilio, G., Capogrossi, M.C. (2013) Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis*, 4, e888.
- 31 Zhang, T., Zhang, J., Ge, H. (2013) Functions of Cyclophilin A in Atherosclerosis. *Exp Clin Cardiol*, 18(2), e118-e124.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- 32 Seizer, P., Gawaz, M., May, A.E. (2014) Cyclophilin A and EMMPRIN (CD147) in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*, 102(1), 17-23.
- 33 Mikol, V., Kallen, J., Walkinshaw, M.D. (1994) X-ray structure of a cyclophilin B/cyclosporin complex: comparison with cyclophilin A and delineation of its calcineurin-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91(11), 5183-6.
- 34 Wang, P., Heitman, J. (2005) The cyclophilins. *Genome Biol*, 6(7), 226.
- 35 Naoumov, N.V. (2014) Cyclophilin inhibition as potential therapy for liver diseases. *J Hepatol*, 61(5), 1166-74.
- 36 Marchand, F. (1904) Über Arteriosklerose. *Verhandlungen des Kongresses für Innere Medizin. 21. Kongress, Leipzig 1904*, 23-59.
- 37 Stary, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W. Jr., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W. (1994) A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb*, 14(5), 840-56.
- 38 Stary, H.C. (2000) Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(5), 1177-8.
- 39 Zebrack, J.S., Anderson, J.L. (2002) Role of inflammation in cardiovascular disease: how to use C-reactive protein in clinical practice. *Prog Cardiovasc Nurs*, 17(4), 174-85.
- 40 Kreuzer, J., Tiefenbacher, C. (2003) Atherosklerose: Taschenatlas spezial. *Thieme Verlag, Stuttgart*.
- 41 Santerre, R.F., Thomas, N.W., Smith, S.C., Brannigan, D. (1972) Spontaneous atherosclerosis in Pigeons. *Am J Pathol*. 67(1), 1-10.
- 42 Orita, S., Masegi, T., Itou, K., Kawada, M., Yanai, T., Ueda, K. (1994) Spontaneous aortic atherosclerosis in layer chickens. *J Comp Pathol*. 110(4), 341-7.
- 43 Gedigk, P., Totovic, V. (1990) Zell- und Gewebsschäden. In: Eder, M., Gedigk, P. (1990) *Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie*. S. 44, 33. Ausgabe, Springer Verlag Berlin.
- 44 Davignon, J., Ganz, P. (2004) Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, 109 (23 Suppl 1), III27-32.
- 45 Stary, H.C., Blankenhorn, D.H., Chandler, A.B., Glagov, S., Insull, W. Jr., Richardson, M., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., et al. (1992) A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 85(1), 391-405.
- 46 Gimbrone, M.A. Jr., Nagel, T., Topper, J.N. (1997) Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest*, 99(8), 1809-13.
- 47 Gimbrone, M.A. Jr. (1999) Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol*, 155(1), 1-5.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- 48 **Camejo, G., Fager, G., Rosengren, B., Hurt-Camejo, E., Bondjers, G. (1993)** Binding of low density lipoproteins by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 268(19), 14131-7.
- 49 **Fuster V. (1994)** Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation*, 90(4), 2126-46.
- 50 **Libby, P. (2002)** Atherosclerosis: the new view. *Sci Am*, 286(5), 46-55.
- 51 **Zhang, T., Zhang, J., Ge, H. (2013)** Functions of Cyclophilin A in Atherosclerosis. *Exp Clin Cardiol*, 18(2), e118-e124.
- 52 **Glass, C.K., Witztum, J.L. (2001)** Atherosclerosis: the road ahead. *Cell*, 104(4), 503-16.
- 53 **Mestas, J., Ley, K. (2008)** Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 18(6), 228-32.
- 54 **Zernecke A, Weber C. (2005)** Inflammatory mediators in atherosclerotic vascular disease. *Basic Res Cardiol*, 100(2), 93-101.
- 55 **Libby, P. (2006)** Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr*, 83(2), 456S-460S.
- 56 **Falk, E. (2006)** Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 47(8 Suppl), C7-12.
- 57 **Moore, K.J., Tabas, I. (2011)** Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*, 145(3), 341-55.
- 58 **Dong, Z.M., Chapman, S.M., Brown, A.A., Frenette, P.S., Hynes, R.O., Wagner, D.D. (1998)** The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*, 102(1), 145-52.
- 59 **Blankenberg, S., Barbaux, S., Tiret, L. (2003)** Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 170(2), 191-203.
- 60 **Cybulsky, M.I., Gimbrone, M.A. Jr. (1991)** Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, 251(4995), 788-91.
- 61 **Poston, R.N., Haskard, D.O., Coucher, J.R., Gall, N.P., Johnson-Tidey, R.R. (1992)** Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*, 140(3), 665-73.
- 62 **Nagel, T., Resnick, N., Atkinson, W.J., Dewey, C.F. Jr., Gimbrone, M.A. Jr. (1994)** Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*, 94(2), 885-91.
- 63 **Frenette, P.S., Wagner, D.D. (1996)** Adhesion molecules-Part 1. *N Engl J Med*, 334(23), 1526-9.
- 64 **Li, H., Cybulsky, M.I., Gimbrone, M.A. Jr., Libby, P. (1993)** An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb*, 13(2), 197-204.
- 65 **Kamei, M., Carman, C.V. (2010)** New observations on the trafficking and diapedesis of monocytes. *Curr Opin Hematol*, 17(1), 43-52.

- 66 **Rollins, B.J., Yoshimura, T., Leonard, E.J., Pober, J.S. (1990)** Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol*, 136(6), 1229-33.
- 67 **Clinton, S.K., Underwood, R., Hayes, L., Sherman, M.L., Kufe, D.W., Libby, P. (1992)** Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol*, 140(2), 301-16.
- 68 **Libby, P. (2003)** Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am J Cardiol*, 91(3A), 3A-6A.
- 69 **Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., Witztum, J.L. (1989)** Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, 320(14), 915-24.
- 70 **Johnson, J.L., Newby, A.C. (2009)** Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol*, 20, 370–378.
- 71 **Kunjathoor, V.V., Febbraio, M., Podrez, E.A., Moore, K.J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J.S., Silverstein, R., Hoff, H.F., Freeman, M.W. (2010)** Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem*, 277(51), 49982-8.
- 72 **Maxfield, F.R., Tabas I. (2005)** Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*, 438(7068), 612-21.
- 73 **Libby, P., Ridker, P.M., Hansson, G.K. (2011)** Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473(7347), 317-25.
- 74 **Ferns, G.A., Raines, E.W., Sprugel, K.H., Motani, A.S., Reidy, M.A., Ross, R. (1991)** Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science*, 253(5024), 1129-32.
- 75 **Jovinge, S., Hultgårdh-Nilsson, A., Regnström, J., Nilsson, J. (1997)** Tumor necrosis factor-alpha activates smooth muscle cell migration in culture and is expressed in the balloon-injured rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(3), 490-7.
- 76 **Newby, A.C., Zaltsman, A.B. (1999)** Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res*, 41(2), 345-60.
- 77 **Doran, A.C., Meller, N., McNamara, C.A. (2008)** Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(5), 812-9.
- 78 **Frink, R.J. (2002)** Inflammatory Atherosclerosis: Characteristics of the Injurious Agent. *Heart Research Foundation, Sacramento (CA), Auflage 1, p.2-4.*
- 79 **Ross, R., Glomset, J.A. (1973)** Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*, 180(4093), 1332-9.
- 80 **Ross, R. (1995)** Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*, 57, 791-804.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- 81 **Bentzon, J.F., Otsuka, F., Virmani, R., Falk, E. (2014)** Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*, 114(12), 1852-66.
- 82 **Faggiotto, A., Ross, R. (1984)** Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis*, 4(4), 341-56.
- 83 **van der Wal, A.C., Becker, A.E. (1998)** Atherosclerotic plaque rupture--pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovasc Res*, 41(2), 334-44.
- 84 **Davies, M.J. (1996)** Stability and Instability: Two Faces of Coronary Atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation*, 94(8), 2013-20.
- 85 **Libby, P. (1995)** Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*, 91(11), 2844-50.
- 86 **Mach, F., Schönbeck, U., Bonnefoy, J.Y., Poher, J.S., Libby, P. (1997)** Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation*, 96(2), 396-9.
- 87 **Badimon, J.J., Lettino, M., Toschi, V., Fuster, V., Berrozpe, M., Chesebro, J.H., Badimon, L. (1999)** Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation*, 99(14), 1780-7.
- 88 **Rudijanto, A. (2007)** The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones*, 39(2), 86-93.
- 89 **Ambrose, J.A., Tannenbaum, M.A., Alexopoulos, D., Hjerdahl-Monsen, C.E., Leavy, J., Weiss, M., Borrico, S., Gorlin, R., Fuster, V. (1988)** Angiographic progression of coronary artery disease and the development of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 12(1), 56-62.
- 90 **Libby, P. (2002b)** Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420(6917), 868-74.
- 91 **Libby, P. (2009)** Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Lipid Res*, 50 Suppl, 352-7.
- 92 **Farb, A., Burke, A.P., Tang, A.L., Liang, T.Y., Mannan, P., Smialek, J., Virmani, R. (1996)** Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation*, 93(7), 1354-63.
- 93 **Libby, P. (2000)** Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med*, 247(3), 349-58.
- 94 **Davies, M.J., Richardson, P.D., Woolf, N., Katz, D.R., Mann, J. (1993)** Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J*, 69(5), 377-81.
- 95 **Burleigh, M.C., Briggs, A.D., Lendon, C.L., Davies, M.J., Born, G.V., Richardson, P.D. (1992)** Collagen types I and III, collagen content, GAGs and mechanical strength of human atherosclerotic plaque caps: span-wise variations. *Atherosclerosis*, 96(1), 71-81.
- 96 **Cheng, G.C., Loree, H.M., Kamm, R.D., Fishbein, M.C., Lee, R.T. (1993)** Distribution of circumferential stress in ruptured and stable atherosclerotic lesions. A structural analysis with histopathological correlation. *Circulation*, 87(4), 1179-87.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- 97 Kovanen, P.T., Kaartinen, M., Paavonen, T. (1995) Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation*, 92(5), 1084-8.
- 98 Rekhter, M.D. (1995) Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc Res*, 41(2), 376-84.
- 99 Amento, E.P., Ehsani, N., Palmer, H., Libby, P. (1991) Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*, 11(5), 1223-30.
- 100 Libby, P. (2008) The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Intern Med*, 263(5), 517-27.
- 101 Libby, P., Theroux, P. (2005) Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*, 111(25), 3481-8.
- 102 Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J.J., Chesebro, J.H. (1992) The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med*, 326(4), 242-50.
- 103 Klopffleisch, R., Gruber, A.D. (2015) Kreislauforgane. In: Baumgärtner, W., Gruber, A.D. (2015) *Spezielle Pathologie für die Tiermedizin*. S. 163, Enke-Verlag Stuttgart, 1. Auflage.
- 104 Beaufrère, H., Ammersbach, M., Reavill, D.R., Garner, M.M., Heatley, J.J., Wakamatsu, N., Nevarez, J.G., Tully, T.N. (2013) Prevalence of and risk factors associated with atherosclerosis in psittacine birds. *J Am Vet Med Assoc*, 242(12), 1696-704.
- 105 Bavelaar, F.J., Beynen, A.C. (2004) Atherosclerosis in parrots. A review. *Vet Q*, 26(2), 50-60.
- 106 Hess, R.S., Kass, P.H., Van Winkle, T.J. (2003) Association between diabetes mellitus, hypothyroidism or hyperadrenocorticism, and atherosclerosis in dogs. *J Vet Intern Med*, 17(4), 489-94.
- 107 Liu, S.K., Tilley, L.P., Tappe, J.P., Fox, P.R. (1986) Clinical and pathologic findings in dogs with atherosclerosis: 21 cases (1970-1983). *J Am Vet Med Assoc*, 189(2), 227-32.
- 108 Sostaric-Zuckermann, I.C., Borel, N., Kaiser, C., Grabarevic, Z., Pospischil, A. (2011) Chlamydia in canine or feline coronary arteriosclerotic lesions. *BMC Res Notes*, 4, 350.
- 109 Varki, N., Anderson, D., Herndon, J.G., Pham, T., Gregg, C.J., Cheriyan, M., Murphy, J., Strobert, E., Fritz, J., Else, J.G., Varki, A. (2009) Heart disease is common in humans and chimpanzees, but is caused by different pathological processes. *Evol Appl*, 2(1), 101-12.
- 110 Baitchman, E.J., Calle, P.P., Clippinger, T.L., Deem, S.L., James, S.B., Raphael, B.L., Cook, R.A. (2006) Preliminary evaluation of blood lipid profiles in captive western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). *J Zoo Wildl Med*, 37(2), 126-9.
- 111 Nistor, A., Bulla, A., Filip, D.A., Radu, A. (1987) The hyperlipidemic hamster as a model of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 68, 159-173.
- 112 Anderson, J.L., Smith, S.C., Taylor, R.L. Jr. (2014) The pigeon (*Columba livia*) model of spontaneous atherosclerosis. *Poult Sci*, 93(11), 2691-9.

