

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
(Department) Tübingen  
Abteilung Innere Medizin III  
(Schwerpunkte: Kardiologie und Kreislauferkrankungen)  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz**

**Neue molekulare Mechanismen  
zellulärer Interaktionen an der Gefäßwand  
und ihre Bedeutung für die  
Pathogenese der Atherosklerose**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Oliver Alexander Borst**

**aus  
Tübingen**

**2010**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. E. May

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Stock

## **Meiner Familie**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Pathogenese der Atherosklerose	2
1.2	Rolle der Thrombozyten in der Pathogenese der Atherosklerose	6
1.2.1	Thrombozyten-Endothel-Interaktionen	6
1.2.2	Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen	7
1.3	Glykoprotein VI	9
1.4	Matrix Metalloproteinasen (MMPs)	10
1.5	Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN)	13
1.6	Cyclophilin A (CyPA)	17
1.7	Fragestellung	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	Material	21
2.1.1	Geräte	21
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	22
2.1.3	Lösungen, Medien, Reagenzien	22
2.1.4	Puffer, Zellmedien	24
2.1.5	Rekombinante Proteine	26
2.1.6	Antikörper	26
2.1.7	Zelllinien	27
2.2	Methoden	27
2.2.1	Thrombozytenisolation	27
2.2.2	Monozytenisolation	28
2.2.3	CHO-Zellkultivierung	29
2.2.4	Flusskammer	29
2.2.4.1	Beschichtung der Deckgläschen	31
2.2.4.2	Vorinkubation mit blockierenden Antikörpern	31
2.2.5	Aggregometrie	31
2.2.6	ELISA: GPVI-EMMPRIN-Bindungsversuch	32
2.2.7	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)	33

2.2.8	Durchflusszytometrie (FACS).....	34
2.2.8.1	FACS-Analyse der CHO-Zellen .....	35
2.2.8.2	FACS-Analyse der Thrombozyten .....	35
2.2.9	Schaumzellkultivierung .....	36
2.2.10	Zymographie .....	37
2.2.11	Immunhistologie .....	38
2.2.12	Statistische Analyse .....	38
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
3.1	EMMPRIN vermittelt Rolling stimulierter Thrombozyten .....	39
3.2	Gesteigertes thrombozytäres Rolling auf immobilisiertem EMMPRIN resultiert aus Interaktionen von EMMPRIN mit thrombozytärem GPVI und EMMPRIN.....	40
3.3	EMMPRIN-EMMPRIN- und EMMPRIN-GPVI-Interaktionen vermitteln zelluläres Rolling.....	42
3.4	Rekombinantes Glykoprotein VI bindet spezifisch an immobilisiertes EMMPRIN.....	44
3.5	Gelöstes EMMPRIN bindet mit hoher Affinität an immobilisiertes Glykoprotein VI .....	45
3.6	Die Aggregation humaner Thrombozyten wird durch rekombinantes EMMPRIN nicht beeinflusst .....	46
3.7	EMMPRIN und Cyclophilin A werden in atherosklerotischen Plaques ApoE-defizienter Mäuse exprimiert.....	47
3.8	Cyclophilin A und rekombinantes EMMPRIN induzieren über Bindung an den monozytären EMMPRIN-Rezeptor eine Steigerung der proteolytischen Aktivität durch Aufregulation von MMP-9.....	49
3.9	Bindung von Cyclophilin A oder rekombinatem EMMPRIN an den EMMPRIN-Rezeptor führt zu einer gesteigerten Bildung von MMP-9 in humanen Schaumzellen.....	50
3.10	Cyclophilin A aktiviert humane Thrombozyten und führt zu einer Aufregulation von P-Selektin, EMMPRIN und SDF-1 .....	51
3.11	Cyclophilin A abhängige Aktivierung humaner Thrombozyten wird vermittelt durch Interaktionen mit thrombozytärem EMMPRIN .....	53

<b>4. Diskussion.....</b>	<b>54</b>
4.1. Glykoprotein VI als neuer thrombozytärer Rezeptor für EMMPRIN und die Bedeutung EMMPRIN-vermittelter Interaktionen für thrombozytäre Adhäsionsmechanismen an der Gefäßwand .....	54
4.2. Bedeutung des EMMPRIN-Liganden Cyclophilin A für die Proteolyse der atherosklerotischen Plaque .....	57
4.3. EMMPRIN-abhängige Aktivierung von Thrombozyten durch das inflammatorische Zytokin Cyclophilin A.....	58
4.4. Schlussfolgerung .....	60
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>62</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>80</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>82</b>
<b>9. Danksagung .....</b>	<b>85</b>
<b>10. Curriculum vitae.....</b>	<b>86</b>

## 1 EINLEITUNG

Die Atherosklerose und ihre häufigste, sowie schwerwiegendste Komplikation, der akute Myokardinfarkt, stellen heute die häufigste Todesursache der westlichen Industrienationen dar.<sup>6,134</sup>

In Deutschland erleiden jährlich etwa 280.000 Menschen einen akuten Myokardinfarkt,<sup>80</sup> an dem nach Angaben des statistischen Bundesamtes trotz einer optimierten Akutversorgung nach wie vor über 61.000 Menschen jährlich versterben.<sup>150</sup> Nach der MONICA-Studie liegt die Inzidenz des Herzinfarktes bei Männern bei 330/100.000, bei Frauen bei 120/100.000.<sup>196</sup>

Insgesamt sind laut statistischem Bundesamt in Deutschland im Jahre 2005 fast 150.000 Menschen an den Folgen einer koronaren Herzkrankheit verstorben, die Behandlungskosten atherosklerotischer Erkrankungen beliefen sich bei den über 65-jährigen auf rund ein Viertel der gesamten Krankheitskosten.<sup>150</sup>

Diese Zahlen belegen eindrücklich die enorme Bedeutung der gesundheitlichen Folgen von Atherosklerose und koronarer Herzkrankheit, sowie die Wichtigkeit einer möglichst frühzeitigen Prävention dieser Erkrankungen.

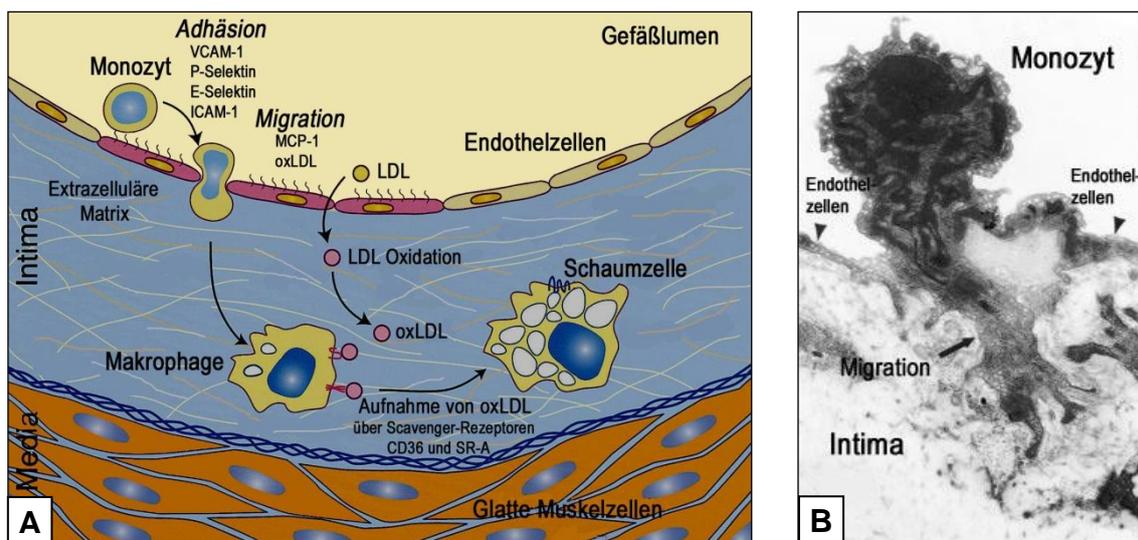
In Anbetracht der ungemeinen Folgekosten für das Gesundheitssystem und der weltweit immer weiter steigenden Zahlen an Menschen, die an den Folgen von Atherosklerose versterben, scheint es dringend erforderlich, die bislang nur unvollständig verstandenen Mechanismen bei der Entstehung von Atherosklerose und Myokardinfarkt weitergehend aufzuklären, um die Möglichkeiten frühzeitiger therapeutischer Interventionen zu erweitern.

Untersuchungen unserer und anderer Arbeitsgruppen in den letzten Jahren haben gezeigt, dass das Glykoprotein EMMPRIN bei der Progression atherosklerotischer Prozesse eine bedeutende Rolle spielen könnte.