- 113 **Taghavi-Moghadam, P.L., Butcher, M.J., Galkina, E.V. (2014)** The dynamic lives of macrophage and dendritic cell subsets in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1319, 19-37.
- 114 **Davies, M.J., Woolf, N., Rowles, P.M., Pepper, J. (1988)** Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br Heart J*, 60, 459-64.
- 115 **Rezzani, R., Favero, G., Stacchiotti, A., Rodella, L.F. (2013)** Endothelial and vascular smooth muscle cell dysfunction mediated by cyclophilin A and the atheroprotective effects of melatonin. *Life Sci*, 92(17-19), 875-82.
- 116 **Imhof, B.A., Aurrand-Lions, M. (2004)** Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol*, 4, 432-444.
- 117 **Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S. (2007)** Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7, 678-689.
- 118 **Rader, D.J., Daugherty, A. (2008)** Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature*, 451(7181), 904-13.
- 119 **Ghattas, A., Griffiths, H.R., Devitt, A., Lip, G.Y., Shantsila, E. (2013)** Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis: where are we now? *J Am Coll Cardiol*, 62(17), 1541-51.
- 120 **Takahashi, K., Takeya, M., Sakashita, N. (2002)** Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Med Electron Microsc*, 35(4), 179-203.
- 121 **Libby, P., Simon, D.I. (2001)** Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation*, 103(13), 1718-20.
- 122 **Ruggeri, Z.M. (2002)** Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*, 8(11), 1227-34.
- 123 **Gawaz, M. (2001)** Blood Platelets: Physiology, Pathophysiology, Membrane Receptors, Antiplatelet Principles, and Therapy for Atherothrombotic Diseases. *Thieme Verlag, Stuttgart, Auflage 1*, 1-10.
- 124 **May, A.E., Seizer, P., Gawaz, M. (2008)** Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(3), 5-10.
- 125 **May, A.E., Langer, H., Seizer, P., Bigalke, B., Lindemann, S., Gawaz, M. (2007)** Platelet-leukocyte interactions in inflammation and atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost*, 33(2), 123-7.
- 126 **Gawaz, M., Langer, H., May, A.E. (2005)** Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*, 115(12), 3378-84.
- 127 **Gawaz, M. (2001)** Blood Platelets: Physiology, Pathophysiology, Membrane Receptors, Antiplatelet Principles, and Therapy for Atherothrombotic Diseases. *Thieme Verlag, Stuttgart, Auflage 1*, 1-10.
- 128 **Lindemann, S., Tolley, N.D., Dixon, D.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Weyrich, A.S. (2001)** Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol*, 154(3), 485-90.
- 129 **Weber, C. (2005)** Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res*, 96(6), 612-6.

- 130 **Morgenstern, E. (1995)** The formation of compound granules from different types of secretory organelles in human platelets (dense granules and alpha-granules). A cryofixation/-substitution study using serial sections. *Eur J Cell Biol*, 68, 183-90.
- 130b **Platelet Research Laboratory, Barcelona, Spanien (2016)** http://www.platelet-research.org/1/function_hemo.htm (Version vom 02.09.2015, 14:29Uhr)
- 131 **Kasirer-Friede, A., Ware, J., Leng, L., Marchese, P., Ruggeri, Z.M., Shattil, S.J. (2002)** Lateral clustering of platelet GP Ib-IX complexes leads to up-regulation of the adhesive function of integrin alpha IIb beta 3. *J Biol Chem*, 277(14), 11949-56.
- 132 **Arya, M., López, J.A., Romo, G.M., Cruz, M.A., Kasirer-Friede, A., Shattil, S.J., Anvari, B. (2003)** Glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin alpha(IIb)beta(3): effects of receptor clustering and von Willebrand factor adhesion. *J Thromb Haemost*, 1(6), 1150-7.
- 133 **Nieswandt, B., Watson, S.P. (2003)** Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*, 102(2), 449-61.
- 134 **Kahn, M.L. (2004)** Platelet-collagen responses: molecular basis and therapeutic promise. *Semin Thromb Hemost*, 30(4), 419-25.
- 135 **Linden, M.D., Jackson, D.E. (2010)** Platelets: pleiotropic roles in atherogenesis and atherothrombosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(11), 1762-6.
- 136 **Bombeli, T., Schwartz, B.R., Harlan, J.M. (1998)** Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), $\alpha_v\beta_3$ integrin, and GPIb α . *J Exp Med*, 187(3), 329-39.
- 137 **Frenette, P.S., Moyna, C., Hartwell, D.W., Lowe, J.B., Hynes, R.O., Wagner, D.D. (1998)** Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood*, 91(4), 1318-24.
- 138 **Subramaniam, M., Frenette, P.S., Saffaripour, S., Johnson, R.C., Hynes, R.O., Wagner, D.D. (1996)** Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice. *Blood*, 87(4), 1238-42.
- 139 **Laszik, Z., Jansen, P.J., Cummings, R.D., Tedder, T.F., McEver, R.P., Moore, K.L. (1996)** P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood*, 88(8), 3010-21.
- 140 **Romo, G.M., Dong, J.F., Schade, A.J., Gardiner, E.E., Kansas, G.S., Li, C.Q., McIntire, L.V., Berndt, M.C., López, J.A. (1999)** The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med*, 190(6), 803-14.
- 141 **Frenette, P.S., Denis, C.V., Weiss, L., Jurk, K., Subbarao, S., Kehrel, B., Hartwig, J.H., Vestweber, D., Wagner, D.D. (2000)** P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med*, 191(8), 1413-22.
- 142 **Gawaz, M., Neumann, F.J., Dickfeld, T., Reininger, A., Adelsberger, H., Gebhardt, A., Schömig, A. (1997)** Vitronectin receptor ($\alpha_v\beta_3$) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation*, 96(6), 1809-18.

- 143 Schönberger, T., Ziegler, M., Borst, O., Konrad, I., Nieswandt, B., Massberg, S., Ochmann, C., Jürgens, T., Seizer, P., Langer, H., Münch, G., Ungerer, M., Preissner, K.T., Elvers, M., Gawaz, M. (2012) The dimeric platelet collagen receptor GPVI-Fc reduces platelet adhesion to activated endothelium and preserves myocardial function after transient ischemia in mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, 303(7), C757-66.
- 144 Zanetti, A., Conforti, G., Hess, S., Martin-Padura, I., Ghibaudi, E., Preissner, K.T., Dejana, E. (1994) Clustering of vitronectin and RGD peptides on microspheres leads to engagement of integrins on the luminal aspect of endothelial cell membrane. *Blood*, 84(4), 1116-23.
- 145 Kanse, S.M., Kost, C., Wilhelm, O.G., Andreasen, P.A., Preissner, K.T. (1996) The urokinase receptor is a major vitronectin-binding protein on endothelial cells. *Exp Cell Res*, 224(2), 344-53.
- 146 Hatley, M.E., Srinivasan, S., Reilly, K.B., Bolick, D.T., Hedrick, C.C. (2003) Increased production of 12/15 lipoxygenase eicosanoids accelerates monocyte/endothelial interactions in diabetic db/db mice. *J Biol Chem*, 278(28), 25369-75.
- 147 Evangelista, V., Manarini, S., Sideri, R., Rotondo, S., Martelli, N., Piccoli, A., Totani, L., Piccardoni, P., Vestweber, D., de Gaetano, G., Cerletti, C. (1999) Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood*, 93(3), 876-85.
- 148 Yang, J., Furie, B.C., Furie, B. (1999) The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost*, 81(1), 1-7.
- 149 Altieri, D.C., Bader, R., Mannucci, P.M., Edgington, T.S. (1988) Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. *J Cell Biol*, 107(5), 1893-900.
- 150 Wright, S.D., Weitz, J.I., Huang, A.J., Levin, S.M., Silverstein, S.C., Loike, J.D. (1988) Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(20), 7734-8.
- 151 Diacovo, T.G., deFougerolles, A.R., Bainton, D.F., Springer, T.A. (1994) A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest*, 94(3), 1243-51.
- 152 Simon, D.I., Chen, Z., Xu, H., Li, C.Q., Dong, J.f., McIntire, L.V., Ballantyne, C.M., Zhang, L., Furman, M.I., Berndt, M.C., López, J.A. (2000) Platelet glycoprotein Ib α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med*, 192(2), 193-204.
- 153 Santoso, S., Sachs, U.J., Kroll, H., Linder, M., Ruf, A., Preissner, K.T., Chavakis, T. (2002) The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med*, 196(5), 679-91.
- 154 Chavakis, T., Santoso, S., Clemetson, K.J., Sachs, U.J., Isordia-Salas, I., Pixley, R.A., Nawroth, P.P., Colman, R.W., Preissner, K.T. (2003) High molecular weight kininogen regulates platelet-leukocyte interactions by bridging Mac-1 and glycoprotein Ib. *J Biol Chem*, 278(46), 45375-81.

- 155 Gawaz, M., Brand, K., Dickfeld, T., Pogatsa-Murray, G., Page, S., Bogner, C., Koch, W., Schömig, A., Neumann, F. (2000) Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis*, 148(1), 75-85.
- 156 Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., Charo, I.F. (1998) Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, 394(6696), 894-7.
- 157 Lu, B., Rutledge, B.J., Gu, L., Fiorillo, J., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L., North, R., Gerard, C., Rollins, B.J. (1998) Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med*, 187(4), 601-8.
- 158 Henn, V., Slupsky, J.R., Gräfe, M., Anagnostopoulos, I., Förster, R., Müller-Berghaus, G., Kroczeck, R.A. (1998) CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 391(6667), 591-4.
- 159 Slupsky, J.R., Kalbas, M., Willuweit, A., Henn, V., Kroczeck, R.A., Müller-Berghaus, G. (1998) Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb Haemost*, 80(6), 1008-14.
- 160 Dollery, C.M., McEwan, J.R., Henney, A.M. (1995) Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*, 77(5), 863-8.
- 161 Galis, Z.S., Khatry, J.J. (2002) Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*, 90(3), 251-62.
- 162 Birkedal-Hansen, H. (1995) Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol*, 7(5), 728-35.
- 163 Visse, R., Nagase, H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92(8), 827-39.
- 164 Nagase, H., Woessner, J.F. Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, 274(31), 21491-4.
- 165 Sternlicht, M.D., Werb, Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 463-516.
- 166 Stöcker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Rüth, F.X., McKay, D.B., Bode, W. (1995) The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralsins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci*, 4(5), 823-40.
- 167 Creemers, E.E., Cleutjens, J.P., Smits, J.F., Daemen, M.J. (2001) Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res*, 89(3), 201-10.
- 168 Murphy, G., Nguyen, Q., Cockett, M.I., Atkinson, S.J., Allan, J.A., Knight, C.G., Willenbrock, F., Docherty, A.J. (1994) Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J Biol Chem*, 269(9), 6632-6.

- 169 Shipley, J.M., Doyle, G.A., Fliszar, C.J., Ye, Q.Z., Johnson, L.L., Shapiro, S.D., Welgus, H.G., Senior, R.M. (1996) The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of the fibronectin type II-like repeats. *J Biol Chem*, 271(8), 4335-41.
- 170 Clark, I.M., Cawston, T.E. (1989) Fragments of human fibroblast collagenase. Purification and characterization. *Biochem J*, 263(1), 201-6.
- 171 Murphy, G., Knäuper, V. (1997) Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol*, 15(8-9), 511-8.
- 172 Knäuper, V., Docherty, A.J., Smith, B., Tschesche, H., Murphy, G. (1997) Analysis of the contribution of the hinge region of human neutrophil collagenase (HNC, MMP-8) to stability and collagenolytic activity by alanine scanning mutagenesis. *FEBS Lett*, 405(1), 60-4.
- 173 Westermarck, J., Kähäri, V.M. (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*, 13(8), 781-92.
- 174 Lamparter, S., Maisch, B. (2000) Bedeutung von Matrix Metalloproteinasen bei kardiovaskulären Erkrankungen. *Z Kardiol*, 89(10), 949-57.
- 175 Galis, Z.S., Muszynski, M., Sukhova, G.K., Simon-Morrissey, E., Unemori, E.N., Lark, M.W., Amento, E., Libby, P. (1994) Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res*, 75(1), 181-9.
- 176 Romanic, A.M., Madri, J.A. (1994) The induction of 72-kD gelatinase in T cells upon adhesion to endothelial cells is VCAM-1 dependent. *J Cell Biol*, 125(5), 1165-78.
- 177 Amorino, G.P., Hoover, R.L. (1998) Interactions of monocytic cells with human endothelial cells stimulate monocytic metalloproteinase production. *Am J Pathol*, 152(1), 199-207.
- 178 Bendeck, M.P., Zempo, N., Clowes, A.W., Galardy, R.E., Reidy, M.A. (1994) Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res*, 75(3), 539-45.
- 179 May, A.E., Kälsch, T., Massberg, S., Herouy, Y., Schmidt, R., Gawaz, M. (2002) Engagement of glycoprotein IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation*, 106(16), 2111-7.
- 180 Galt, S.W., Lindemann, S., Medd, D., Allen, L.L., Kraiss, L.W., Harris, E.S., Prescott, S.M., McIntyre, T.M., Weyrich, A.S., Zimmerman, G.A. (2001) Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 by monocytes adherent to collagen and platelets. *Circ Res*, 89(6), 509-16.
- 181 Wesley, R.B. II., Meng, X., Godin, D., Galis, Z.S. (1998) Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(3), 432-40.
- 182 Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Lark, M.W., Libby, P. (1994) Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 94(6), 2493-503.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- 183 Momiyama, Y., Ohmori, R., Tanaka, N., Kato, R., Taniguchi, H., Adachi, T., Nakamura, H., Ohsuzu, F. (2010) High plasma levels of matrix metalloproteinase-8 in patients with unstable angina. *Atherosclerosis*, 209(1), 206-10.
- 184 Xu, X.P., Meisel, S.R., Ong, J.M., Kaul, S., Cercek, B., Rajavashisth, T.B., Sharifi, B., Shah, P.K. (1999) Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*, 99(8), 993-8.
- 185 Galis, Z.S., Asanuma, K., Godin, D., Meng, X. (1998) N-acetyl-cysteine decreases the matrix-degrading capacity of macrophage-derived foam cells: new target for antioxidant therapy? *Circulation*, 97(24), 2445-53.
- 186 Kai, H., Ikeda, H., Yasukawa, H., Kai, M., Seki, Y., Kuwahara, F., Ueno, T., Sugi, K., Imaizumi, T. (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.
- 187 Rajavashisth, T.B., Xu, X.P., Jovinge, S., Meisel, S., Xu, X.O., Chai, N.N., Fishbein, M.C., Kaul, S., Cercek, B., Sharifi, B., Shah, P.K. (1999) Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation*, 99(24), 3103-9.
- 188 Rajagopalan, S., Meng, X.P., Ramasamy, S., Harrison, D.G., Galis, Z.S. (1996) Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest*, 98(11), 2572-9.
- 189 Lee, R.T., Schoen, F.J., Loree, H.M., Lark, M.W., Libby, P. (1996) Circumferential stress and matrix metalloproteinase 1 in human coronary atherosclerosis. Implications for plaque rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16(8), 1070-3.
- 190 Chesler, N.C., Ku, D.N., Galis, Z.S. (1999) Transmural pressure induces matrix-degrading activity in porcine arteries ex vivo. *Am J Physiol*, 277(5 Pt 2), H2002-9.
- 191 Aikawa, M., Rabkin, E., Okada, Y., Voglic, S.J., Clinton, S.K., Brinckerhoff, C.E., Sukhova, G.K., Libby, P. (1998) Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation*, 97(24), 2433-44.
- 192 Pfeffer, M.A., Braunwald, E., Moyé, L.A., Basta, L., Brown, E.J. Jr., Cuddy, T.E., Davis, B.R., Geltman, E.M., Goldman, S., Flaker, G.C., Klein, M., Lamas, G.A., Packer, M., Rouleau, J., Rouleau, J.L., Rutherford, J., Wertheimer, J.H., Hawkins, M. (1992) Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med*, 327(10), 669-77.
- 193 The SOLVD Investigators (1992) Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. *N Engl J Med*, 327(10), 685-91.
- 194 Anonymous (1994) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*, 344(8934), 1383-9.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- 195 Shepherd, J., Cobbe, S.M., Ford, I., Isles, C.G., Lorimer, A.R., MacFarlane, P.W., McKillop, J.H., Packard, C.J. (1995) Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*, 333(20), 1301-7.
- 196 Sacks, F.M., Pfeffer, M.A., Moye, L.A., Rouleau, J.L., Rutherford, J.D., Cole, T.G., Brown, L., Warnica, J.W., Arnold, J.M., Wun, C.C., Davis, B.R., Braunwald, E. (1996) The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med*, 335(14), 1001-9.
- 197 Stephens, N.G., Parsons, A., Schofield, P.M., Kelly, F., Cheeseman, K., Mitchinson, M.J. (1996) Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*, 347(9004), 781-6.
- 198 Downs, J.R., Clearfield, M., Weis, S., Whitney, E., Shapiro, D.R., Beere, P.A., Langendorfer, A., Stein, E.A., Kruyer, W., Gotto, A.M. Jr. (1998) Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA*, 279(20), 1615-22.
- 199 Biswas, C. (1982) Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 109(3), 1026-34.
- 200 Ellis, S.M., Nabeshima, K., Biswas, C. (1989) Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor. *Cancer Res*, 49(12), 3385-91.
- 201 Kataoka, H., DeCastro, R., Zucker, S., Biswas, C. (1993) Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Res*, 53(13), 3154-8.
- 202 Prescott, J., Troccoli, N., Biswas, C. (1989) Coordinate increase in collagenase mRNA and enzyme levels in human fibroblasts treated with the tumor cell factor, TCSF. *Biochem Int*, 19(2), 257-66.
- 203 Guo, H., Zucker, S., Gordon, M.K., Toole, B.P., Biswas, C. (1997) Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 272(1), 24-7.
- 204 Biswas, C., Zhang, Y., DeCastro, R., Guo, H., Nakamura, T., Kataoka, H., Nabeshima, K. (1995) The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res*, 55(2), 434-9.
- 205 Sameshima, T., Nabeshima, K., Toole, B.P., Yokogami, K., Okada, Y., Goya, T., Kono, M., Wakisaka, S. (2000) Glioma cell extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) (CD147) stimulates production of membrane-type matrix metalloproteinases and activated gelatinase A in co-cultures with brain-derived fibroblasts. *Cancer Lett*, 157(2), 177-84.
- 206 Kanekura, T., Chen, X., Kanzaki, T. (2002) Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int J Cancer*, 99(4), 520-8.
- 207 Yang, J.M., Xu, Z., Wu, H., Zhu, H., Wu, X., Hait, W.N. (2003) Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells. *Mol Cancer Res*, 1(6), 420-7.

- 208 Tang, Y., Kesavan, P., Nakada, M.T., Yan, L. (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.
- 209 Schmidt, R., Bültmann, A., Ungerer, M., Joghetaei, N., Bülbül, O., Thieme, S., Chavakis, T., Toole, B.P., Gawaz, M., Schömig, A., May, A.E. (2006) Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction. *Circulation*, 113(6), 834-41.
- 210 Iacono, K.T., Brown, A.L., Greene, M.I., Saouaf, S.J. (2007) CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp Mol Pathol*, 83(3), 283-95.
- 211 Riethdorf, S., Reimers, N., Assmann, V., Kornfeld, J.W., Terracciano, L., Sauter, G., Pantel, K. (2006) High incidence of EMMPRIN expression in human tumors. *Int J Cancer*, 119(8), 1800-10.
- 212 Fossum, S., Mallett, S., Barclay, A.N. (1991) The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence. *Eur J Immunol*, 21(3), 671-9.
- 213 DeCastro, R., Zhang, Y., Guo, H., Kataoka, H., Gordon, M.K., Toole, Bp., Biswas, G. (1996) Human keratinocytes express EMMPRIN, an extracellular matrix metalloproteinase inducer. *J Invest Dermatol*, 106(6), 1260-5.
- 214 Nehme, C.L., Fayos, B.E., Bartles, J.R. (1995) Distribution of the integral plasma membrane glycoprotein CE9 (MRC OX-47) among rat tissues and its induction by diverse stimuli of metabolic activation. *Biochem J*, 310(Pt 2), 693-8.
- 215 Noguchi, Y., Sato, T., Hirata, M., Hara, T., Ohama, K., Ito, A. (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), 6063-72.
- 216 Haug, C., Lenz, C., Díaz, F., Bachem, M.G. (2004) Oxidized low-density lipoproteins stimulate extracellular matrix metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) release by coronary smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(10), 1823-9.
- 217 Kasinrerker, W., Fiebiger, E., Stefanová, I., Baumruker, T., Knapp, W., Stockinger, H. (1992) Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule. *J Immunol*, 149(3), 847-54.
- 218 Yurchenko, V., Constant, S., Eisenmesser, E., Bukrinsky, M. (2010) Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics. *Clin Exp Immunol*, 160(3), 305-17.
- 219 Igakura, T., Kadomatsu, K., Taguchi, O., Muramatsu, H., Kaname, T., Miyauchi, T., Yamamura, K., Arimura, K., Muramatsu, T. (1996) Roles of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, in behavior as to an irritating odor, lymphocyte response, and blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun*, 224(1), 33-6.
- 220 Naruhashi, K., Kadomatsu, K., Igakura, T., Fan, Q.W., Kuno, N., Muramatsu, H., Miyauchi, T., Hasegawa, T., Itoh, A., Muramatsu, T., Nabeshima, T. (1997) Abnormalities of sensory and memory functions in mice lacking Bsg gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 236(3), 733-7.

- 221 Igakura, T., Kadomatsu, K., Kaname, T., Muramatsu, H., Fan, Q.W., Miyauchi, T., Toyama, Y., Kuno, N., Yuasa, S., Takahashi, M., Senda, T., Taguchi, O., Yamamura, K., Arimura, K., Muramatsu, T. (1998) A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis. *Dev Biol*, 194(2), 152-65.
- 222 Kuno, N., Kadomatsu, K., Fan, Q.W., Hagihara, M., Senda, T., Mizutani, S., Muramatsu, T. (1998) Female sterility in mice lacking the basigin gene, which encodes a transmembrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily. *FEBS Lett*, 425(2), 191-4.
- 223 Muramatsu, T., Miyauchi, T. (2003) Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol*, 18(3), 981-7.
- 224 Zhou, S., Zhou, H., Walian, P.J., Jap, B.K. (2005) CD147 is a regulatory subunit of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease amyloid beta-peptide production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(21), 7499-504.
- 225 Sun, J., Hemler, M.E. (2001) Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res*, 61(5), 2276-81.
- 226 Konttinen, Y.T., Li, T.F., Mandelin, J., Liljeström, M., Sorsa, T., Santavirta, S., Virtanen, I. (2000) Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*, 43(2), 275-80.
- 227 Li, Y.Y., McTiernan, C.F., Feldman, A.M. (2000) Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res*, 46(2), 214-24.
- 228 Spinale, F.G., Coker, M.L., Heung, L.J., Bond, B.R., Gunasinghe, H.R., Etoh, T., Goldberg, A.T., Zellner, J.L., Crumley, A.J. (2000) A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation*, 102(16), 1944-9.
- 229 Pushkarsky, T., Zybarth, G., Dubrovsky, L., Yurchenko, V., Tang, H., Guo, H., Toole, B., Sherry, B., Bukrinsky, M. (2001) CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(11), 6360-5.
- 230 Liang, L., Major, T., Bocan, T. (2002) Characterization of the promoter of human extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN). *Gene*, 282(1-2), 75-86.
- 231 Tomita, T., Nakase, T., Kaneko, M., Shi, K., Takahi, K., Ochi, T., Yoshikawa, H. (2002) Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 46(2), 373-8.
- 232 Zhu, P., Ding, J., Zhou, J., Dong, W.J., Fan, C.M., Chen, Z.N. (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), R1023-33.
- 233 Nabeshima, K., Iwasaki, H., Koga, K., Hojo, H., Suzumiya, J., Kikuchi, M. (2006) Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathol Int*, 56(7), 359-67.

- 234 **Miyauchi, T., Masuzawa, Y., Muramatsu, T. (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), 770-4.
- 235 **Altruda, F., Cervella, P., Gaeta, M.L., Daniele, A., Giancotti, F., Tarone, G., Stefanuto, G., Silengo, L. (1989)** Cloning of cDNA for a novel mouse membrane glycoprotein (gp42): shared identity to histocompatibility antigens, immunoglobulins and neural-cell adhesion molecules. *Gene*, 85(2), 445-51.
- 236 **Miyauchi, T., Kanekura, T., Yamaoka, A., Ozawa, M., Miyazawa, S., Muramatsu, T. (1990)** Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the beta-chain of major histocompatibility complex class II antigen. *J Biochem*, 107(2), 316-23.
- 237 **Kanekura, T., Miyauchi, T., Tashiro, M., Muramatsu, T. (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.
- 238 **Fan, Q.W., Kadomatsu, K., Uchimura, K., Muramatsu, T. (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), 277-86.
- 239 **Heller, M., von der Ohe, M., Kleene, R., Mohajeri, M.H., Schachner, M. (2003)** The immunoglobulin-superfamily molecule basigin is a binding protein for oligomannosidic carbohydrates: an anti-idiotypic approach. *J Neurochem*, 84(3), 557-65.
- 240 **Yan, L., Zucker, S., Toole, B.P. (2005)** Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. *Thromb Haemost*, 93(2), 199-204.
- 241 **Kaname, T., Miyauchi, T., Kuwano, A., Matsuda, Y., Muramatsu, T., Kajii, T. (1993)** Mapping basigin (BSG), a member of the immunoglobulin superfamily, to 19p13.3. *Cytogenet Cell Genet*, 64(3-4), 195-7.
- 242 **Davis, T.L., Walker, J.R., Campagna-Slater, V., Finerty, P.J., Paramanathan, R., Bernstein, G., MacKenzie, F., Tempel, W., Ouyang, H., Lee, W.H., Eisenmesser, E.Z., Dhe-Paganon, S. (2010)** Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. *PLoS Biol*, 8(7), e1000439.
- 243 **Arevalo-Rodriguez, M., Wu, X., Hanes, S.D., Heitman, J. (2004)** Prolyl isomerases in yeast. *Front Biosci*, 9, 2420-46.
- 244 **Galat, A. (2003)** Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity--targets--functions. *Curr Top Med Chem*, 3(12), 1315-47.
- 245 **He, Z., Li, L., Luan, S. (2004)** Immunophilins and parvulins. Superfamily of peptidyl prolyl isomerases in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 134(4), 1248-67.
- 246 **Bukrinsky, M.I. (2002)** Cyclophilins: unexpected messengers in intercellular communications. *Trends Immunol*, 23(7), 323-5.

- 247 Allain, F., Boutillon, C., Mariller, C., Spik, G. (1995) Selective assay for CyPA and CyPB in human blood using highly specific anti-peptide antibodies. *J Immunol Methods*, 178(1), 113-20.
- 248 Endrich, M.M., Gehring, H. (1998) The V3 loop of human immunodeficiency virus type-1 envelope protein is a high-affinity ligand for immunophilins present in human blood. *Eur J Biochem*, 252(3), 441-6.
- 249 Göthel, S.F., Marahiel, M.A. (1999) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci*, 55(3), 423-36.
- 250 Swanson, S.K., Born, T., Zydowsky, L.D., Cho, H., Chang, H.Y., Walsh, C.T., Rusnak, F. (1992) Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(9), 3741-5.
- 251 Galat, A. (1993) Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem*, 216(3), 689-707.
- 252 Ke, H.M., Zydowsky, L.D., Liu, J., Walsh, C.T. (1991) Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin A at 2.5 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(21), 9483-7.
- 253a Kallen, J., Spitzfaden, C., Zurini, M.G., Wider, G., Widmer, H., Wüthrich, K., Walkinshaw, M.D. (1991) Structure of human cyclophilin and its binding site for cyclosporin A determined by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Nature*, 353(6341), 276-9.
- 253b Kozlov, G., Bastos-Aristizabal, S., Määtänen, P., Rosenauer, A., Zheng, F., Killikelly, A., Trempe, J.F., Thomas, D.Y., Gehring, K. (2010) Structural basis of cyclophilin B binding by the calnexin/calreticulin P-domain. *J Biol Chem*, 285(46), 35551-7.
- 254 Price, E.R., Zydowsky, L.D., Jin, M.J., Baker, C.H., McKeon, F.D., Walsh, C.T. (1991) Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(5), 1903-7.
- 255 Price, E.R., Jin, M., Lim, D., Pati, S., Walsh, C.T., McKeon, F.D. (1994) Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(9), 3931-5.
- 256 Arber, S., Krause, K.H., Caroni, P. (1992) s-cyclophilin is retained intracellularly via a unique COOH-terminal sequence and colocalizes with the calcium storage protein calreticulin. *J Cell Biol*, 116(1), 113-25.
- 257 Le Hir, M., Su, Q., Weber, L., Woerly, G., Granelli-Piperno, A., Ryffel, B. (1995) In situ detection of cyclosporin A: evidence for nuclear localization of cyclosporine and cyclophilins. *Lab Invest*, 73(5), 727-33.
- 258 Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y., Shimotohno, K. (2005) Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell*, 19(1), 111-22.
- 259 Ryszczyn, M.A., Clevenger, C.V. (2000) Role of cyclophilins in somatolactogenic action. *Ann N Y Acad Sci*, 917, 514-21.