## 1.1 Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine chronisch-progressive inflammatorische Erkrankung der großen Arterien.<sup>117,161</sup> Als erste nachweisbare Veränderung zeigt sich eine Anhäufung von LDL in der subendothelialen Matrix,<sup>99</sup> wo LDL, an Proteoglykan gebunden, eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber oxidativen und anderen chemischen Modifikationen zeigt.<sup>29,159,190,207</sup> Der LDL-Permeabilität der Gefäßwand zugrunde liegt eine endotheliale Dysfunktion infolge von Hyperlipidämie, arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus oder Nikotin, die an der Gefäßwand einen lokalen Entzündungsprozess in Gang bringen.<sup>28,37,76</sup>

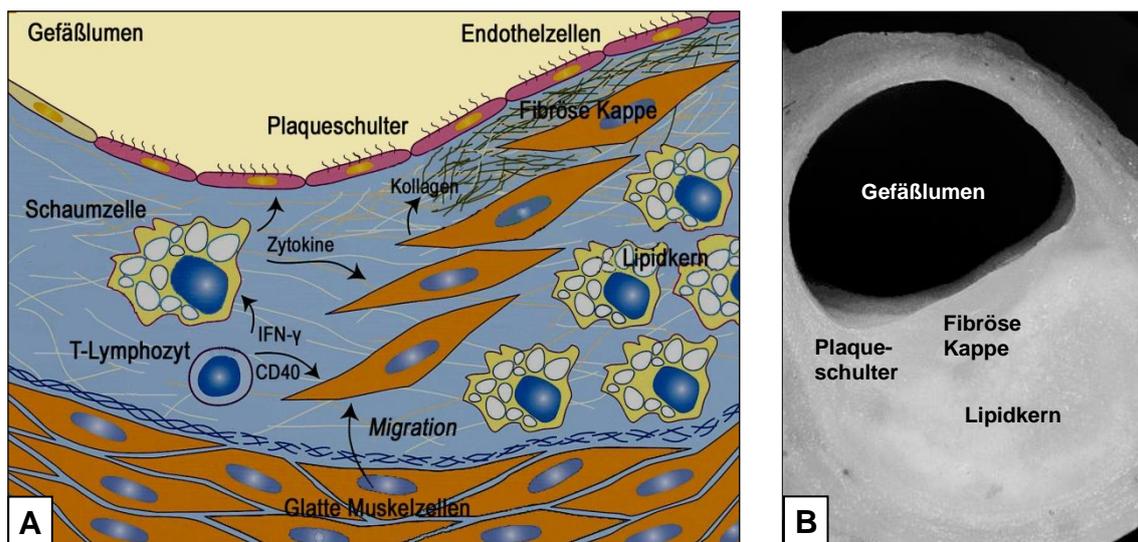
Die inflammatorische Aktivierung führt auf den Endothelzellen zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1<sup>39,62,109</sup> oder ICAM-1,<sup>41,148</sup> sowie E- und P-Selektin.<sup>48</sup> Diese ermöglichen Monozyten und T-Lymphozyten gleichermaßen, an das Endothel zu adhären und mittels Diapedese durch den endothelialen Zellverband in die Intima zu gelangen.<sup>75,77</sup> Für die Anlockung in die Intima migrierender Leukozyten wird das in atheromatös veränderten Gefäßwänden vermehrt gebildete Chemokin MCP-1 verantwortlich gemacht.<sup>106</sup> MCP-1 wird von Endothel oder glatten Muskelzellen freigesetzt, wenn diese durch oxidiertes LDL oder andere inflammatorisch wirksame Mediatoren stimuliert werden.<sup>156,202</sup>



**Abbildung 1** Initiierung der atherosklerotischen Läsionsbildung: **A** Anhäufung von zu Schaumzellen differenzierenden Makrophagen in der Intima (Glass 2001). **B** Endotheliale Transmigration eines Monozyten (Lusis 2000).

## EINLEITUNG

In die Gefäßintima aufgenommen, bilden eingewanderte Monozyten morphologische Eigenschaften von Makrophagen aus.<sup>107</sup> Diese Makrophagen exprimieren in der Folge sogenannte Scavenger-Rezeptoren wie SR-A und CD36, welche für die Aufnahme von oxidiertem LDL verantwortlich gemacht werden.<sup>82,183</sup> Lipidbeladene Makrophagen werden auch als Schaumzellen bezeichnet und charakterisieren die frühe atherosklerotische Läsion. Nach Ausbildung dieser sogenannten Fatty streaks, ist der Übergang in eine komplexere Läsion, die möglicherweise klinisch symptomatisch werden kann, von der intimalen Einwanderung glatter Muskelzellen aus der Media gekennzeichnet.<sup>182</sup> Dabei werden die glatten Muskelzellen von aus aktivierten Makrophagen freigesetzten Wachstumsfaktoren nicht nur zur Migration, sondern auch zur Proliferation und Freisetzung extrazellulärer Matrix angeregt.<sup>56</sup>



**Abbildung 2** *Läsionsprogression*: **A** Glatte Muskelzellen wandern in die Intima ein, wo sie proliferieren und über die Freisetzung extrazellulärer Matrixproteine eine fibröse Kappe bilden (Glass 2001). **B** Stabile Plaque (Davies 1996).

Die kollagenreiche extrazelluläre Matrix bildet eine fibröse Schutzkappe, die den Kontakt der im Blut befindlichen Thrombozyten mit den im so genannten nekrotischen Kern enthaltenen Thrombozyten-aktivierenden Stoffen verhindern soll.<sup>44</sup> Dieser nekrotische Kern setzt sich unter anderem aus Zelltrümmern untergegangener Schaumzellen zusammen.<sup>13,22</sup>

## EINLEITUNG

---

Er ist reich an extrazellulären Lipiden sowie aus Makrophagen freigesetztem Tissue-Faktor, was ihm äußerst thrombogene Eigenschaften verleiht.<sup>11</sup> T-Lymphozyten verstärken die Thrombogenität des lipidhaltigen Nekrosekerns über die Expression des CD40-Liganden, der die Makrophagen zur weiteren Freisetzung von Tissue-Faktor anregt.<sup>118</sup>

Die Ausbildung atherosklerotischer Plaques dauert gewöhnlich viele Jahre, ohne dass die Betroffenen dabei jemals symptomatisch würden. Allerdings resultieren die meisten Myokardinfarkte auch nicht aus hochgradigen, flussmindernden Gefäßstenosen, sondern aus oftmals kleiner als 50-prozentigen atherosklerotischen Gefäßverengungen.<sup>51</sup> Bei Frauen und Diabetikern, aber insgesamt nur jedem vierten Patienten, kann dem akuten Myokardinfarkt auch nur eine lediglich oberflächliche Plaquerosion zugrunde liegen.<sup>25,26,53</sup> Bei mehr als zwei Dritteln der Patienten wird die akute Koronarthrombose aber durch ein physikalisch bedingtes Aufreißen der atherosklerotischen Plaque ausgelöst.<sup>42,108</sup> Diese sogenannte Plaqueruptur stellt die häufigste Ursache eines akuten Myokardinfarktes dar.<sup>51</sup>

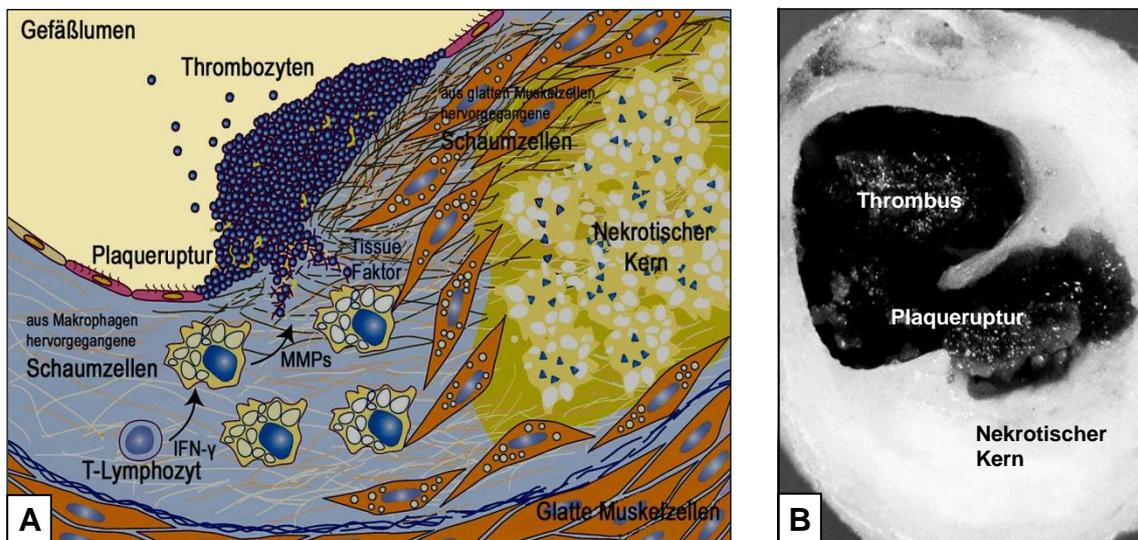
Wie vulnerabel die den thrombogenen nekrotischen Kern vom Gefäßlumen abschirmende fibröse Kappe ist, hängt von deren zellulärer Zusammensetzung und inflammatorischer Aktivität ab.