- 260 **Anderson, S.K., Gallinger, S., Roder, J., Frey, J., Young, H.A., Ortaldo, J.R. (1993)** A cyclophilin-related protein involved in the function of natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(2), 542-6.
- 261 **Rinfret, A., Collins, C., Ménard, R., Anderson, S.K. (1994)** The N-terminal cyclophilin-homologous domain of a 150-kilodalton tumor recognition molecule exhibits both peptidylprolyl cis-trans-isomerase and chaperone activities. *Biochemistry*, 33(7), 1668-73.
- 262 **Connern, C.P., Halestrap, A.P. (1992)** Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. *Biochem J*, 284, 381-5.
- 263 **Hamilton, G.S., Steiner, J.P. (1998)** Immunophilins: beyond immunosuppression. *J Med Chem*, 41(26), 5119-43.
- 264 **Andreeva, L., Heads, R., Green, C.J. (1999)** Cyclophilins and their possible role in the stress response. *Int J Exp Pathol*, 80(6), 305-15.
- 265 **Mi, H., Kops, O., Zimmermann, E., Jäschke, A., Tropschug, M. (1996)** A nuclear RNA-binding cyclophilin in human T cells. *FEBS Lett*, 398(2-3), 201-5.
- 266 **Fruman, D.A., Burakoff, S.J., Bierer, B.E. (1994)** Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB J*, 8(6), 391-400.
- 267 **Fearon, P., Lonsdale-Eccles, A.A., Ross, O.K., Todd, C., Sinha, A., Allain, F., Reynolds, N.J. (2011)** Keratinocyte secretion of cyclophilin B via the constitutive pathway is regulated through its cyclosporin-binding site. *J Invest Dermatol*, 131(5), 1085-94.
- 268 **Liu, J., Farmer, J.D. Jr., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S.L. (1991)** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, 66(4), 807-15.
- 269 **O'Keefe, S.J., Tamura, J., Kincaid, R.L., Tocci, M.J., O'Neill, E.A. (1992)** FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature*, 357(6380), 692-4.
- 270 **Nelson, D., Cox, M., Held, A. (2005)** Lehninger Biochemie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 3. Auflage, S. 174
- 271 **Takahashi, N., Hayano, T., Suzuki, M. (1989)** Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*, 337(6206), 473-5.
- 272 **Fischer, G., Bang, H., Mech, C. (1984)** Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed Biochim Acta*, 43(10), 1101-11.
- 273 **Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., Schmid, F.X. (1989)** Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*, 337(6206), 476-8.
- 274 **Spik, G., Haendler, B., Delmas, O., Mariller, C., Chamoux, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., Stedman, K., Kocher, H.P., Keller, R., Hiestand, P.C., Movva, N.R. (1991)** A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP). *J Biol Chem*, 266(17), 10735-8.
- 275 **Duina, A.A., Chang, H.C., Marsh, J.A., Lindquist, S., Gaber, R.F. (1996)** A cyclophilin function in Hsp90-dependent signal transduction. *Science*, 274(5293), 1713-5.

- 276 Braaten, D., Luban, J. (2001) Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *EMBO J*, 20(6), 1300-9.
- 277 Meunier, L., Usherwood, Y.K., Chung, K.T., Hendershot, L.M. (2002) A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell*, 13(12), 4456-69.
- 278 Waldmeier, P.C., Zimmermann, K., Qian, T., Tintelnot-Blomley, M., Lemasters, J.J. (2003) Cyclophilin D as a drug target. *Curr Med Chem*, 10(16), 1485-506.
- 279 Machida, K., Ohta, Y., Osada, H. (2006) Suppression of apoptosis by cyclophilin D via stabilization of hexokinase II mitochondrial binding in cancer cells. *J Biol Chem*, 281(20), 14314-20.
- 280 Sokolskaja E., Berthoux L, Luban J. (2006) Cyclophilin A and TRIM5alpha independently regulate human immunodeficiency virus type 1 infectivity in human cells. *J Virol*, 80(6), 2855-62.
- 281 Kim, J., Choi, T.G., Ding, Y., Kim, Y., Ha, K.S., Lee, K.H., Kang, I., Ha, J., Kaufman, R.J., Lee, J., Choe, W., Kim, S.S. (2008) Overexpressed cyclophilin B suppresses apoptosis associated with ROS and Ca²⁺ homeostasis after ER stress. *J Cell Sci*, 121(Pt 21), 3636-48.
- 282 Choi, J.W., Sutor, S.L., Lindquist, L., Evans, G.L., Madden, B.J., Bergen, H.R. 3rd, Hefferan, T.E., Yaszemski, M.J., Bram, R.J. (2009) Severe osteogenesis imperfecta in cyclophilin B-deficient mice. *PLoS Genet*, 5(12), e1000750.
- 283 Tryon, R.C., White, S.D., Bannasch, D.L. (2007) Homozygosity mapping approach identifies a missense mutation in equine cyclophilin B (PPIB) associated with HERDA in the American Quarter Horse. *Genomics*, 90(1), 93-102.
- 284 Boudko, S.P., Ishikawa, Y., Lerch, T.F., Nix, J., Chapman, M.S., Bächinger, H.P. (2012) Crystal structures of wild-type and mutated cyclophilin B that causes hyperelastosis cutis in the American quarter horse. *BMC Res Notes*, 5, 626.
- 285 Ryszczyn, M.A., Clevenger, C.V. (2002) The intranuclear prolactin/cyclophilin B complex as a transcriptional inducer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(10), 6790-5.
- 286 Mariller, C., Allain, F., Kouach, M., Spik, G. (1996) Evidence that human milk isolated cyclophilin B corresponds to a truncated form. *Biochim Biophys Acta*, 1293(1), 31-8.
- 287 Hoffmann, H., Schiene-Fischer, C. (2014) Functional aspects of extracellular cyclophilins. *Biol Chem*, 395(7-8), 721-35.
- 288 Liao, D.F., Jin, Z.G., Baas, A.S., Daum, G., Gygi, S.P., Aebersold, R., Berk, B.C. (2000) Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 275(1), 189-96.
- 289 Lamoureux, F., Gastinel, L.N., Mestre, E., Marquet, P., Essig, M. (2012) Mapping cyclosporine-induced changes in protein secretion by renal cells using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). *J Proteomics*, 75(12), 3674-87.

- 290 Wilmes, A., Limonciel, A., Aschauer, L., Moenks, K., Bielow, C., Leonard, M.O., Hamon, J., Carpi, D., Ruzek, S., Handler, A., Schmal, O., Herrgen, K., Bellwon, P., Burek, C., Truisi, G.L., Hewitt, P., Di Consiglio, E., Testai, E., Blaauboer, B.J., Guillou, C., Huber, C.G., Lukas, A., Pfaller, W., Mueller, S.O., Bois, F.Y., Dekant, W., Jennings, P. (2013) Application of integrated transcriptomic, proteomic and metabolomic profiling for the delineation of mechanisms of drug induced cell stress. *J Proteomics*, 79, 180-94.
- 291 Lee, M.S., Zhu, Y.L., Sun, Z., Rhee, H., Jeromin, A., Roder, J., Dannies, P.S. (2000) Accumulation of synaptosomal-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) and other proteins associated with the secretory pathway in GH4C1 cells upon treatment with estradiol, insulin, and epidermal growth factor. *Endocrinology*, 141(9), 3485-92.
- 292 González-Cuadrado, S., Bustos, C., Ruiz-Ortega, M., Ortiz, A., Guijarro, C., Plaza, J.J., Egido, J. (1996) Expression of leucocyte chemoattractants by interstitial renal fibroblasts: up-regulation by drugs associated with interstitial fibrosis. *Clin Exp Immunol*, 106(3), 518-22.
- 293 De Ceuninck, F., Allain, F., Caliez, A., Spik, G., Vanhoutte, P.M. (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 Rheum*, 48(8), 2197-206.
- 294 Mauri, P., Scarpa, A., Nascimbeni, A.C., Benazzi, L., Parmagnani, E., Mafficini, A., Della Peruta, M., Bassi, C., Miyazaki, K., Sorio, C. (2005) Identification of proteins released by pancreatic cancer cells by multidimensional protein identification technology: a strategy for identification of novel cancer markers. *FASEB J*, 19(9), 1125-7.
- 295 Marcant, A., Denys, A., Melchior, A., Martinez, P., Deligny, A., Carpentier, M., Allain, F. (2012) Cyclophilin B attenuates the expression of TNF- α in lipopolysaccharide-stimulated macrophages through the induction of B cell lymphoma-3. *J Immunol*, 189(4), 2023-32.
- 296 Allain, F., Vanpouille, C., Carpentier, M., Slomianny, M.C., Durieux, S., Spik, G. (2002) Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5), 2714-9.
- 297 Tegeder, I., Schumacher, A., John, S., Geiger, H., Geisslinger, G., Bang, H., Brune, K. (1997) Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis. *J Clin Immunol*, 17(5), 380-6.
- 298 Stemmy, E.J., Benton, A.S., Lerner, J., Alcalá, S., Constant, S.L., Freishtat, R.J. (2011) Extracellular cyclophilin levels associate with parameters of asthma in phenotypic clusters. *J Asthma*, 48(10), 986-93.
- 299 Bienkowska-Haba, M., Patel, H.D., Sapp, M. (2009) Target cell cyclophilins facilitate human papillomavirus type 16 infection. *PLoS Pathog*, 5(7), e1000524.
- 300 Fang, F., Flegler, A.J., Du, P., Lin, S., Clevenger, C.V. (2009) Expression of cyclophilin B is associated with malignant progression and regulation of genes implicated in the pathogenesis of breast cancer. *Am J Pathol*, 174(1), 297-308.

- 301 Kim, K., Kim, H., Jeong, K., Jung, M.H., Hahn, B.S., Yoon, K.S., Jin, B.K., Jahng, G.H., Kang, I., Ha, J., Choe, W. (2012) Release of overexpressed CypB activates ERK signaling through CD147 binding for hepatoma cell resistance to oxidative stress. *Apoptosis*, 17(8), 784-96.
- 302 Yurchenko, V., O'Connor, M., Dai, W.W., Guo, H., Toole, B., Sherry, B., Bukrinsky, M. (2001) CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B. *Biochem Biophys Res Commun*, 288(4), 786-8.
- 303 Melchior, A., Denys, A., Deligny, A., Mazurier, J., Allain, F. (2008) Cyclophilin B induces integrin-mediated cell adhesion by a mechanism involving CD98-dependent activation of protein kinase C-delta and p44/42 mitogen-activated protein kinases. *Exp Cell Res*, 314(3), 616-28.
- 304 Marcant, A. (2011) Rôle de la cyclophiline B dans la regulation de l'activité de Macrophages. *Diss Science de la Vie et de la Santé, Université de Sciences et Technologies de Lille*.
- 305 Gwinn, W.M., Damsker, J.M., Falahati, R., Okwumabua, I., Kelly-Welch, A., Keegan, A.D., Vanpouille, C., Lee, J.J., Dent, L.A., Leitenberg, D., Bukrinsky, M.I., Constant, S.L. (2006) Novel approach to inhibit asthma-mediated lung inflammation using anti-CD147 intervention. *J Immunol*, 177(7), 4870-9.
- 306 Hanouille, X., Melchior, A., Sibille, N., Parent, B., Denys, A., Wieruszeski, J.M., Horvath, D., Allain, F., Lippens, G., Landrieu, I. (2007) Structural and functional characterization of the interaction between cyclophilin B and a heparin-derived oligosaccharide. *J Biol Chem*, 282(47), 34148-58.
- 307 Denys, A., Allain, F., Carpentier, M., Spik, G. (1998) Involvement of two classes of binding sites in the interactions of cyclophilin B with peripheral blood T-lymphocytes. *Biochem J*, 336 (Pt 3), 689-97.
- 308 Yurchenko, V., Zybarth, G., O'Connor, M., Dai, W.W., Franchin, G., Hao, T., Guo, H., Hung, H.C., Toole, B., Gallay, P., Sherry, B., Bukrinsky, M. (2002) Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J Biol Chem*, 277(25), 22959-65.
- 309 Pakula, R., Melchior, A., Denys, A., Vanpouille, C., Mazurier, J., Allain, F. (2007) Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis. *Glycobiology*, 17(5), 492-503.
- 310 Watanabe, A., Yoneda, M., Ikeda, F., Terao-Muto, Y., Sato, H., Kai, C. (2010) CD147/EMMPRIN acts as a functional entry receptor for measles virus on epithelial cells. *J Virol*, 84(9), 4183-93.
- 311 Major, T.C., Liang, L., Lu, X., Rosebury, W., Bocan, T.M. (2002) Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is induced upon monocyte differentiation and is expressed in human atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(7), 1200-7.
- 312 Coppinger, J.A., Cagney, G., Toomey, S., Kislinger, T., Belton, O., McRedmond, J.P., Cahill, D.J., Emili, A., Fitzgerald, D.J., Maguire, P.B. (2004) Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood*, 103(6), 2096-104.
- 313 Jin, Z.G., Lungu, A.O., Xie, L., Wang, M., Wong, C., Berk, B.C. (2004) Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(7), 1186-91.

- 314 Seizer, P., Schönberger, T., Schött, M., Lang, M.R., Langer, H.F., Bigalke, B., Krämer, B.F., Borst, O., Daub, K., Heidenreich, O., Schmidt, R., Lindemann, S., Herouy, Y., Gawaz, M., May, A.E. (2010) EMMPRIN and its ligand cyclophilin A regulate MT1-MMP, MMP-9 and M-CSF during foam cell formation. *Atherosclerosis*, 209(1), 51-7.
- 315 Nigro, P., Satoh, K., O'Dell, M.R., Soe, N.N., Cui, Z., Mohan, A., Abe, J., Alexis, J.D., Sparks, J.D., Berk, B.C. (2011) Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med*, 208(1), 53-66.
- 316 Schuster, K. (2012) Zur Wirkung von Cyclophilin A bei der Thrombozyten-Endothel Interaktion und bei ischämischen Kardiomyozyten. *Diss med vet, LMU München, Tierärztliche Fakultät*.
- 317 Zeuke, S., Ulmer, A.J., Kusumoto, S., Katus, H.A., Heine, H. (2002) TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc Res*, 56(1), 126-34.
- 318 Kim, S.H., Lessner, S.M., Sakurai, Y., Galis, Z.S. (2004) Cyclophilin A as a novel biphasic mediator of endothelial activation and dysfunction. *Am J Pathol*, 164(5), 1567-74.
- 319 Suzuki, J., Jin, Z.G., Meoli, D.F., Matoba, T., Berk, B.C. (2006) Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 98(6), 811-7.
- 320 Kondo, T., Hirose, M., Kageyama, K. (2009) Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 16(5), 532-8.
- 321 Satoh, K., Shimokawa, H., Berk, B.C. (2010) Cyclophilin A: Promising new target in cardiovascular therapy. *Circ J*, 74, 2249-56.
- 322 Langer, H.F., Chavakis, T. (2009) Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med*, 13(7), 1211-20.
- 323 Cybulsky, M.I., Iiyama, K., Li, H., Zhu, S., Chen, M., Iiyama, M., Davis, V., Gutierrez-Ramos, J.C., Connelly, P.W., Milstone, D.S. (2001) A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*, 107, 1255-1262.
- 324 Tedgui, A., Mallat, Z. (2006) Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*, 86(2), 515-81.
- 325 Sherry, B., Yarlett, N., Strupp, A., Cerami, A. (1992) Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(8), 3511-5.
- 326 Xu, Q., Leiva, M.C., Fischkoff, S.A., Handschumacher, R.E., Lyttle, C.R. (1992) Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J Biol Chem*, 267(17), 11968-71.
- 327 Arora, K., Gwinn, W.M., Bower, M.A., Watson, A., Okwumabua, I., MacDonald, H.R., Bukrinsky, M.I., Constant, S.L. (2005) Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *J Immunol*, 175(1), 517-22.
- 328 Damsker, J.M., Bukrinsky, M.I., Constant, S.L. (2007) Preferential chemotaxis of activated human CD4+ T cells by extracellular cyclophilin A. *J Leukoc Biol*, 82(3), 613-8.

- 329 Pan, H., Luo, C., Li, R., Qiao, A., Zhang, L., Mines, M., Nyanda, A.M., Zhang, J., Fan, G.H. (2008) Cyclophilin A is required for CXCR4-mediated nuclear export of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2, activation and nuclear translocation of ERK1/2, and chemotactic cell migration. *J Biol Chem*, 283(1), 623-37.
- 330 Sánchez-Tillo, E., Wojciechowska, M., Comalada, M., Farrera, C., Lloberas, J., Celada, A. (2006) Cyclophilin A is required for M-CSF-dependent macrophage proliferation. *Eur J Immunol*, 36(9), 2515-24
- 331 Vukovic, I., Arsenijevic, N., Lackovic, V., Todorovic, V. (2006) The origin and differentiation potential of smooth muscle cells in coronary atherosclerosis. *Exp Clin Cardiol*, 11, 123-8.
- 332 Kim, J.Y., Kim, W.J., Kim, H., Suk, K., Lee, W.H. (2009) The Stimulation of CD147 Induces MMP-9 Expression through ERK and NF-kappaB in Macrophages: Implication for Atherosclerosis. *Immune Netw*, 9(3), 90-7.
- 333 Kim, H., Kim, W.J., Jeon, S.T., Koh, E.M., Cha, H.S., Ahn, K.S., Lee, W.H. (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), 217-24.
- 334 Yuan, W., Ge, H., He, B. (2010) Pro-inflammatory activities induced by CyPA-EMMPRIN interaction in monocytes. *Atherosclerosis*, 213(2), 415-21.
- 335 Satoh, K., Matoba, T., Suzuki, J., O'Dell, M.R., Nigro, P., Cui, Z., Mohan, A., Pan, S., Li, L., Jin, Z.G., Yan, C., Abe, J., Berk, B.C. (2008) Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*, 117(24), 3088-98.
- 336 Seizer, P., Ungern-Sternberg, S.N., Schönberger, T., Borst, O., Münzer, P., Schmidt, E.M., Mack, A.F., Heinzmann, D., Chatterjee, M., Langer, H., Malešević, M., Lang, F., Gawaz, M., Fischer, G., May, A.E. (2015) Extracellular cyclophilin A activates platelets via EMMPRIN (CD147) and PI3K/Akt signaling, which promotes platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35(3), 655-63.
- 337 Malesevic, M., Gutknecht, D., Prell, E., Klein, C., Schumann, M., Nowak, R.A., Simon, J.C., Schiene-Fischer, C., Saalbach, A. (2013) Anti-inflammatory effects of extracellular cyclosporins are exclusively mediated by CD147. *J Med Chem*, 56(18), 7302-11.
- 338 Frey, H.-H., Löscher, W. (2002) Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Enke-Verlag, Stuttgart, 2. Auflage, S. 503.
- 339 Bobadilla, N.A., Gamba, G. (2007) New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293(1), F2-9.
- 340 Kockx, M., Jessup, W., Kritharides, L. (2010) Cyclosporin A and atherosclerosis--cellular pathways in atherogenesis. *Pharmacol Ther*, 128(1), 106-18.

- 341 Rosenwirth, B., Billich, A., Datema, R., Donatsch, P., Hammerschmid, F., Harrison, R., Hiestand, P., Jaksche, H., Mayer, P., Peichl, P., Quesniaux, V., Schatz, F., Schuurman, H.-J., Traber, R., Wenger, R., Wolff, B., Zenke, G., Zurini, M. (1994) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporine analog. *Antimicrob Agents Chemother*, 38(8), 1763-72.
- 342 Lin, K., Gallay, P. (2013) Curing a viral infection by targeting the host: the example of cyclophilin inhibitors. *Antiviral Res*, 99(1), 68-77.
- 343 Ma, S., Boerner, J.E., TiongYip, C., Weidmann, B., Ryder, N.S., Cooreman, M.P., Lin, K. (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), 2976-82.
- 344 Billich, A., Hammerschmid, F., Peichl, P., Wenger, R., Zenke, G., Quesniaux, V., Rosenwirth, B. (1995) Mode of action of SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus (HIV) type 1: interference with HIV protein-cyclophilin A interactions. *J Virol*, 69(4), 2451-61.
- 345 Watashi, K., Shimotohno, K. (2007) Chemical genetics approach to hepatitis C virus replication: cyclophilin as a target for anti-hepatitis C virus strategy. *Rev Med Virol*, 17(4), 245-52.
- 346 Goto, K., Watashi, K., Murata, T., Hishiki, T., Hijikata, M., Shimotohno, K. (2006) Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811. *Biochem Biophys Res Commun*, 343(3), 879-84.
- 347 Ditiatkovski, M., Neelisetti, V.N., Cui, H.L., Malesevic, M., Fischer, G., Bukrinsky, M., Sviridov, D. (2015) Inhibition of extracellular cyclophilins with cyclosporine analog and development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 353(3), 490-5.
- 348 Schiene-Fischer, C., Malesevic, M., Gutknecht, D., Simon, J.C., Saalbach, A. (2013) Selective blocking of the interaction of extracellular cyclophilins with CD147 reduces recruitment of leukocytes during inflammation. *J Invest Dermatol*, 133(4), 120.
- 349 Iordanskaia, T., Koeck, E., Nadler, E.P. (2013) MM284 treatment ameliorates experimental biliary atresia via inhibition of SMAD2 phosphorylation and downregulation of Timp-4 and MMP-7 mRNA expression. *J Am Coll Surg*, 217(3), 29.
- 350 Schmidt, R., Bültmann, A., Fischel, S., Gillitzer, A., Cullen, P., Walch, A., Jost, P., Ungerer, M., Tolley, N.D., Lindemann, S., Gawaz, M., Schömig, A., May, A.E. (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), 302-9.
- 351 Matías-Román, S., Gálvez, B.G., Genís, L., Yáñez-Mó, M., de la Rosa, G., Sánchez-Mateos, P., Sánchez-Madrid, F., Arroyo, A.G. (2005) Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in migration of human monocytes and is regulated through their interaction with fibronectin or endothelium. *Blood*, 105(10), 3956-64.
- 352 Satoh, K. (2015) Cyclophilin A in cardiovascular homeostasis and diseases. *Tohoku J Exp Med*, 235(1), 1-15.

- 353 **Allain, F., Durieux, S., Denys, A., Carpentier, M., Spik, G. (1999)** Cyclophilin B binding to platelets supports calcium-dependent adhesion to collagen. *Blood*, 94(3), 976-83.
- 354 **Miltenyi Biotec GmbH (2008) Dichtegradientenzentrifugation** Isolation of mononuclear cells from human peripheral blood by density gradient centrifugation. https://www.miltenyibiotec.com/~media/Files/Navigation/Research/Stem%20Cell/SP_MC_PB_density_gradient.ashx (Version vom 17.08.2015, 05:50Uhr).
- 355 **Key, M. (2009) LSAB-Methode** Chapter 9: Immunohistochemistry Staining Methods. In: Education Guide – Immunohistochemical Staining Methods. Fifth Edition. *Dako, Carpinteria, USA, S. 58, Abb. 3: Labeled Streptavidin-Biotin (LSAB) Method*. [http://www.dako.com/08002_ ihc_ staining_methods _5ed.pdf](http://www.dako.com/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf) (Version vom 17.08. 2015, 05:42Uhr).
- 356 **Sigma-Aldrich (2015) Grace Bio-Labs CultureWell™ removable chambered coverglass 16 wells** <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/gbl112358?lang=de®ion=DE> (Version vom 01.09.2015, 16:29Uhr).
- 357 **NeuroProbe (2014) Migrationskammer** <http://www.neuroprobe.com/product/48-well-micro-chemotaxis-chamber-with-filter-retaining-hardware/> (Version vom 17.08.2015, 05:55Uhr).
- 358 **Provitro (2014) Schemazeichnung Flusskammer** http://www.provitro.de/fileadmin/_doku mente/provitro_flow-chamber-system-FCS-1c.pdf (Version vom 17.08.2015, 06:00Uhr).
- 359 **Rahman, M. (2006)** Introduction to flow cytometry. *AbD Serotec*. <https://static.abdserotec.com/Lit-pdfs/Brochures1/flowcytometry.pdf> (Version vom 17.08.2015, 08:22Uhr).
- 360 **Biberstein, H., Brünauer, St.R., Dietel, F., Kaiserling,,C., Orzechowski, K., Saalfeld, U., Scholtz, W., Urbach, E., Wegelin, C., Wertheim, L. (1932)** Geschwülste der Haut I. *Springer Verlag, Auflage 1, S. 238-320*.
- 361 **Lang, G. (2013)** Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. *Springer-Verlag Wien New York, 2. Auflage, S. 270 / S. 269-304*
- 362 **Lamvik, J., Hella, H., Liabakk, N.B., Halaas, O. (2001)** Nonlabeled secondary antibodies augment/maintain the binding of primary, specific antibodies to cell membrane antigens. *Cytometry*, 45(3), 187-193.
- 363 **Snoek-van Beurden, P.A., Von den Hoff, J.W. (2005)** Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*, 38(1), 73-83.
- 364 **Krudewig, C. (2006)** Einfluss einer Staupevirusinfektion auf die in vitro-Expression von Matrix-Metalloproteinasen in Gehirnzellpopulationen adulter Hunde, *Diss med vet, TiHo Hannover*.
- 365 **Boyden, S.V. (1962)** The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*, 115 (3), 453–66.
- 366 **Ward, P.A., Cochrane, C.G., Mueller-Eberhard, H.J. (1965)** The role of serum complement in chemotaxis of leukocytes in vitro. *J Exp Med*, 122, 327-46.
- 367 **Keller, H.U., Sorkin, E. (1968)** Chemotaxis of leucocytes. *Experientia*, 24(7), 641-52.