Eine Ausdünnung der fibrösen Kappe,<sup>52</sup> eine hohe Anzahl eingewanderter inflammatorisch aktiver Makrophagen und T-Lymphozyten,<sup>117</sup> eine relativ geringe Zahl glatter Muskelzellen, ein hoher Gehalt an Tissue-Faktor,<sup>43</sup> sowie ein über 40-prozentiger Lipidanteil am Gesamtvolumen<sup>54</sup> begünstigen ein Einreißen der atherosklerotischen Plaque.

Prädilektionsstelle der Plaqueruptur ist die Schulterregion, an der die fibröse Kappe mit der Gefäßwand verbunden ist.<sup>116</sup> Hier lassen sich die meisten Makrophagen, nur wenig Kollagen synthetisierende glatte Muskelzellen und dementsprechend der geringste Kollagengehalt der gesamten fibrösen Kappe nachweisen.<sup>40,155</sup> Ungefähr 60% aller Plaquerupturen laufen in diesem Bereich ab.<sup>33</sup> Die Ausdünnung der fibrösen Kappe ist das Ergebnis einer reduzierten Kollagensynthese und gesteigerten Degradation extrazellulärer Matrix.<sup>103,116</sup>

## EINLEITUNG

Das aus T-Zellen freigesetzte Zytokin  $\text{INF-}\gamma$  inhibiert die Kollagensynthese glatter Muskelzellen.<sup>5</sup> Hoch aktivierte Makrophagen fortgeschrittener Atherome überexprimieren neben der Freisetzung des prokoagulatorischen Tissue-Faktors und verschiedener Interleukine auch inflammatorische Zellmediatoren wie  $\text{TNF-}\alpha$  und elastolytische Kathepsine, sowie Matrix Metalloproteinasen, die Kollagen und Elastin der extrazellulären Gefäßwandmatrix zersetzen.<sup>69,85,187</sup>



**Abbildung 3** Plaquerruptur und Thrombusbildung: **A** Die nekrotischen Schaumzellen bilden den nekrotischen Kern und sorgen für eine Anhäufung extrazellulärer Lipide. MMP-Freisetzung führt zur Ruptur der fibrösen Kappe mit konsekutiver Thrombosierung (Glass 2001). **B** Plaquerruptur (Davies 2000).

Reißen atherosklerotische Plaques auf, kommt das Blut mit dem thrombogenen Plaqueinhalt in Kontakt. Thrombozyten adhärieren an vWF über den membranären Adhäsionsrezeptor GPIb/IX/V<sup>162</sup> und an Kollagen über GPVI.<sup>123,140,141</sup>

Nach der Thrombozytenadhäsion kommt es infolge der thrombozytären Aktivierung zur Konformationsänderung der Integrinrezeptoren  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  (Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa)<sup>9,92</sup> und  $\alpha_2\beta_1$  (Kollagenrezeptor),<sup>90,141</sup> die eine feste thrombozytäre Bindung an die extrazelluläre Matrix vermitteln.

Über Bindung plasmatischen Fibrinogens an Fibrinogenrezeptoren zweier unterschiedlicher Thrombozyten kommt es zu deren Aggregation und zur Initiierung der Thrombusbildung. Eine akute Koronarthrombose ist die Folge.

### 1.2 Rolle der Thrombozyten in der Pathogenese der Atherosklerose

Thrombozyten-Interaktionen mit Leukozyten und Endothel können über verschiedene Mechanismen zu entzündlichen Veränderungen in der Gefäßwand führen und auf diese Weise die Ausbildung atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen initiieren und deren Progression fördern.<sup>129</sup>

Obwohl es sich bei Thrombozyten um anukleäre Zellen handelt, können sie dennoch Proteine synthetisieren.<sup>110</sup> Zudem enthalten Thrombozyten drei verschiedene Granula ( $\alpha$ -Granula, Lysosomen, dichte Kerngranula) und ein komplexes Membransystem, was es ihnen ermöglicht, eine Vielzahl von Adhäsionsproteinen (z.B. vWF, P-Selektin, GPIIb/IIIa), Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF, TGF- $\beta$ ), Chemokine (z.B. PF4, SDF-1), zytokinähnliche Faktoren (z.B. IL1- $\beta$ , CD40L) und Gerinnungsfaktoren zu bevorraten und rasch freizusetzen.<sup>203</sup> Diese Proteine spielen eine Rolle bei den genauestens aufeinander abgestimmten biologischen Prozessen wie Zelladhäsion und -aggregation, Chemotaxis, Zellproliferation, Gerinnung und Proteolyse, die allesamt zur Beschleunigung entzündlicher Prozesse beitragen.<sup>129</sup>

#### 1.2.1 Thrombozyten-Endothel-Interaktionen

Normalerweise verhindert ein intaktes, nicht aktiviertes Endothel eine Thrombozytenadhäsion an die extrazelluläre Matrix. Allerdings bildet entzündlich verändertes Endothel adhäsionsvermittelnde Eigenschaften aus, so dass eine Denudation des Endothels für ein festes Adhären von Thrombozyten an der arteriellen Gefäßwand nicht zwingend erforderlich ist.<sup>73</sup>

Der initiale lockere Kontakt zwischen zirkulierenden Thrombozyten und Endothel (Rolling) wird dabei über Selektine (P-Selektin/CD62P, E-Selektin) vermittelt, die sowohl auf Endothelzellen, wie auch auf Thrombozyten vorkommen<sup>186</sup> und auf inflammatorische Stimuli rasch auf deren Oberflächen exprimiert werden.<sup>60,61</sup> Ein Rezeptor für P-Selektin auf Thrombozyten könnte dabei der GPIb/IX/V-Rezeptor (vWF-Rezeptor-Komplex) sein. Somit vermittelt der vWF-Rezeptor sowohl die Thrombozytenadhäsion auf subendothelialer Matrix, als auch auf intaktem Endothel.<sup>158</sup>

## EINLEITUNG

---

PSGL-1 vermittelt über Interaktion mit endotheliale P-Selektin thrombozytäres Rolling auf Endothel unter erhöhten Scherraten.<sup>59,101</sup> Den schnell reversiblen Interaktionen zwischen thrombozytärem PSGL-1 oder GPIIb $\alpha$  und endotheliale P-Selektin (Rolling) folgt eine via  $\beta_3$ -Integrin ( $\alpha_{IIb}\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_3$ ) vermittelte feste Thrombozytenadhäsion.<sup>129</sup>

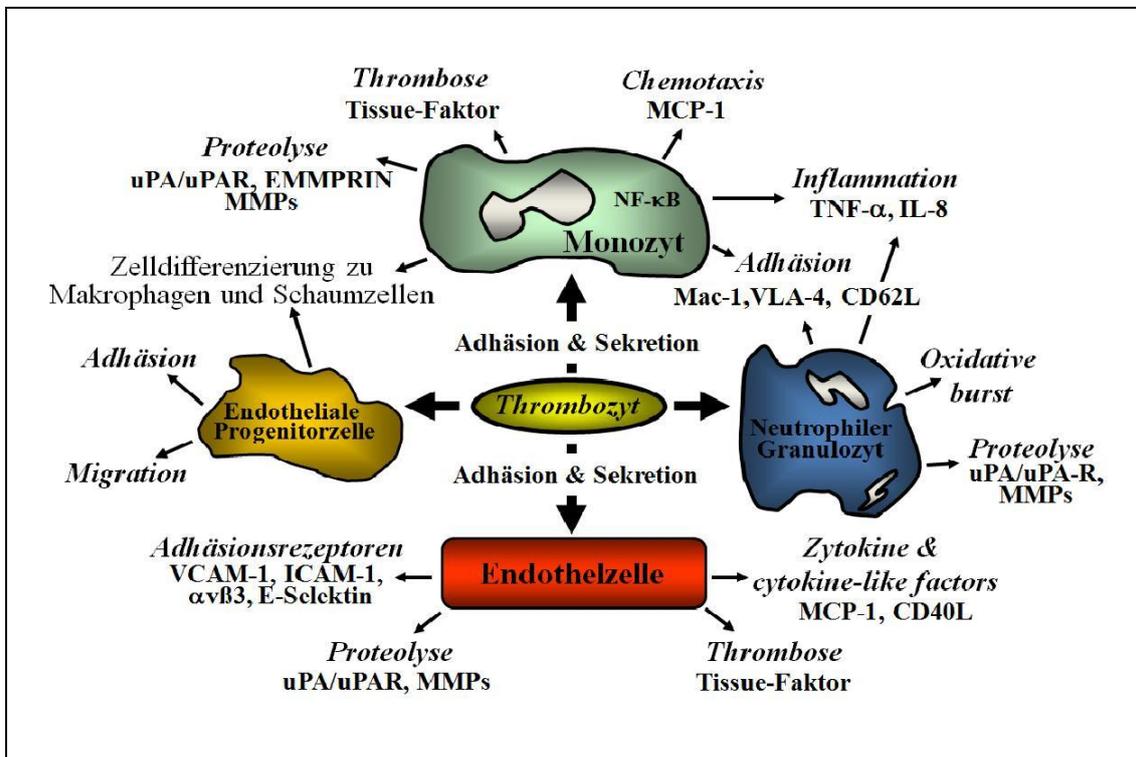
### 1.2.2 Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen

Die Rekrutierung zirkulierender Leukozyten zur arteriellen Gefäßwand setzt mehrschrittige adhäsive und signalvermittelnde Vorgänge, einschließlich Selektin-vermitteltem Anhaften und Rolling, Leukozytenaktivierung, Integrin-vermittelter fester Adhäsion und Diapedese voraus, die in einer Infiltration inflammatorischer Zellen in die Gefäßwand resultieren.<sup>181</sup> Dabei können die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten in unterschiedlichen Abläufen auftreten: Zum einen können Thrombozyten mit Leukozyten koaggregieren und so die Rekrutierung von Leukozyten zum Endothel entweder über Aktivierung leukozytärer Adhäsionsrezeptoren oder als eine Art Brückenzellen unterstützen, zum anderen können Thrombozyten, sobald sie an Endothel adhären sind, Leukozyten anlocken und eine „klebrige“ Oberfläche für deren Anhaften an die Gefäßwand schaffen.<sup>174</sup>

Auf Adhäsion oder anderweitige Aktivierung setzen Thrombozyten rasch P-Selektin aus ihren  $\alpha$ -Granula an ihrer Plasmamembran frei. Hierdurch wird Leukozyten über eine Interaktion von P-Selektin an leukozytäres PSGL-1 eine lockere Bindung an Thrombozyten ermöglicht.<sup>49,209</sup> In der Folge können Monozyten Mac-1-abhängig (CD11b/CD18,  $\alpha M\beta 2$ ) dann fest an Thrombozyten adhären.<sup>129</sup> Auf Thrombozyten konnten sowohl GPIIb $\alpha$ ,<sup>178</sup> JAM-C<sup>165</sup> und CD40L,<sup>218</sup> als auch ICAM-2<sup>45</sup> und Brückenproteine wie an GPIIbIIIa gebundenes Fibrinogen<sup>4</sup> oder an GPIIb $\alpha$  gebundenes Kininogen<sup>32</sup> als passende Rezeptoren für Mac-1 identifiziert werden. Während dieser Adhäsionsvorgänge induziert eine Bindung zwischen den Rezeptoren PSGL-1 und Mac-1 gemeinsam mit aus Thrombozyten freigesetzten inflammatorischen Bestandteilen in Monozyten komplexe Aktivierungskaskaden.<sup>130,138,205</sup>

## EINLEITUNG

Diese Aktivierungsprozesse, an denen intrazelluläre Signalwege wie beispielsweise die NF- $\kappa$ B-Aktivierung beteiligt sind, fördern Monozyten- und Neutrophilenadhäsion (über Aufregulierung und Aktivierung von Mac-1 und VLA-4), Thrombogenität (über die Freisetzung von Tissue-Faktor aus Monozyten), sowie den aus Neutrophilen freigesetzten oxidativen Burst und die Abgabe von monozytären Chemokinen und Zytokinen (IL-1 $\beta$ , IL-8, MCP-1, TNF- $\alpha$ ).<sup>31,138,205,215</sup> Darüberhinaus steuert die Bindung von PSGL-1 durch P-Selektin auch die translational regulierte Expression von Proteinen wie dem Urokinaserezeptor (uPAR), einem entscheidenden Oberflächenproteaserezeptor und Regulator der integrinvermittelten Leukozytenadhäsion.<sup>119,127,128,149,206</sup>



**Abbildung 4** Thrombozyten-Interaktionen bei der Bildung atherosklerotischer Plaques: Thrombozyten können bei Monozyten, Neutrophilen, Endothelzellen und endothelialen Progenitorzellen eine Reihe inflammatorischer Reaktionen auslösen, die Entzündungsprozessen wie Adhäsion, Chemotaxis, Migration, Proteolyse, Thrombose oder auch die Differenzierung von Makrophagen zu Schaumzellen vorantreiben. Diese Prozesse schaffen in der Gefäßwand ein atherogenes Milieu, in dem sich eine Plaque ausbilden kann (May 2008).

### 1.3 Glykoprotein VI

GPVI ist ein 60-65 kDa Typ I Transmembranglykoprotein, das zur Familie der Immunglobuline gehört.<sup>35,86</sup> In der Thrombozytenmembran bildet GPVI mit der Untereinheit FcR $\gamma$ -Kette einen Komplex, der wesentlich an der Signalübermittlung des Kollagenrezeptors beteiligt ist.<sup>74,139,147,216</sup>

GPVI wird als der bedeutendste Kollagenrezeptor für die Vermittlung von Thrombozytenadhäsion und -aggregation in atherosklerotischem Plauegewebe beschrieben.<sup>38,145</sup> Dabei ist der Thrombozytenmembranrezeptor GPVI neben dem Integrin  $\alpha_2\beta_1$  als einziger Rezeptor in der Lage, Kollagen direkt zu binden<sup>184</sup> und damit unmittelbar an der Thrombusbildung beteiligt.<sup>123</sup>

Eine direkte GPVI-Kollagen-Interaktion ist entscheidend für eine unter niedrigem Scherstress entstehende erste lockere Thrombozytenbindung (Platelet tethering).<sup>71,123</sup> Darüber hinaus werden über eine solche Interaktion tyrosinkinaseabhängige intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt, an deren Ende Thrombozyten aktiviert, thrombozytäres P-Selektin aufreguliert und  $\beta_1$ -, sowie  $\beta_2$ -Integrine in einen hochaffinen Zustand überführt werden.<sup>16,71</sup> Aktivierte thrombozytäre  $\alpha_2\beta_1$ - und  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrine initiieren in der Folge über Bindung an Kollagen und vWF eine feste Adhäsion.<sup>141</sup>

Desweiteren induzieren GPVI-vermittelte Signalkaskaden eine Formveränderung der Thrombozyten („shape change“)<sup>87</sup> und führen zudem zu deren Degranulierung mit Freisetzung aggregationsfördernder Stoffe wie ADP oder Thromboxan A<sub>2</sub>.<sup>141,184</sup>

Obwohl GPVI im Wesentlichen an der thrombozytären Oberfläche exprimiert wird, führt eine Aktivierung der Thrombozyten zu einer weiteren Freisetzung und einer erhöhten Plasmamembranexpression von GPVI.<sup>27,141</sup> Eine erhöhte GPVI-Oberflächenexpression findet sich unter anderem bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2<sup>27</sup> und bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom.<sup>17</sup>

### 1.4 Matrix Metalloproteinasen (MMPs)

Die Matrix Metalloproteinasen bilden eine Gruppe von über 20 zink- und calciumabhängigen Endopeptidasen, die allesamt am hydrolytischen Abbau von Bestandteilen der extrazellulären Matrix beteiligt sind.<sup>47,137</sup> MMPs spielen sowohl bei physiologischen Gewebeerneuerungsprozessen, als auch bei pathologischen Gewebeumbildungen im Rahmen von Tumorerkrankungen, entzündlichen Erkrankungen und Atherosklerose eine entscheidende Rolle.<sup>19,185,200</sup> Entsprechend ihrer Substratspezifität und Struktur können MMPs in Kollagenasen (MMP-1,-8,-13 und -18), Gelatinasen (MMP-2 und -9), Stromelysine (MMP-3,-7,-10 und -11) und membranassoziierte MMPs (MT-MMP 1-4) unterteilt werden.<sup>204</sup> Unter physiologischen Bedingungen ist die Aktivität der Proteinase auf verschiedenen Ebenen genauestens reguliert:

Auf Transkriptionsebene bei der EMMPRIN-abhängig regulierten *de novo* Synthese inaktiver Zymogene, bei der posttranslationalen Aktivierung der Zymogene und über Interaktionen freigesetzter MMPs mit bestimmten Bestandteilen der extrazellulären Matrix und Gewebeinhibitoren der MMPs, den TIMPs.<sup>137,185</sup> IL-1 und IL-6, sowie TNF- $\alpha$  und CD40 sind bedeutende Stimulatoren der MMP-Transkription.<sup>100,121,173</sup>

Nicht enzymatisch aktive Pro-MMPs werden nach ihrer Freisetzung von anderen Proteasen wie Plasmin oder MT-MMPs durch Abspaltung der Prodomäne aktiviert.<sup>65</sup> Die Aktivierung der Proenzyme erklärt sich über den sogenannten „Cystein-switch“-Mechanismus, bei dem durch Abspaltung von Zystein das zinkhaltige, aktive Zentrum des Enzyms demaskiert wird.<sup>180</sup> Aktivierte MMPs können durch Interaktionen mit TIMPs spezifisch inhibiert werden.<sup>78</sup> Die Hemmung der MMPs durch TIMPs erfolgt im Verhältnis 1:1 durch eine nicht-kovalente Bindung an das aktive Zentrum der MMPs, so dass die enzymatische Degradation der extrazellulären Matrix blockiert ist.<sup>23,133,164</sup>

Die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes zwischen MMPs und deren Inhibitoren ist essenziell für die Integrität der extrazellulären Matrix.<sup>12</sup> In atherosklerotische Plaques eingewanderte Entzündungszellen und dort freigesetzte Zytokine können zu einer in keinem Verhältnis zu deren Inhibitoren stehenden Anreicherung von MMPs führen und so das Gleichgewicht