-
- 368 Tempel, T.R., Snyderman, R., Jordan, H.V., Mergenhagen, S.E. (1970)** Factors from saliva and oral bacteria, chemotactic for polymorphonuclear leukocytes: their possible role in gingival inflammation. *J Periodontol*, 41(2), 71-80.
- 369 Jungi, T.W. (1975)** Assay of chemotaxis by a reversible Boyden chamber eliminating cell detachment. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 48(3), 341-52.
- 370 Campbell, P.B. (1977)** An improved method for the in vitro evaluation of monocyte leukotaxis. *J Lab Clin Med*, 90(2), 381-8.
- 371 Valerius, N.H. (1978)** In vitro effect of colchicine on neutrophil granulocyte locomotion. Assessment of the effect of colchicine on chemotaxis, chemokinesis and spontaneous motility, using a modified reversible Boyden chamber. *Acta Pathol Microbiol Scand B*, 86B(3), 149-54.
- 372 Falk, W., Goodwin, R.H. Jr., Leonard, E.J. (1980)** A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J Immunol Methods*, 1980, 33(3), 239-47.
- 373 Ellingsen, T., Storgaard, M., Møller, B.K., Buus, A., Andersen, P.L., Obel, N., Stengaard-Pedersen, K. (2000)** Migration of mononuclear cells in the modified Boyden chamber as evaluated by DNA quantification and flow cytometry. *Scand J Immunol*, 52(3), 257-63.
- 374 Augustin, H. (2004)** Methods in Endothelial Cell Biology, *Springer Verlag Berlin Heidelberg, Kapitel 14, S. 145-156*.
- 375 Giavazzi, R., Foppolo, M., Dossi, R., Remuzzi, A. (1993)** Rolling and adhesion of human tumor cells on vascular endothelium under physiological flow conditions. *J Clin Invest*, 92(6), 3038-44.
- 376 Zaidi, T.N., McIntire, L.V., Farrell, D.H., Thiagarajan, P. (1996)** Adhesion of platelets to surface-bound fibrinogen under flow. *Blood*, 88(8), 2967-72.
- 377 Theilmeier, G., Lenaerts, T., Remacle, C., Collen, D., Vermylen, J., Hoylaerts, M.F. (1999)** Circulating activated platelets assist THP-1 monocytoïd/endothelial cell interaction under shear stress. *Blood*, 94(8), 2725-34.
- 378 Eniola, A.O., Willcox, P.J., Hammer, D.A. (2003)** Interplay between rolling and firm adhesion elucidated with a cell-free system engineered with two distinct receptor-ligand pairs. *Biophys J*, 85(4), 2720-31.
- 379 Ling, X., Ye, J.F., Zheng, X.X. (2003)** Dynamic investigation of leukocyte-endothelial cell adhesion interaction under fluid shear stress in vitro. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, 35(6), 567-72.
- 380 Taite, L.J., Rowland, M.L., Ruffino, K.A., Smith, B.R., Lawrence, M.B., West, J.L. (2006)** Bioactive hydrogel substrates: probing leukocyte receptor-ligand interactions in parallel plate flow chamber studies. *Ann Biomed Eng*, 34(11), 1705-11.
- 381 Smith, L.A., Aranda-Espinoza, H., Haun, J.B., Hammer, D.A. (2007)** Interplay between shear stress and adhesion on neutrophil locomotion. *Biophys J*, 92(2), 632-40.
- 382 Borst, O. (2010)** Neue molekulare Mechanismen zellulärer Interaktionen an der Gefäßwand und ihre Bedeutung für die Pathogenese der Atherosklerose. *Diss med, Tübingen: medizinische Fakultät*.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- 383 Ziegler, M. (2012)** Entwicklung und Charakterisierung des rekombinanten, bifunktionalen Proteins SDF1-GPVI und dessen Einfluss auf die myokardialen Reparaturmechanismen. *Diss rer nat, Uni Hohenheim: Fakultät Naturwissenschaften*.
- 384 Hamm, K. (2004)** Untersuchung über die scherstressabhängige Induktion des platelet-derived growth factor mit Hilfe eines Reporter-gen-Assays an transfizierten Endothelzellen. *Diss med, Würzburg: medizinische Fakultät*.
- 385 Olszewski, L. (2013)** Arteriellles Tissue Engineering: Einfluss von Scherstress auf Endotheliale Progenitor Zellen. *Diss rer nat, RWTH Aachen, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften*.
- 386 Ignatowski, A.C. (1908)** Influence of animal food on the organism of rabbits. *S Peterb Izviest Imp Voenno-Med Akad* 16, 154-173.
- 387 Anitschkow, N. (1914)** Über die Atherosklerose der Aorta beim Kaninchen und deren Entstehungsbedingungen. *Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie, Jena, Bd. 59, H. 2*.
- 388 Nakashima, Y., Plump, A.S., Raines, E.W., Breslow, J.L., Ross, R. (1994)** ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994, 14, 133-140.
- 389 Lin, W., Abendschein, D., Haacke, E. (1997)** Contrast-enhanced magnetic resonance angiography of carotid arterial wall in pigs. *J Magn Reson Imaging*, 7, 183–190.
- 390 Vilahur, G., Padro, T., Badimon, L. (2010)** Atherosclerosis and Thrombosis: Insights from Large Animal Models. *J Biomed Biotechnol*. 2011, 907575.
- 391 Hollander, W., Kirkpatrick, B., Paddock, J., Colombo, M., Nagraj, S., Prusty, S. (1979)** Studies on the progression and regression of coronary and peripheral atherosclerosis in the cynomolgus monkey. I. Effects of dipyridamole and aspirin. *Exp Mol Pathol*, 30(1), 55-73.
- 392 Shi, Q., Vandeberg, J.F., Jett, C., Rice, K., Leland, M.M., Talley, L., Kushwaha, R.S., Rainwater, D.L., Vandeberg, J.L., Wang, X.L. (2005)** Arterial endothelial dysfunction in baboons fed a high-cholesterol, high-fat diet. *Am J Clin Nutr*, 82(4), 751-9.
- 393 Geer, J.C., Guitry, M.A. (1965)** Experimental canine atherosclerosis. In: *Roberts, J.C., Straus, R., Comparative atherosclerosis. Hoeber, Harper and Row, New York, 1965: 170-185*.
- 394 Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Innerarity, T. (1974)** Canine lipoproteins and atherosclerosis. II. Characterization of the plasma lipoproteins associated with atherogenic and nonatherogenic hyperlipidemia. *Circ Res*, 35, 722-733.
- 395 Fernandez, M.L., Volek, J.S. (2006)** Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation. *Nutr Metab (Lond)*, 3, 17.
- 396 Dillard, A., Matthan, N.R., Lichtenstein, A.H. (2010)** Use of hamster as a model to study diet-induced atherosclerosis. *Nutr Metab (Lond)*, 7, 89.

- 397 **Kapourchali, F.R., Surendiran, G., Chen, L., Uitz, E., Bahadori, B., Moghadasian, M.H. (2014)** Animal models of atherosclerosis. *World J Clin Cases*, 2(5), 126-32.
- 398 **Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahita, J.A., Maeda, N. (1992)** Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 258, 468-471.
- 399 **Paigen, B., Ishida, B.Y., Verstuyft, J., Winters, R.B., Albee, D. (1990)** Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Arteriosclerosis*, 10, 316-323.
- 400 **Mehrabian, M., Demer, L.L., Lusis, A.J. (1991)** Differential accumulation of intimal monocyte-macrophages relative to lipoproteins and lipofuscin corresponds to hemodynamic forces on cardiac valves in mice. *Arterioscler Thromb*, 11(4), 947-57.
- 401 **The Jackson Laboratories (2014a) Beschreibung des Mäusestammes C57BL/6J**
<http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html> (Version vom 17.08.2015, 08:53 Uhr).
- 402 **The Jackson Laboratories (2014b) Beschreibung des Mäusestammes B6.129P2-Apoe^{tm1Unc}/J**
<http://jaxmice.jax.org/strain/002052.html> (Version vom 17.08.2015, 09:00 Uhr).
- 403 **Reddick, R.L., Zhang, S.H., Maeda, N. (1994)** Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb*, 14, 141-147.
- 404 **Breslow, J.L. (1996)** Mouse models of atherosclerosis. *Science*, 272, 685-688.
- 405 **Rao, S., Verkman, A.S. (2000)** Analysis of organ physiology in transgenic mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Jul, 279(1), C1-C18.
- 406 **Lorenz, J.N. (2002)** A practical guide to evaluating cardiovascular, renal, and pulmonary function in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282(6), R1565-1582.
- 407 **Sampaio, A.L.F., Dufton, N., Perretti, M. (2010)** Models of Acute Inflammation – Air Pouch, Peritonitis and Ischemia-Reperfusion, In: *Serhan, C.N., Ward, P.A., Gilroy, D.W. Fundamentals of Inflammation Cambridge University Press, Auflage 1, (S. 329-337).*
- 408 **Cash, J.L., White, G.E., Greaves, D.R. (2009)** Zymosan-induced Peritonitis as a simple experimental system for the study of inflammation. *Methods Enzymol*, 461, 379-96.
- 409 **Broche, F., Tellado, J.M. (2001)** Defense mechanisms of the peritoneal cavity. *Curr Opin Crit Care*, 7(2), 105–116.
- 410 **Williams, J.C., Wagner, N.J., Earp, H.S., Vilen, B.J., and Matsushima, G.K. (2010)** Increased hematopoietic cells in the merck-/- mouse peritoneal cavity: a result of augmented migration. *J Immunol*, 184(12), 6637–6648.
- 411 **Lam, D., Harris, D., Qin, Z. (2013)** Inflammatory mediator profiling reveals immune properties of chemotactic gradients and macrophage mediator production inhibition during thioglycollate elicited peritoneal inflammation. *Mediators Inflamm*, 2013, 931562.
- 412 **Sozzani, S., Vecchi, A., Allavena, P., Mantovani, A. (2004)** Chemotaxis and Interaction with Vascular or Lymphatic Endothelium. In: *D'Ambrosio, D., Sinigaglia, F. Cell Migration in Inflammation and Immunity: Methods and Protocols. Humana Press Inc., S.1-16.*

-
- 413 **Becker, B.F., Heindl, B., Kupatt, C., Zahler, S. (2000)** Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol* 89, 160-167.
- 414 **Siegel-Axel, D., Langer, H., Lindemann, S., Gawaz, M. (2006)** Die Rolle von Thrombozyten bei Entzündungs- und Atheroskleroseprozessen. *Med Klin*, 101(6), 467-75.
- 415 **Hansson, G.K., Libby, P. (2006)** The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 6, 508–519.
- 416 **Everson, W.V., Smart, E.J. (2001)** Influence of caveolin, cholesterol, and lipoproteins on nitric oxide synthase implications for vascular disease. *Trends Cardiovasc Med*, 11, 246-50.
- 417 **Chen, Z.J., Vetter, M., Chang, G.D., Liu, S., Che, D., Ding, Y., Kim, S.S., Chang, C.H. (2004)** Cyclophilin A functions as an endogenous inhibitor for membrane-bound guanylate cyclase-A. *Hypertension* 2004, 44, 963-8.
- 418 **Ramachandran, S., Kartha, C.C. (2012)** Cyclophilin-A: A potential screening marker for vascular disease in type-2 diabetes. *Can J Physiol Pharmacol*, 90,1005-15.
- 419 **Seizer, P.** unveröffentlichte Daten
- 420 **Payeli, S.K., Schiene-Fischer, C., Steffel, J., Camici, G.G., Rozenberg, I., Lüscher, T.F., Tanner, F.C. (2008)** Cyclophilin A differentially activates monocytes and endothelial cells: role of purity, activity, and endotoxin contamination in commercial preparations. *Atherosclerosis*, 197(2), 564-71.
- 421 **Satoh, K., Nigro, P., Matoba, T., O'Dell, M.R., Cui, Z., Shi, X., Mohan, A., Yan, C., Abe, J., Illig, K.A., Berk, B.C. (2009)** Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms. *Nat Med*, 15(6), 649-56.
- 422 **Elvers, M., Herrmann, A., Seizer, P., Münzer, P., Beck, S., Schönberger, T., Borst, O., Martin-Romero, F.J., Lang, F., May, A.E., Gawaz, M. (2012)** Intracellular cyclophilin A is an important Ca(2+) regulator in platelets and critically involved in arterial thrombus formation. *Blood*, 120(6), 1317-26.
- 423 **Guha, M., Mackman, N. (2001)** LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*, 13(2), 85-94.
- 424 **Yang, Y., Kim, S.C., Yu, T., Yi, Y.S., Rhee, M.H., Sung, G.H., Yoo, B.C., Cho, J.Y. (2014)** Functional roles of p38 mitogen-activated protein kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm*, 2014, 352371.
- 425 **Klinger, M. (2010)** Blut und Blutbildung In: Zilles, K., Tillmann, B. *Anatomie. Springer Medizin Verlag Heidelberg, Auflage 1, S. 309-321.*
- 426 **Li, Z., Delaney, M.K., O'Brien, K.A., Du, X. (2010)** Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(12), 2341-9.
- 427 **Ohlmann, P., Laugwitz, K.L., Nurnberg, B., Spicher, K., Schultz, G., Cazenave, J.P., Gachet, C. (1995)** The human platelet ADP receptor activates Gi2 proteins. *Biochem J*, 312, 775–779.
- 428 **Offermanns, S. (2006)** Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res*, 99, 1293–1304.

- 429 Morton, L.F., Hargreaves, P.G., Farndale, R.W., Young, R.D., Barnes, M.J. (1995) Integrin $\alpha_2\beta_1$ -independent activation of platelets by simple collagen-like peptides: collagen tertiary (triple-helical) and quaternary (polymeric) structures are sufficient alone for $\alpha_2\beta_1$ -independent platelet reactivity. *Biochem J*, 306, 337–344.
- 430 Asselin, J., Gibbins, J.M., Achison, M., Lee, Y.H., Morton, L.F., Farndale, R.W., Barnes, M.J., Watson, S.P. (1997) A collagen-like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase C gamma2 in platelets independent of the integrin $\alpha_2\beta_1$. *Blood*, 89, 1235–1242.
- 431 Knight, C.G., Morton, L.F., Onley, D.J., Peachey, A.R., Ichinohe, T., Okuma, M., Farndale, R.W., Barnes, M.J. (1999) Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen. *Cardiovasc Res*, 41, 450–457.
- 432 Polanowska-Grabowska, R., Gibbins, J.M., Gear, A.R.L. (2003) Platelet Adhesion to Collagen and Collagen-Related Peptide under Flow - Roles of the $\alpha_2\beta_1$ Integrin, GPVI, and Src Tyrosine Kinases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003, 23, 1934-1940.
- 433 Nieuwenhuis, H.K., Sakariassen, K.S., Houdijk, W.P., Nieuvelstein, P.F., Sixma, J.J. (1986) Deficiency of platelet membrane glycoprotein Ia associated with a decreased platelet adhesion to subendothelium: a defect in platelet spreading. *Blood*, 68, 692–695.
- 434 Deckmyn, H., Van Houtte, E., Vermynen, J. (1992) Disturbed platelet aggregation to collagen associated with an antibody against an 85- to 90-Kd platelet glycoprotein in a patient with prolonged bleeding time. *Blood*, 79, 1466–1471.
- 435 Monnet, E., Fauvel-Lafeve, F. (2000) A new platelet receptor specific to type III collagen: type III collagen-binding protein. *J Biol Chem*, 275, 10912–10917.
- 436 Blake, R.A., Walker, T.R., Watson, S.P. (1993) Activation of human platelets by peroxovanadate is associated with tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma and formation of inositol phosphates. *Biochem J*, 290, 471-475.
- 437 Blake, R.A., Schieven, G.L., Watson, S.P. (1994) Collagen stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 2 but not phospholipase C-gamma 1 in human platelets. *FEBS Lett*, 353, 212-216.
- 438 Daniel, J.L., Dangelmaier, C., Smith, J.B. (1994) Evidence for a role for tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma 2 in collagen-induced platelet cytosolic calcium mobilization. *Biochem J*, 302, 617-622.
- 439 Ichinohe, T., Takayama, H., Ezumi, Y., Yanagi, S., Yamamura, H., Okuma, M. (1995) Cyclic AMP-insensitive activation of c-Src and Syk protein-tyrosine kinases through platelet membrane glycoprotein VI. *J Biol Chem*, 270, 28029-28036.
- 440 Poole, A.W., Watson, S.P. (1995) Regulation of cytosolic calcium by collagen in single human platelets. *Br J Pharmacol*, 115, 101-106.
- 441 Yanaga, F., Poole, A., Asselin, J., Blake, R., Schieven, G.L., Clark, E.A., Law, C.L., Watson, S.P. (1995) Syk interacts with tyrosine-phosphorylated proteins in human platelets activated by collagen and cross-linking of the Fc gamma-IIA receptor. *Biochem J*, 311, 471-478.

- 442 Inoue, O., Suzuki-Inoue, K., Shinoda, D., Umeda, Y., Uchino, M., Takasaki, S., Ozaki, Y. (2009) Novel synthetic collagen fibers, poly(PHG), stimulate platelet aggregation through glycoprotein VI. *FEBS Lett*, 583(1), 81-7.
- 443 Kahn, M.L., Zheng, Y.W., Huang, W., Bigornia, V., Zeng, D., Moff, S., Farese, R.V. Jr., Tam, C., Coughlin, S.R. (1998) A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*, 394, 690–694.
- 444 Coughlin, S.R. (1999) How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11023–11027.
- 445 Vassallo, R.R. Jr., Kieber-Emmons, T., Cichowski, K., Brass, L.F. (1992) Structure-function relationships in the activation of platelet thrombin receptors by receptor-derived peptides. *J Biol Chem*, 267, 6081.
- 446 Andersen, H., Greenberg, D.L., Fujikawa, K., Xu, W., Chung, D.W., Davie, E.W. (1996) Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11189.
- 447 Coughlin, S.R. (2001) Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb Haemost*, 86, 298.
- 448 Landesberg, R., Burke, A., Pinsky, D., Katz, R., Vo, J., Eisig, S.B., Lu, H.H. (2005) Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide. *J Oral Maxillofac Surg*, 63(4), 529-35.
- 449 Coughlin, S.R. (1999) Protease-activated receptors and platelet function. *Thromb Haemost*, 82, 353.
- 450 Nikkari, S.T., O'Brien, K.D., Ferguson, M., Hatsukami, T., Welgus, H.G., Alpers, C.E., Clowes, A.W. (1995) Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation*, 92(6), 1393-8.
- 451 Li, Z., Li, L., Zielke, H.R., Cheng, L., Xiao, R., Crow, M.T., Stetler-Stevenson, W.G., Froehlich, J., Lakatta, E.G. (1996) Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 148(1), 121-8.
- 452 Sukhova, G.K., Schönbeck, U., Rabkin, E., Schoen, F.J., Poole, A.R., Billingham, R.C., Libby, P. (1999) Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation*, 99(19), 2503-9.
- 453 Newby, A.C. (2008) Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(12), 2108-14.
- 454 Stintzing, S., Heuschmann, P., Barbera, L., Ocker, M., Jung, A., Kirchner, T., Neureiter, D. (2005) Overexpression of MMP9 and tissue factor in unstable carotid plaques associated with Chlamydia pneumoniae, inflammation, and apoptosis. *Ann Vasc Surg*, 19(3), 310-9.
- 455 Moreno, P.R., Falk, E., Palacios, I.F., Newell, J.B., Fuster, V., Fallon, J.T. (1994) Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*, 90(2), 775-8.

- 456 Zhang, S., Ritter, L. R., Ibragimov, A. I. (2013) Foam cell foamation in atherosclerosis: hdl and macrophage reverse cholesterol transport. *Discrete and continuous dynamical systems, Suppl.* 2013, 825-835.
- 457 Bar-Or, A., Nuttall, R.K., Duddy, M., Alter, A., Kim, H.J., Ifergan, I., Pennington, C.J., Bourgoïn, P., Edwards, D.R., Yong, V.W. (2003) Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain*, 126, 2738–2749.
- 458 Malik, N., Greenfield, B.D., Wahl, A.F., Kiener, P.A. (1996) Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *J Immunol*, 156, 3952–3960.
- 459 Feinberg, M.W., Jain, M.K., Werner, F., Sibinga, N.E.S., Wiesel, P., Wang, H., Topper, J.N., Perrella, M.A., Lee, M.-E. (2000) Transforming growth factor- β 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages. *J Biol Chem*, 275, 25766 –25773.
- 460 Nold, M., Goede, A., Eberhardt, W., Pfeilschifter, J., Muhl, H. (2003) IL-18 initiates release of matrix metalloproteinase-9 from peripheral blood mononuclear cells without affecting tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1: suppression by TNF alpha blockage and modulation by IL-10. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 367, 68 –75.
- 461 Cipollone, F., Fazio, M.L., Iezzi, A., Cuccurullo, C., De Cesare, D., Uchino, S., Spigonardo, F., Marchetti, A., Buttitta, F., Paloscia, L., Mascellanti, M., Cuccurullo, F., Mezzetti, A. (2005) Association between prostaglandin E receptor subtype EP4 overexpression and unstable phenotype in atherosclerotic plaques in human. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 25, 1925–1931.
- 462 Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., Sawaya, B.E. (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*, 29(6), 313-26.
- 463 Jin, Z.G., Melaragno, M.G., Liao, D.F., Yan, C., Haendeler, J., Suh, Y.A., Lambeth, J.D., Berk, B.C. (2000) Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ Res*, 87(9), 789-96.
- 464 Li, M., Zhai, Q., Bharadwaj, U., Wang, H., Li, F., Fisher, W.E., Chen, C., Yao, Q. (2006) Cyclophilin A is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates cell proliferation through CD147. *Cancer*, 106(10), 2284-94.
- 465 Yurchenko, V., Constant, S., Bukrinsky, M. (2006) Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins. *Immunology*, 117(3), 301-9.
- 466 Seizer, P., Borst, O., Langer, H.F., Bültmann, A., Münch, G., Herouy, Y., Stellos, K., Krämer, B., Bigalke, B., Büchele, B., Bachem, M.G., Vestweber, D., Simmet, T., Gawaz, M., May, A.E. (2009) EMMPRIN (CD147) is a novel receptor for platelet GPVI and mediates platelet rolling via GPVI-EMMPRIN interaction. *Thromb Haemost*, 101(4), 682-6.
- 467 Andrews, R.K., Berndt, M.C. (2004) Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res*, 114(5-6), 447-53.
- 468 Piot, C., Croisille, P., Staat, P., Thibault, H., Rioufol, G., Mewton, N., Elbelghiti, R., Cung, T.T., Bonnefoy, E., Angoulvant, D., Macia, C., Raczk, F., Sportouch, C., Gahide, G., Finet, G., André-Fouët, X., Revel, D., Kirkorian, G., Monassier, J.P., Derumeaux, G., Ovize, M. (2008) Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 359, 473–481.

- 469 Fernández-Miranda, C., Guijarro, C., de la Calle, A., Loinaz, C., Gonzalez-Pinto, I., Gómez-Izquierdo, T., Larumbe, S., Moreno, E., del Palacio, A. (1998) Lipid abnormalities in stable liver transplant recipients--effects of cyclosporin, tacrolimus, and steroids. *Transpl Int*, 11(2), 137-42.
- 470 Ojo, A.O. (2006) Cardiovascular complications after renal transplantation and their prevention. *Transplantation*, 82(5), 603-11.
- 471 Satonaka, H., Suzuki, E., Nishimatsu, H., Oba, S., Takeda, R., Goto, A., et al. (2004) Calcineurin promotes the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in vascular myocytes and mediates vascular inflammation. *Circ Res*, 94(5), 693-700.
- 472 Murakami, R., Kambe, F., Mitsuyama, H., Okumura, K., Murohara, T., Niwata, S., et al. (2003) Cyclosporin A enhances interleukin-8 expression by inducing activator protein-1 in human aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(11), 2034-2040.
- 473 Lo Russo, A., Passaquin, A. C., Andre, P., Skutella, M., & Ruegg, U. T. (1996) Effect of cyclosporin A and analogues on cytosolic calcium and vasoconstriction: possible lack of relationship to immunosuppressive activity. *Br J Pharmacol*, 118(4), 885-892.
- 474 Avdonin, P. V., Cottet-Maire, F., Afanasjeva, G. V., Loktionova, S. A., Lhote, P., Ruegg, U. T. (1999) Cyclosporine A up-regulates angiotensin II receptors and calcium responses in human vascular smooth muscle cells. *Kidney Int*, 55(6), 2407-2414.
- 475 Garcia, J. E., de Cabo, M. R., Rodriguez, F. M., Losada, J. P., Lopez, A. J., & Arellano, J. L. (2000) Effect of cyclosporin A on inflammatory cytokine production by U937 monocyte-like cells. *Mediators Inflamm*, 9(3-4), 169-174.
- 476 Kockx, M., Guo, D. L., Traini, M., Gaus, K., Kay, J., Wimmer-Kleikamp, S., et al. (2009) Cyclosporin A decreases apolipoprotein E secretion from human macrophages via a protein phosphatase 2B-dependent and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-independent pathway. *J Biol Chem*, 284(36), 24144-24154.
- 477 Bellosta, S., Mahley, R.W., Sanan, D. A., Murata, J., Newland, D. L., Taylor, J.M., et al. (1995) Macrophage-specific expression of human apolipoprotein E reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice. *J Clin Invest*, 96(5), 2170-2179.
- 478 Bürrig, K. (1991) The endothelium of advanced arteriosclerotic plaques in humans. *Arterioscler Thromb*, 11, 1678-1689.
- 479 Mann, J., Davies, M.J. (1999) Mechanisms of progression in native coronary artery disease: role of healed plaque disruption. *Heart*, 82, 265- 8.
- 480 Burke, A.P., Kolodgie, F.D., Farb, A., Weber, D.K., Malcom, G.T., Smialek, J., Virmani, R. (2001) Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation*, 103, 934-40.
- 481 Carpentier, M., Descamps, L., Allain, F., Denys, A., Durieux, S., Fenart, L., Kieda, C., Cecchelli, R., Spik, G. (1999) Receptor-mediated transcytosis of cyclophilin B through the blood-brain barrier. *J Neurochem*, 73(1), 260-70.

- 482 Melchior, A., Denys, A., Pakula, R., Allain, F. (2006)** Applications in therapeutic glycomics: Example of the cyclophilins as novel inflammatory mediators in rheumatoid arthritis. *In: New Developments in Therapeutic Glycomics, Edited by Maryse Delehedde and Hugues Lortat-Jacob, Research Signpost, 1st edition, p.303-316.*
- 483 Davies, M.J., Thomas, A. (1984)** Thrombosis and acute coronary artery lesions in sudden ischemic death. *N Engl J Med*, 310, 1137–1140.
- 484 Chatterji, U., M. Bobardt, S. Selvarajah, F. Yang, H. Tang, N. Sakamoto, G. Vuagniaux, T. Parkinson, P. Gallay (2009)** The isomerase active site of cyclophilin a is critical for hepatitis C virus replication. *J Biol Chem*, 284, 16998-7005.

IX Appendix

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACD	<i>acid-citrate-dextrose</i>
ACE-Hemmer	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i> -Hemmer
ADP	Adenosindiphosphat
AHA	<i>American Heart Association</i>
APC	Allophycocyanin
ApoE	Apolipoprotein E
Asp	Asparaginsäure
AS	Aminosäure
Aqua dest.	destilliertes Wasser
$\alpha_2\beta_1$	Kollagenrezeptor
B6 (C57BL/6J)	Mäusestamm: Wildtyp, <i>Black six</i>
B6.129P2-ApoE ^{tm1Unc} /J	Mäusestamm: ApoE- <i>knockout</i> -Maus
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BSG	Basigin
β -VLDL	β - <i>very low density lipoprotein</i>
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	zweiwertiges Kalzium-Ion
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CCR2	<i>C-C chemokine receptor type 2</i> (Chemokinrezeptor Typ 2)
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Differenzierungsmarker)
CD3	<i>cluster of differentiation 3</i> (T-Zell- Korezeptor, Marker für T-Zellen)
CD11b	<i>cluster of differentiation 11b</i> (Marker für myeloide Zellen)

IX APPENDIX

CD36	<i>cluster of differentiation 36</i> (gehört zur Klasse der Typ B <i>Scavenger-Rezeptoren</i>)
CD40	<i>cluster of differentiation 40</i> (kostimulierendes Protein auf antigenpräsentierenden Zellen)
CD40L/CD154	<i>cluster of differentiation 40- Ligand</i> (Glykoprotein auf aktivierten T-Zellen)
CD62L	<i>cluster of differentiation 62- Ligand</i> (L-Selektin)
CD147	<i>cluster of differentiation 147</i> (EMMPRIN)
CLD	<i>Cyclophilin-like domain</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPDA	<i>citrate phosphate dextrose adenine</i>
CRP	<i>Collagen-related peptide</i>
CsA	Cyclosporin A
Cu ²⁺	zweiwertiges Kupfer-Ion
CyPA	Cyclophilin A
CyPB	Cyclophilin B
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	dentritische Zelle
DVD	<i>Digital Versatile Disc</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMMPRIN (CD147)	<i>extracellular matrix metalloproteinase inducer</i>
eLDL	enzymatisch modifiziertes <i>low density lipoprotein</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
F4/80	Oberflächenglykoprotein auf Makrophagen (Makrophagen-Marker)
Fc	<i>fragment crystallisable</i> (Fc-Fragment bzw. konstanter Anteil eines Antikörpers)

IX APPENDIX

g	relative Zentrifugalbeschleunigung
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GP	Glykoprotein
GP Ib/IX/V	Glykoprotein Ib/IX/V-Rezeptor-Komplex
GP Iba	Glykoprotein Iba
GP IIb/IIIa bzw. $\alpha_{IIb}\beta_3$	Glykoprotein IIb/IIIa
GP VI	Glykoprotein VI
GPI	Glycophosphatidylinositol
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HO [•]	Hydroxyl-Radikal
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HOCl	Hypochlorsäure
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
ICAM-1	<i>intercellular cell adhesion molecule</i>
IFN- γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
i.p.	intraperitoneal
kDa	Kilodalton
JAM-3	<i>junctional adhesion molecule C</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen (JNK), auch <i>stress-activated phospho-kinases</i> (SAPK)
LDL	<i>low density lipoprotein</i> (Lipoprotein geringer Dichte)
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i> (Lymphozytenfunktionsasoziiertes Antigen)

IX APPENDIX

LPS	Lipopolysaccharid
LSAB-Methode	<i>Labeled Streptavidin-Biotin-Methode</i>
Mac-1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein (-1)</i>
MCT-1/-4	Monocarboxylattransporter 1/4
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Min	Minute
MIP-1 α	<i>macrophage inflammatory protein 1α</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MM284	[(4R)-4-[(6-carboxy-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-methyl]-4-methyl-L-threonine](1)-Cyclosporin
MMP	Matrix Metalloproteinase
MT-MMP	<i>membrane-type</i> Matrix Metalloproteinase
M Ω	Megaohm
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	mikromolar
μ m	Mikrometer
n	Anzahl
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>