## EINLEITUNG

---

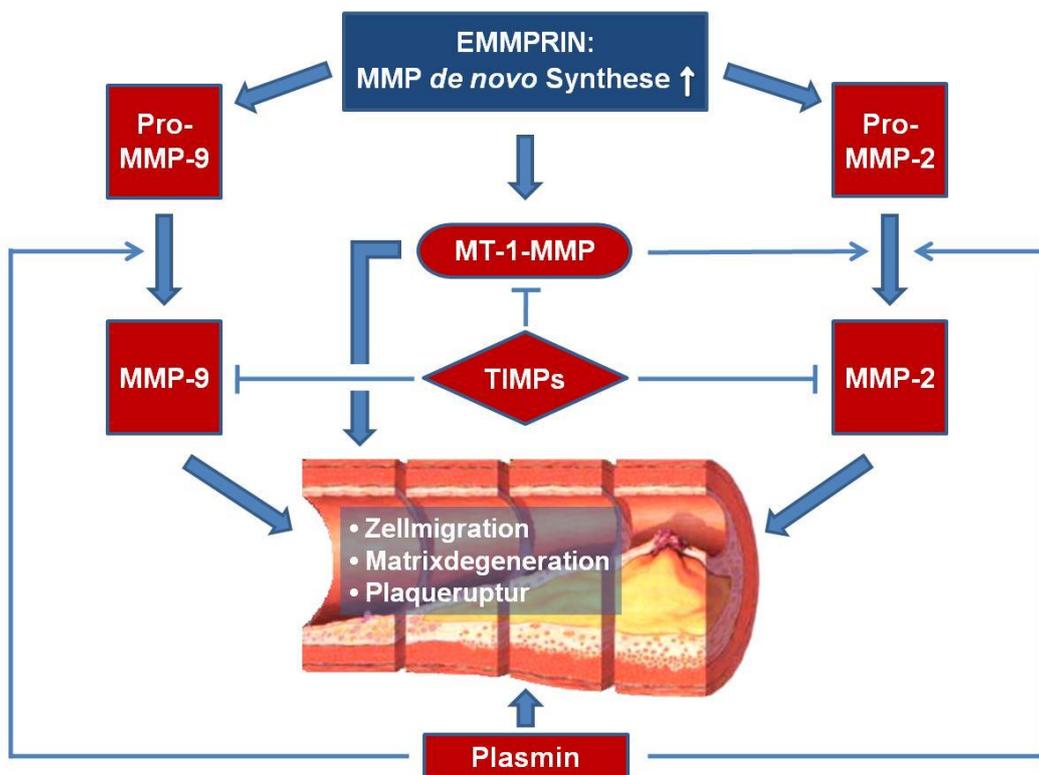
zugunsten der Proteolyse verschieben.<sup>46,67</sup> So konnte in atherosklerotisch veränderten Gefäßen eine erhöhte Expression und Aktivität verschiedener MMPs, vor allem der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9, sowie der membranständigen MT1-MMP, nachgewiesen werden.<sup>24,69,113,142</sup> Es konnte auch gezeigt werden, dass MMPs in allen Stadien entscheidend an der Progression der Atherosklerose beteiligt sind.<sup>47</sup> Eine Freisetzung von MMP-9 aus Monozyten,<sup>7</sup> sowie MMP-2 aus T-Lymphozyten<sup>157</sup> als Folge einer Interaktion mit Endothelzellen ermöglicht die Leukozytenmigration durch Endothel und extrazelluläre Matrix. Diese MMP-vermittelte Zersetzung der endothelialen Basalmembran während der Diapedese inflammatorischer Zellen führt möglicherweise zu einer gestörten Barrierefunktion des Endothels, was die Einlagerung modifizierter Lipoproteine begünstigt.<sup>160</sup> Die Migration glatter Muskelzellen in die Subintima durch die kollagenreiche Lamina elastica interna wird ebenfalls durch die proteolytischen Eigenschaften der MMPs ermöglicht.<sup>14</sup>

Auch Thrombozyten enthalten MMPs. MMP-2 im Zytoplasma und MMP-9 in den  $\alpha$ -Granula, sowohl in ruhendem, wie auch in aktiviertem Zustand. MMP-2 vermittelt nach ihrer Freisetzung aus aktivierten Thrombozyten deren Aggregation, während MMP-9 diesem proaggregatorischen Effekt möglicherweise entgegenwirkt.<sup>55,166</sup> MMP-2 steigert die Menge an GPIIb bei an vWF adhärierenden Thrombozyten,<sup>153</sup> die Freisetzung von thrombozytärem MMP-2 hat eine Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors zu Folge.<sup>138</sup> Durch  $\beta_3$ -Integrin vermittelte Thrombozytenadhäsion an Endothel kann über einen durch CD40L vermittelten Signalweg die endotheliale Expression des Plasminogen-aktivierenden Rezeptors uPAR sowie der MT1-MMP gesteigert und die Aktivität der MMP-1, -2 und -9 erhöht werden.<sup>126</sup>

Die im Rahmen atherosklerotischer Gefäßveränderungen auftretende Interaktion von Monozyten mit Kollagen induziert die monozytäre MMP-9-Synthese, die bei über PSGL-1 vermittelte Aggregatbildung adhärenter Monozyten mit Thrombozyten weiter gesteigert wird.<sup>70</sup> Gerade MMP-9 ist ein hochpotentes matrixabbauendes Enzym, das in der Plaqueschulter vermehrt exprimiert wird und mit Plaquestabilisierung bis zur Ruptur unmittelbar in Verbindung gebracht wird.<sup>115</sup>

## EINLEITUNG

Die charakteristisch in instabilen Plaques gehäuft angesiedelten Schaumzellen stellen die bedeutendste Quelle der MMP-1,-2,-3,-7 und -9 dar.<sup>68,69</sup> Die Freisetzung von MMPs aus Schaumzellen wird unter oxidativem Stress weiter gesteigert.<sup>154</sup> Weitere Stimuli einer MMP-Expression sind Hyperlipidämie,<sup>2</sup> erhöhter transmuraler Druck,<sup>34</sup> Thrombin<sup>66</sup> und mechanische Scherkräfte.<sup>102</sup> Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom lassen sich im Serum erhöhte Spiegel von MMP-2 und MMP-9 nachweisen.<sup>114</sup>



**Abbildung 5** Aktivierungskaskade der Matrix Metalloproteinasen: EMMPRIN induziert die *de novo* Synthese von pro-MMPs. Die Aktivierung kann über die membranständige MT-1-MMP oder andere bereits aktivierte MMPs erfolgen. Ebenso wie MT-1-MMP kann Plasmin selbst extrazelluläre Matrixbestandteile degradieren und latente Matrix Metalloproteinasen in enzymatisch aktive Formen überführen. Diese aktiven MMPs können durch TIMPs inhibiert werden.

### 1.5 Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN)

EMMPRIN, auch bekannt als Basigin,<sup>131</sup> Neurothelin<sup>168</sup> oder CD147<sup>96</sup> ist ein weit verbreitetes N-glykosyliertes Zelloberflächenprotein, das zur Familie der Immunglobuline zählt.<sup>188</sup> Es setzt sich aus zwei extrazellulären, einer transmembranen, sowie einer zytoplasmatischen Domäne zusammen<sup>21</sup> und weist glykosylierungsabhängig ein Molekulargewicht von ungefähr 58 kDa auf. Erstmals wurde EMMPRIN in den 1980er Jahren an der Oberfläche von Tumorzellen nachgewiesen und wurde, aufgrund seiner stimulierenden Wirkung auf die Freisetzung der Kollagenase MMP-1 aus umliegenden Fibroblasten und den Tumorzellen selbst, zunächst als TCSF (Tumor cell-derived collagenase stimulatory factor) bezeichnet.