IX APPENDIX

ng	Nanogramm
NIM811	N-methyl-4-isoleucin Cyclosporin
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NO [•]	Stickstoffmonoxid
O ^{2-•}	Superoxid-Anion
ONOO ⁻	Peroxynitrit
oxLDL	oxidativ modifiziertes <i>Low Density Lipoprotein</i> (Lipoprotein mit geringer Dichte)
p	p-Wert, Signifikanzwert
PAF	<i>platelet activating factor</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphatpuffer)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PF4	<i>Platelet factor 4</i>
pH	potential hydrogenii (lat.)
PPlase	Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase
PPIL-2	<i>peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 2</i>
PPIL-6	<i>peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 6</i>
Pro	Prolin
PRP	plättchenreiches Plasma
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
RANBP2	<i>RAN binding protein 2</i>
RANTES	<i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>

IX APPENDIX

RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
SDS	<i>Sodium-Dodecyl-Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>
sec	Sekunde
S.E.M.	<i>standard error of the mean</i> (Standardabweichung)
SMC	<i>smooth muscle cell</i> (glatte Muskelzelle)
SRA	<i>Scavenger-Rezeptor A</i>
SDCCAG-10	<i>serologically defined colon cancer antigen 10</i>
Tab.	Tabelle
TCSF	<i>tumor cell-derived collagenase stimulatory factor</i>
TGFβ	<i>transforming growth factor</i> β
TIMP	<i>tissue inhibitors of matrix metalloproteinases</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRAP	<i>Thrombin Receptor Activating Peptide</i>
U	<i>unit</i> (Einheit)
V	Volt
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>vascular epidermal growth factor</i>
VLA-4 (CD49d)	<i>very late antigen-4</i>
vWF	von Willebrand Faktor
WHO	<i>World Health Organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)
Zn ²⁺	zweiwertiges Zink-Ion

2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Die wichtigsten Stadien bei der Entstehung einer atherosklerotischen Läsion in der Arterienwand
- Abb. 2: Mikroskopische Darstellung von Schaumzellen
- Abb. 3: Aufbau einer unveränderten Arterienwand (A) und Initiation einer atherosklerotischen Läsion (B)
- Abb. 4: Progression der atherosklerotischen Läsion
- Abb. 5: Schematischer Aufbau des nekrotischen Kerns einer atherosklerotischen Plaque
- Abb. 6: Vergleichende schematische Darstellung von Plaqueruptur (A) und Plaqueerosion (B)
- Abb. 7: Regulationsschritte im Auf- und Abbau des Kollagens in der atherosklerotischen Plaque
- Abb. 8: Plaqueruptur und Thrombose
- Abb. 9: Fotografische Darstellung atherosklerotischer Gefäßabschnitte in den Koronararterien (A) und zerebralen Arterien (B) bei einem Hund mit Hypothyreoidismus
- Abb. 10: Adhäsion von Leukozyten am Endothel einer Arterie beim Menschen
- Abb. 11: Interaktionsmöglichkeiten von Thrombozyten mit anderen Zellen während der Atherogenese
- Abb. 12: Vergleich der Morphologie eines ruhenden Thrombozyten (links) und eines aktivierten Thrombozyten (rechts)
- Abb. 13: Atherosklerotische Plaque in drei verschiedenen Stadien
- Abb. 14: Interaktionen zwischen Thrombozyten und Endothelzellen in Form des *rolling* und der festen Adhäsion
- Abb. 15: Am Endothel adhärierende Thrombozyten rekrutieren und aktivieren Monozyten
- Abb. 16: Grundstruktur der MMPs
- Abb. 17: Zur Rolle der MMPs in der Atherosklerose
- Abb. 18: Struktur des *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer* (CD147, EMMPRIN)
- Abb. 19: Gegenüberstellung der Struktur von CyPA und CyPB

IX APPENDIX

- Abb. 20: Immunsupprimierende Wirkung des intrazellulären CyPA-CsA-Komplexes
- Abb. 21: Schematische Darstellung der cis- und trans-Isomerie bei einer Peptidbindung zwischen Prolin und einer anderen Aminosäure (P1)
- Abb. 22: Vergleich der chemischen Struktur von Cyclosporin A mit der von NIM811
- Abb. 23: Chemische Struktur von MM284
- Abb. 24: Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll Paque
- Abb. 25: Prinzip der *Labeled Streptavidin-Biotin*- bzw. LSAB-Methode
- Abb. 26: *Chamber slide*
- Abb. 27: Einteilung der Reaktionskammern der *chamber slides* für die Immunfluoreszenzfärbung von Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen
- Abb. 28: Migrationskammer
- Abb. 29: Aufbau der Flusskammer
- Abb. 30: Aufbau des Arbeitsplatzes für die Flusskammer
- Abb. 31: Schema zur Auswertung der Flusskammersequenzen
- Abb. 32: Durchführung einer Bauchhöhlenlavage bei der Maus
- Abb. 33: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Detektion der CyPB-Expression in atherosklerotischen Plaques ApoE-defizienter Mäuse (Stamm: B6.129P2-Apoetm1Unc/J)
- Abb. 34: Exemplarische Darstellung der CyPB-Expression auf der Monozytenoberfläche
- Abb. 35: Exemplarische Darstellung der intrazellulären Expression von CyPB in Monozyten
- Abb. 36: Exemplarische Darstellung der Expression von CyPB auf der Oberfläche von Makrophagen
- Abb. 37: Exemplarische Darstellung der intrazellulären Expression von CyPB in Makrophagen
- Abb. 38: Exemplarische Darstellung der Expression von CyPB auf der Schaumzelloberfläche
- Abb. 39: Exemplarische Darstellung der intrazellulären Expression von CyPB in Schaumzellen
- Abb. 40: Darstellung der mittleren Oberflächenexpression (+S.E.M.) von CyPB auf stimulierten Thrombozyten im Säulendiagramm (n= 5 Versuchsansätze)

IX APPENDIX

- Abb. 41: Zymographische Darstellung der Freisetzung von MMP-9 aus CyPB-stimulierten Monozyten
- Abb. 42: Darstellung der Mittelwerte (+S.E.M.) der MMP-9-Aktivität (92kDa-Bande) von n=6 Zymogrammen im Säulendiagramm
- Abb. 43: Darstellung der Mittelwerte (+S.E.M.) der MMP-2-Aktivität (72kDa-Bande) von n=6 Zymogrammen im Säulendiagramm
- Abb. 44: Darstellung der chemotaktischen Wirkung von CyPB sowie von Cyclosporin A-Derivaten auf Monozyten nach 4 Stunden (A) bzw. 18 Stunden (B)
- Abb. 45: Einfluss unterschiedlicher CyPB-Konzentrationen auf die Migration von Monozyten nach 18 Stunden
- Abb. 46: Immobilisiertes CyPA und CyPB vermitteln gesteigertes thrombozytäres *rolling*
- Abb. 47: Immobilisiertes CyPA, CyPB und CD147 (EMMPRIN)-Fc vermitteln eine gesteigerte thrombozytäre Adhäsion
- Abb. 48: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen adhärenter Thrombozyten auf CyPA-, CyPB- sowie CD147-Fc (EMMPRIN-Fc)-beschichteten Deckgläschen im Flusskammer-Versuch
- Abb. 49: Das durch CyPB gesteigerte *rolling* von Thrombozyten auf Kollagen wird durch die Inhibitoren NIM 811 und MM284 signifikant reduziert
- Abb. 50: Die durch CyPB gesteigerte Adhäsion von Thrombozyten auf Kollagen wird durch die Inhibitoren NIM 811 und MM284 signifikant reduziert
- Abb. 51: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von adhärenenten Thrombozyten auf kollagenbeschichteten Deckgläschen nach Stimulation mit CyPB bzw. Inhibition der CyPB-Wirkung mit NIM811 und MM284 im Flusskammer-Versuch
- Abb. 52: Das durch CyPB gesteigerte *rolling* von Thrombozyten auf aktivierten humanen Endothelzellen (HUVECs) wird durch die Inhibitoren NIM 811 und MM284 signifikant reduziert
- Abb. 53: Die durch CyPB gesteigerte Adhäsion von Thrombozyten auf aktivierten humanen Endothelzellen (HUVECs) wird durch die Inhibitoren NIM 811 und MM284 signifikant reduziert
- Abb. 54: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen adhärenter Thrombozyten auf endothelzellbeschichteten Deckgläschen nach Stimulation mit CyPB und nach Inhibition der CyPB-Wirkung mit NIM811 und MM284 im Flusskammer-Versuch

IX APPENDIX

- Abb. 55: Migration von Leukozyten in die Peritonealhöhle von Mäusen nach intraperitonealer Injektion von rekombinantem CyPB, von physiologischer NaCl-Lösung (Negativkontrolle) oder von Thioglykolat (Positivkontrolle)
- Abb. 56: Migration von bestimmten Leukozyten-Subpopulationen in die Peritonealhöhle von Mäusen nach intraperitonealer Injektion von rekombinantem CyPB, von physiologischer NaCl-Lösung (Negativkontrolle) oder von Thioglykolat (Positivkontrolle)
- Abb. 57: Vergleich der Leukozytenzahl im peripheren Blut von Mäusen 48 Stunden vor und 24 Stunden nach der intraperitonealen Injektion von CyPB, physiologischer NaCl-Lösung (Negativkontrolle) und Thioglykolat (Positivkontrolle)
- Abb. 58: Wirkung von CyPA in der Atherosklerose
- Abb. 59: Darstellung der hypothetischen Förderung der Plaqueprogression (A) sowie der Plaquestabilisierung (B) über die CyPB-vermittelte Freisetzung von MMP-9 aus Monozyten
- Abb. 60: Adhäsionsverhalten (rolling und feste Adhäsion) ADP-stimulierter Thrombozyten auf immobilisiertem CyPA (A), CyPB (B) und CD147 (EMMPRIN) (C)
- Abb. 61: Einfluss von CyPA und CyPB (A) sowie von NIM811 und MM284 (B) auf den Aktivierungszustand von Thrombozyten
- Abb. 62: Typische lokale Thrombozytenadhäsion über einem Endotheldefekt
- Abb. 63: Darstellung der hypothetischen Wirkung von CyPB nach Plaqueerosion oder -ruptur auf die Thrombozytenadhäsion (*rolling* und feste Adhäsion auf CyPB im subendothelalem Gewebe) (A) und die Thrombusbildung (B)
- Abb. 64: Darstellung der hypothetischen Beteiligung von CyPB an der schnellen Plaqueprogression nach Plaqueruptur mit konsekutiver Thrombusbildung (A) und Reorganisation der Gefäßwand durch Thrombolyse, Einwanderung glatter Muskelzellen, Synthese von Kollagen und Re-Endothelialisierung (B)
- Abb. 65: Darstellung der hypothetischen CyPB-vermittelten Rekrutierung von Leukozyten in die Gefäßwand
- Abb. 66: Darstellung der hypothetischen Wirkung von CyPB bei der Modulation von Entzündungsprozessen bei der Atherosklerose
- Abb. 67: Darstellung einer hypothetischen therapeutischen Wirkung von NIM811 bzw. MM284: Durch Blockade des nach Plaqueruptur (A1) oder -erosion (B1) oberflächlich in der Plaque exprimierten CyPB wird eine mögliche CyPB-vermittelte Thrombusbildung verhindert (A2 und B2)

3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Matrix Metalloproteinasen in atherosklerotisch veränderten Gefäßabschnitten
Tab. 2:	Verwendete Komponenten für die Immunhistologie und ihre Konzentrationen
Tab. 3:	Verwendete Substanzen für die Immunfluoreszenzfärbung und ihre Konzentrationen
Tab. 4:	Verwendete Antikörper für die Färbung der Thrombozyten und ihre Konzentrationen
Tab. 5:	Verwendete Substanzen für den Chemotaxis-Assay und ihre Konzentrationen
Tab. 6:	Verwendete Substanzen zur Stimulation der Thrombozyten für den Flusskammerversuch und ihre Konzentrationen

X Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die es mir ermöglicht haben diese Arbeit zu vollenden.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. vet. M. Stangassinger, für die Übernahme meiner Arbeit und ihrer Einreichung an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München bedanken.

Auch bei Herrn Prof. Dr. med. A. May möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir das interessante Thema überlassen und die externe Betreuung meiner Arbeit übernommen hat. Leider konnte er bedingt durch einen Wechsel seiner Arbeitsstelle die Betreuung nicht bis zum Ende fortführen. Daher möchte ich mich auch bei PD Dr. med. P. Seizer dafür bedanken, dass er die weitere wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit übernommen hat sowie die finanziellen Mittel für ihre Durchführung bereitgestellt hat.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Frau Dr. med. vet. T. Schönberger für ihre große Geduld bei der Besprechung der vielen aufkommenden Fragen, für ihre wahnsinnige Ausdauer bei der Überarbeitung der Dissertation und die gute Gesellschaft in der Denkhütte.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau K. Posavec, die mir bei aufwändigen Versuchen oft zugearbeitet hat und mir bei allen Fragen und Problemen stets hilfreich zur Seite stand.

Auch bei Frau S. von Ungern-Sternberg möchte ich mich für ihre Hilfe bei der Vorbereitung des Peritonitis-Versuchs bedanken.

Auch bei allen Kollegen, Kolleginnen und Freunden, die meine Versuche durch ihre bereitwillige Blutspende ermöglicht haben, möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Darüber hinaus möchte ich die Mäuse, die ihr Leben für diese Arbeit opfern mussten, nicht unerwähnt lassen. Auch ihnen gebühren mein Respekt und mein Dank.

Ein besonderer Dank gilt auch allen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe Seizer, Gawaz und Langer für das tolle Arbeitsklima und die vielen unterhaltsamen Stunden im Labor.

Außerdem bin ich sehr dankbar für die tollen Freundschaften, die sich zu vielen Kollegen entwickelt haben. Manu, Reini, Anni, Sarah, Fredi, Elli, Marcus, Beccy - die Zeit mit euch in Tübingen war eine ganz besondere Zeit für mich und ich werde sie immer in guter Erinnerung behalten! Vielen vielen Dank!

Schließlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern für ihre Unterstützung und ihre Geduld bedanken. Ohne ihre finanzielle Hilfe und ihr Engagement bei der Kinderbetreuung wäre die Fertigstellung der Arbeit nicht möglich gewesen.

Zu guter Letzt möchte ich noch meinem Mann Tomi von Herzen dafür danken, dass er immer an mich geglaubt hat und bei all den Tiefs, die mir im Verlauf dieser Arbeit begegneten, stets an meiner Seite war! Danke für Deine Motivation - ohne Dich hätte ich sicher aufgegeben!