Erst nach seiner vollständigen Identifizierung wurde das Glykoprotein in EMMPRIN umbenannt,<sup>21</sup> was seine Rolle bei der Freisetzung von Matrix Metalloproteinasen über physiologische und pathologische zelluläre Interaktionen verdeutlichen sollte.<sup>146</sup> EMMPRIN ist an Stimulierung und Aktivierung der MMP-1,-2,-3 und -9, sowie der MT-MMP-1 und -2 maßgeblich beteiligt.<sup>211</sup> Über Stimulation der MMPs ermöglicht EMMPRIN Tumorzellen invasives und metastasierendes Wachstum, vermittelt desweiteren via VEGF-Stimulation eine Induktion der Angiogenese. Interaktionen mit der N-terminalen IgG-Domäne scheinen bei dem noch nicht genau aufgeklärten Mechanismus der EMMPRIN-vermittelten MMP-Aktivierung eine entscheidende Rolle zu spielen.<sup>136,188</sup>

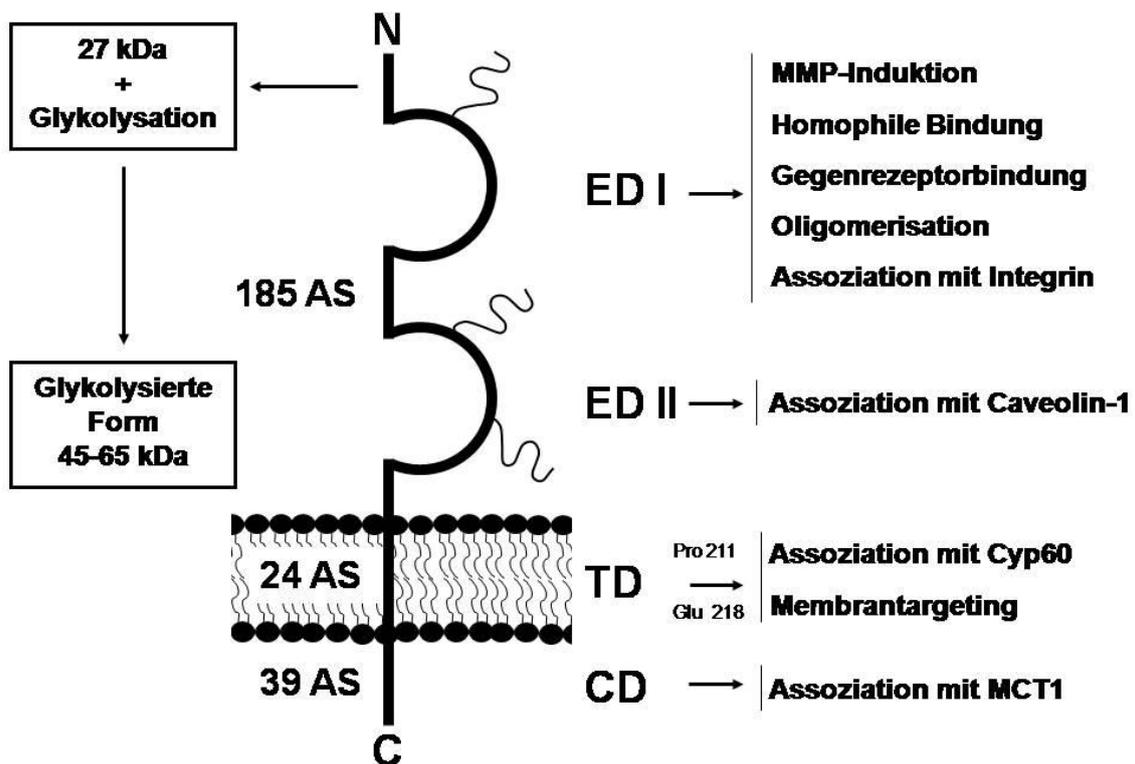
Über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen N-terminalen Domänen bildet EMMPRIN mit anderen EMMPRIN-Proteinen an der Plasmamembran sogenannte Homo-Oligomere aus („Clustering“), was eine MMP-induzierende Wirkung nach sich zieht.<sup>212</sup> EMMPRIN kann bei der MMP-Stimulation aber auch als sein eigener Rezeptor fungieren und mit einem anderen EMMPRIN, ebenfalls an der N-terminalen Domäne, eine homophile Ligand-Rezeptor-Bindung eingehen.<sup>188</sup> Wahrscheinlich auch über diese Domäne interagiert EMMPRIN mit den Integrinen  $\alpha_3\beta_1$  und  $\alpha_6\beta_1$ .<sup>15</sup>

Die zweite extrazelluläre Ig-Domäne kann Verbindungen mit Caveolin-1 eingehen, die das EMMPRIN-„Clustering“ an der Zellmembran und die damit

## EINLEITUNG

verbundene MMP-Aktivierung vermindern,<sup>193</sup> indem die Entstehung hochglykosylierten EMMPRINs verhindert wird.<sup>192</sup> Der Grad der Glykosylierung ist ausschlaggebend für die Aktivierung der MMPs. Deglykosyliertes EMMPRIN induziert keinerlei MMP-Aktivität, sondern antagonisiert sogar die Wirkung natürlich glykosylierten EMMPRINs.<sup>79,91</sup>

Die Oberflächenexpression von CD147 kann infolge einer Interaktion zwischen Prolin 211 der transmembranären CD147-Domäne mit Cyp60 aufreguliert werden, weil diese zu einer effizienten Überführung des Proteins vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran führt.<sup>151</sup> Die zytoplasmatische Domäne wird für die Chaperone-Funktion für Monocarboxylat-Transporter-1 (MCT-1) verantwortlich gemacht.



**Abbildung 6** Aufbau von EMMPRIN: ED I und ED II – erste und zweite extrazelluläre Ig-Domäne; TD – transmembranäre Domäne; CD – zytoplasmatische Domäne. Mit den extrazellulären Domänen sind drei Oligosaccharide verbunden (Modifiziert nach Nabeshima 2006).

## EINLEITUNG

---

Von der Zellmembran freigesetzt werden kann EMMPRIN über proteolytische Abspaltung oder das Abschnüren EMMPRIN-tragender Mikrovesikel.<sup>20,135</sup> Diese Vesikel sind instabil und geben nach raschem Zerfall aktives, frei zirkulierendes EMMPRIN in voller Länge ab.<sup>177</sup>

Die Funktionen von EMMPRIN sind vielfältig. So stimuliert EMMPRIN nicht nur die MMP-Expression, sondern ist darüber hinaus auch an Aktivierung und Interaktion von Immunzellen,<sup>96</sup> dem Eintritt von Viren in Wirtszellen,<sup>152</sup> der Entwicklung des Nervensystems,<sup>50</sup> sowie der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt.<sup>163,169</sup> Eine besondere Bedeutung kommt der Interaktion mit extrazellulärem Cyclophilin A zu, für das EMMPRIN einen hochaffinen Rezeptor darstellt.<sup>217</sup>

Wenngleich viele dieser Funktionen nicht auf die Aufregulierung von MMPs zurückzuführen sind, so bildet die Stimulation der MMP-Expression doch die Grundlage für den Einfluss von EMMPRIN auf Krankheitsbilder wie rheumatoide Arthritis<sup>98,197</sup> und beatmungsassoziierte Lungenschädigung,<sup>58,83</sup> aber vor allem auch auf die Progression der Atherosklerose,<sup>104</sup> sowie deren Folgen wie Myokardinfarkt<sup>171</sup> und Herzinsuffizienz.<sup>112,179</sup>

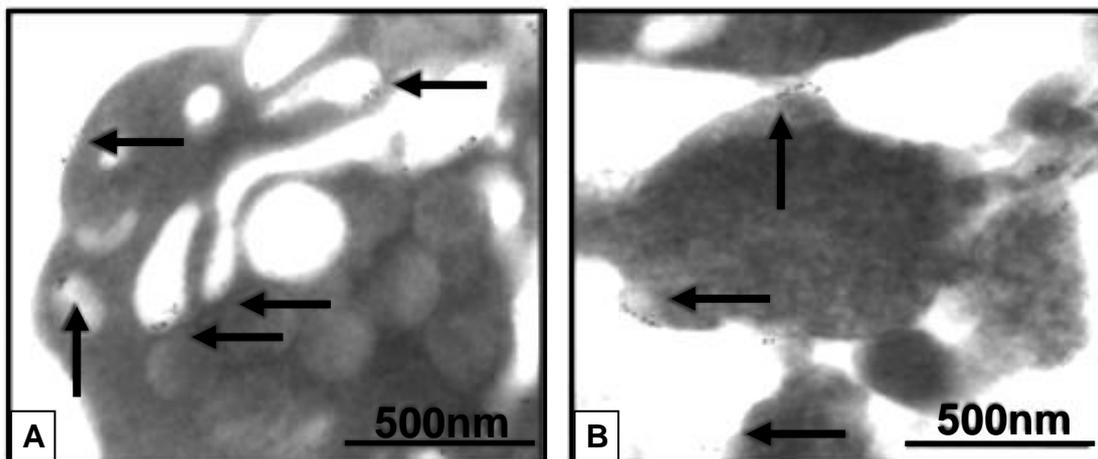
Dabei ist entscheidend, dass EMMPRIN bei gleichzeitiger Aktivierung der MMP-Synthese keinerlei Wirkung auf die Inhibitoren TIMP-1 und -2 zeigt und so das Gleichgewicht in Richtung Proteolyse verschiebt.<sup>30,93</sup>

EMMPRIN wird in makrophagenreicher koronarer Plaque vermehrt exprimiert und scheint bereits in frühen Phasen der direkten Zellmigration eine entscheidende Rolle zu spielen. Über autokrine und parakrine Stimulation der MMP-Freisetzung aus glatten Muskelzellen und Monozyten unterstützt EMMPRIN deren Einwanderung und den Einbau durch M-CSF zu Makrophagen differenzierter Monozyten in den subendothelialen Raum der atherosklerotisch veränderten Gefäßwand.<sup>120</sup> Außerdem konnte EMMPRIN auf glatten Gefäßmuskelzellen von Koronararterien nachgewiesen werden. Oxidativer Stress und in dessen Folge modifizierte Lipoproteine (oxLDL) können zu einer gesteigerten Freisetzung von EMMPRIN, sowie der MMP-1 und -2 aus glatten Koronargefäßmuskelzellen führen.<sup>84</sup>

## EINLEITUNG

---

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass EMMPRIN über zelluläre Interaktionen die MMP-9 in Monozyten und die MMP-2 in glatten Muskelzellen stimuliert.<sup>171</sup> Dass EMMPRIN bei der MMP-vermittelten Plaquestabilisierung mit konsekutiver Ruptur eine entscheidende Rolle spielt, zeigt die Aufregulierung von EMMPRIN mit begleitender MT1-MMP-Aufregulation auf Monozyten, sowie die erhöhte Plasmakonzentration an MMP-9 bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt, was sich nach erfolgreicher Therapie wieder normalisiert.<sup>171</sup> Zuletzt konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass EMMPRIN auch im offenen kanalikulären System und  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten vorkommt und aktivierungsabhängig an der thrombozytären Membran exprimiert wird.<sup>170</sup>



**Abbildung 7** Lokalisation thrombozytären EMMPRINs: Dargestellt ist eine transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme ruhender und Thrombin-stimulierter Thrombozyten. **A** EMMPRIN wird bei ruhenden Thrombozyten im offenen kanalikulären System gespeichert. **B** Werden Thrombozyten stimuliert (Thrombin 0,5 U/ml für 2 Stunden) kommt es zu einer Translokation von EMMPRIN an die Thrombozytenoberfläche (Schmidt 2008).

EMMPRIN-vermittelte Thrombozyteninteraktionen führen über eine homophile EMMPRIN-EMMPRIN-Bindung zur Thrombozytenaktivierung mit Oberflächenexpression von CD40L und P-Selektin. Außerdem induziert eine EMMPRIN vermittelte Thrombozyten-Monozyten-Bindung in Monozyten NF- $\kappa$ B-abhängige inflammatorische Signalwege mit Freisetzung von MMP-9, IL-6 und TNF- $\alpha$ .<sup>170</sup>

### 1.6 Cyclophilin A (CyPA)

CyPA ist ein 1984 erstmals beschriebenes Immunophilin.<sup>57,81</sup> Das weit verbreitet im Zytosol exprimierte Protein stellt den Hauptliganden für das potente Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA) dar.<sup>36,63,111</sup> CyPA wurde anfangs als ein ausschließlich intrazellulär vorkommendes Protein beschrieben. Inzwischen wurde aber gezeigt, dass es sowohl von lebenden Zellen sezerniert, als auch von absterbenden oder schon nekrotischen Zellen freigesetzt werden kann.<sup>89,175,208</sup>

Erhöhte Spiegel extrazellulären Cyclophilins wurden bei unterschiedlichsten inflammatorischen Erkrankungen wie schwerer Sepsis,<sup>195</sup> Schädigung der glatten Gefäßmuskulatur,<sup>89</sup> sowie rheumatoider Arthritis<sup>18</sup> nachgewiesen, wobei im Falle der rheumatoiden Arthritis sogar die Höhe des Cyclophilinspiegels und der Schweregrad der Erkrankung miteinander korrelierten.<sup>18</sup> Dabei hat extrazelluläres CyPA ebenso wie CyPB aufgrund seiner hochpotent chemotaktischen Wirkung auf Monozyten, neutrophile<sup>175,208</sup> und eosinophile Granulozyten,<sup>208</sup> sowie T-Lymphozyten<sup>3</sup> großen Einfluss auf die ablaufenden inflammatorischen Prozesse.

CyPA verfügt über eine Peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase (PPIase)-Aktivität und spielt daher eine bedeutende Rolle bei der Proteinfaltung.<sup>97</sup> Aber auch chemotaktische Eigenschaften von CyPA scheinen entscheidend von dessen PPIase-Aktivität abzuhängen,<sup>144</sup> was durch die Sensitivität der von CyPA induzierten Chemotaxis gegenüber CsA unterstrichen wird.<sup>175</sup>

Unbedingt notwendig für die Übermittlung CyPA-abhängiger Signalwege, über die Chemotaxis und Adhäsion von Immunzellen vermittelt werden, ist CD147/EMMPRIN, das aber nicht als Hauptbindungsstelle für CyPA fungiert.<sup>214</sup> Gebunden wird CyPA an der Oberfläche der Zielzelle zunächst von sogenannten Heparansulfatproteoglykanen (HSPGs), einer Untergruppe der Glykosaminoglykane. Anschließend wird CD147 das gebundene CyPA präsentiert und eine CyPA-CD147-Interaktion ermöglicht.<sup>213</sup> Eine solche Interaktion wird auch bei HIV-1-Infektionen beobachtet, wo CD147 als Rezeptor für das Virion-assoziierte CyPA fungiert und so den Viruseintritt in die Wirtszelle und das „Uncoating“ in dieser unterstützt.<sup>204</sup>

## EINLEITUNG

---

Cyclophilin A spielt aber möglicherweise auch eine Rolle bei der atherosklerotischen Plaquebildung. Extrazelluläres CyPA trägt über Interaktion mit CD147 zur Rekrutierung und anschließenden Akkumulation zirkulierender Leukozyten in entzündlich verändertem Gewebe bei. Dabei wird die leukozytäre CD147-Expression nach deren Eintritt in entzündetes Gewebe herunterreguliert, was deutlich macht, dass CD147 vor allem für Leukozytenrekrutierung während der Phase der Entzündungsreaktion wichtig ist.<sup>8</sup>

CyPA wird während der Atherogenese freigesetzt und lässt sich innerhalb atherosklerotischer Plaques in glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, sowie extrazellulär nahe der Lamina elastica nachweisen.<sup>88</sup> CyPA wird als ein infolge oxidativen Stresses freigesetzter und daher auch als SOXF (secreted oxidative stress-induced factor) bezeichneter Wachstumsfaktor beschrieben, das Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen genauso vorantreibt wie die endotheliale Apoptose.<sup>88,89</sup>

CyPA wird von Monozyten und Makrophagen,<sup>175</sup> sowie von Endothelzellen<sup>95</sup> und glatten Gefäßmuskelzellen<sup>189</sup> infolge verschiedener inflammatorischer Stimuli freigesetzt. Bei diesen Stimuli handelt es sich hauptsächlich um oxidativen Stress und das proinflammatorische Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), einen Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien.<sup>95</sup>

Freigesetztes lösliches CyPA verhält sich wie ein inflammatorisches Zytokin. Es aktiviert den endothelialen NF- $\kappa$ B und induziert in der Folge u.a. eine endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin und VCAM-1. Darüber hinaus fördert CyPA die Migration von Endothelzellen.<sup>88</sup> Allerdings ist nach Untersuchungen von Payeli et al. eine Aktivierung des Endothels durch CyPA abhängig von der gleichzeitigen Anwesenheit von LPS.<sup>144</sup>

Wiederum durch reines CyPA werden Makrophagen zur Freisetzung von IL-6 angeregt, was ursächlich der PPlase-Aktivität von CyPA zugerechnet wird.<sup>143</sup>

Darüber hinaus induziert CyPA bei Monozyten und Makrophagen über die aktivierungsbedingte nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B die Freisetzung von Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1 und IL-1 $\beta$ , sowie der Gelatinase MMP-9.<sup>94</sup>

Bei rheumatoider Arthritis konnte gezeigt werden, dass CD147 bei Monozyten und Makrophagen über direkte Bindung eine CyPA-induzierte Freisetzung von

## EINLEITUNG

---

MMP-9 vermitteln kann.<sup>210</sup> Auf diesem Wege könnte CyPA auch bei der Destabilisierung atherosklerotischer Plaque von Bedeutung sein. Jin et al. konnten bei Patienten mit instabiler Angina pectoris CyPA-Plasmaspiegel zwischen 5 und 100 nM bestimmen.<sup>88</sup>

### 1.7 Fragestellung

Sowohl an der Entstehung atherosklerotischer Plaques, wie auch an deren Progression und Destabilisierung sind verschiedene aus der Blutbahn in die Gefäßwand einwandernde Blutzellen entscheidend beteiligt. Über zelluläre Interaktionen an der Gefäßwand, sowie gegenseitige Aktivierung kommt es dabei zu adhäsiven und proteolytischen Prozessen. Allerdings sind die genauen Mechanismen nach wie vor nicht vollständig verstanden.

Untersuchungen unserer, sowie anderer Arbeitsgruppen in den letzten Jahren haben gezeigt, dass das Glykoprotein EMMPRIN bei der Progression atherosklerotischer Prozesse eine Rolle spielen könnte.<sup>104,171</sup>

Ziel dieser Arbeit war es, EMMPRIN-vermittelte zelluläre Interaktionen zwischen an atherosklerotischen Prozessen maßgeblich beteiligten Zellen und deren mögliche Bedeutung für die Progression der Atherosklerose zu untersuchen. Nachdem unsere Arbeitsgruppe erst kürzlich EMMPRIN aktivierungsabhängig auch auf Thrombozyten nachweisen konnte,<sup>170</sup> sollte nun untersucht werden, ob EMMPRIN neben seiner Funktion als Signalrezeptor auch direkten Einfluss auf thrombozytäre Adhäsionsprozesse unter arteriellen Flussbedingungen hat und über welchen Mechanismus diese reguliert werden.

Ebenfalls Gegenstand von Untersuchungen dieser Arbeit war Cyclophilin A als einer der bedeutendsten Liganden von EMMPRIN. Unter der Vorstellung, dass CyPA auszugrunde gehenden Zellen atherosklerotischer Plaques freigesetzt wird und mit ko-lokalisiertem EMMPRIN interagieren könnte, war von Interesse, wo in der Plaque sich EMMPRIN und CyPA nachweisen ließen. Darüber hinaus sollte gezeigt werden, inwiefern das bei unterschiedlichsten Erkrankungen als inflammatorischer Stimulus nachgewiesene CyPA<sup>18,89,195</sup> auch an proteolytischen Prozessen innerhalb der Plaque, sowie der thrombozytären Aktivierung beteiligt ist und ob diese Mechanismen ebenfalls EMMPRIN-abhängig ablaufen.

Zusammenfassend sollten über die Identifikation neuer Mechanismen zellulärer Wechselwirkungen mögliche Ansatzpunkte präventiver und therapeutischer Intervention bereits in der Phase der Progression atherosklerotischer Plaques aufgezeigt werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Aggregometer	ChronoLog, Leiden, Niederlande
Biosensor (SD C 80 m)	XanTec Bioanalytics, Münster
Brutschrank Hera Cell 240	Hereaus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA Lesegerät Microplate Reader 550	BioRad, München
Eppendorf-Cup-Ständer	Brand, Wertheim
Falconständer	Brand, Wertheim
IKAMAG RCT basic Magnetrührer	IKA Werke, Staufen
IKA HS 260 Basic	IKA Werke, Staufen
Lichtmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Novex Elektrophorese-Mini-Zellkammer	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Objektträger	Brand, Wertheim
Optisches 2-Kanal-Messungssystem (Ibis)	XanTec Bioanalytics, Münster
Parallel plate flow chamber (Flusskammer)	Oligene, Berlin
Perfusor fm	Braun, Melsungen
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl a.R.
Pipette Eppendorf research	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Accu Jet Pro	Brand, Wertheim
Sterilbank HERAsafe	Hereaus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Transferpipette	Becton Dickinson, Heidelberg
Tischzentrifuge Megafuge 1.0R	Hereaus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Vakuumpumpe	Saur Laborbedarf, Reutlingen
Zellzählautomat Se 9000	Sysmex, Kobe, Japan

## MATERIAL UND METHODEN

---

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Aggregometerdiagramm-Rollen 230 mm	ChronoLog, Leiden, Niederlande
Amin-Bindungs-Kit (EDC/NHS)	XanTec Bioanalytics, Münster
Butterfly Multifly Set	Braun, Melsungen
Cellophane, large	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
CPDA-Monovetten	Sarstedt, Nürnberg
Einmalspritze (20 ml)	Braun, Melsungen
ELISA 96-Loch-Platte	Dynx, Chantilly, USA
Eppendorf Cups	Eppendorf, Hamburg
FACS-Rundbodenröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon-Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Filter-Einheit 0,22 µm Millex GS	Millipore, Bedford, USA
Glaspasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Costar, Bodenheim
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Gewebekulturplatten 6-, 96-wells (Löcher)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Glasdeckplättchen 25 mm	Glaswaren Hecht, Sondheim
Glasküvette 450 µl	ChronoLog, Leiden, Niederlande
Membranadapter	Sarstedt, Nürnberg
Multiflex 0,5-200 µl Ecoflex Tips	Roth, Karlsruhe
Perfusorspritzen 50 ml	Braun, Melsungen
Rührstäbchen	ChronoLog, Leiden, Niederlande
Transferpipetten (3 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Costar, Bodenheim
Zymogramm (Gelatin-) Gel 10%	Gibco Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.3 Lösungen, Medien, Reagenzien

Acetyliertes LDL, human	Bio Trend, Köln
ADP 2,5 mg 1mM	ChronoLog, Leiden, Niederlande
Anti-Dig-POD (poly) Fab 1:3000	Roche, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
BM Blue POD	Roche, Mannheim

## MATERIAL UND METHODEN

---

Bovines Serumalbumin Fraktion V 96%	Sigma, St.Louis, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )-Dihydrat	Sigma, St.Louis, USA
Citratpuffer	Thermo Fisher, Fremont, USA
Coomassie Brilliant Blue	BioRad Laboratories, CA, USA
Diaminobenzidin (DAB)-Lösung	Dako, Glostrup, Dänemark
Destilliertes Wasser	Millipore, Bedford, USA
Developing buffer 10x (Entwicklungspuffer)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
D (+)-Glukose, wasserfrei	Sigma, St.Louis, USA
Drying Solution	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Eselserum	Sigma-Aldrich, München
Fetales Kälberserum	PAA, Pasching, Österreich
Ficoll Trennlösung	Biochrom, Berlin
Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
N-2-Hydroxyethylpiperazin- N'-2-Ethansulfonsäure(HEPES)	Roth, Karlsruhe
Hygromycin B-Lösung	Merck, Darmstadt
Kaninchenserum	Dako, Glostrup, Dänemark
Kollagen I	Sigma-Aldrich Chemie, München
L-Glutamin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
3-N-Morpholino-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Sigma, St.Louis, USA
Nicht essentielle Aminosäuren	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Nonidet P-40 (Igepal CA-630)	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd 1%	Merck, Darmstadt
Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung, PBS)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe

## MATERIAL UND METHODEN

---

Renaturation buffer 10x (Renaturierungspuffer)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Roti-Block	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 25%	Merck, Darmstadt
Sodium dodecyl sulfat (Natriumdodecylsulfat, SDS)	Sigma, St.Louis, USA
See Blue Plus 2	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Sodiumpyruvat	Biochrom, Berlin
StreptABComplex/HRP	Dako, Glostrup, Dänemark
Tris 1M pH 6,8	Sigma, St.Louis, USA
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
VLE RPMI 1640-Medium	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, München
Zitronensäure	Sigma, St.Louis, USA

### 2.1.4 Puffer, Zellmedien

ACD-Puffer: 12,5 g Natriumcitrat  
6,82 g Zitronensäure  
10 g Glukose  
Aqua dest. ad 500 ml und mit NaOH auf pH 4,6 einstellen

CHO-Zell-Medium: 445ml Ham`'s F-12  
50 ml Fetales Kälberserum (10%)  
5 ml Penicillin-Streptomycin (1 %)

ELISA-Puffer-Lösung: 15 mM Dinatriumcarbonat (Soda)  
35 mM Natriumhydrogencarbonat  
auf pH 9,6 einstellen

Monozyten-Medium: 450 ml VLE RPMI 1640  
50 ml Fetales Kälberserum (10%)

## MATERIAL UND METHODEN

---

Nicht-reduzierender Probenpuffer (5x): 2,08 ml 1M Tris pH 6,8  
3,33 ml 20% SDS  
3,33 ml Glycin  
1,67 ml Aqua dest.  
Bromphenolblau

Schaumzellmedium: 380 ml VLE RPMI 1640  
100 ml humanes Serum (20%)  
5 ml nicht essentielle AS (1%)  
5 ml Sodumpyruvat (1%)  
5 ml L-Glutamin (1%)  
5 ml Penicillin-Streptomycin (1%)

SDS-Kammer-Laufpuffer (10x): 144 g Glycin (192 mM)  
30 g Tris (25 mM)  
10 g SDS ultra pure  
Aqua dest. ad 1000 ml und auf 65°C erhitzen

SPR-Bindungspuffer: 10 mM MOPS  
0,3 mM EDTA  
1,43 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
0,001% (v/v) Nonidet P-40 (Igepal CA-630)

Tyrodes-Puffer (10x): 80 g Natriumchlorid  
10,15 g Natriumhydrogencarbonat  
1,95 g Kaliumchlorid  
Aqua dest. ad 1000 ml

Tyrodes-Gebrauchslösung: 20 ml Tyrodes-Puffer (10x)  
0,2 g BSA  
0,2 g Glukose  
Aqua dest. ad 200 ml  
mit HEPES auf pH 7,4 einstellen, 50 ml  
abnehmen, den Rest mit HCl auf pH 6,5

## MATERIAL UND METHODEN

---

### 2.1.5 Rekombinante Proteine

Cyclophilin A, human	R&D Systems, Minneapolis, USA
Fc	Procorde GmbH, Martinsried
Fc, Digoxigenin-gefärbt	Procorde GmbH, Martinsried
GPVI-Fc	Procorde GmbH, Martinsried
GPVI-Fc, Digoxigenin-gefärbt	Procorde GmbH, Martinsried
EMMPRIIN-Fc	Procorde GmbH, Martinsried

### 2.1.6 Antikörper

#### Blockierende Antikörper:

<u>Blockierende Antikörper:</u>	<u>Klon:</u>	
Anti-human CD41	P2	Immunotech, Marseille, France
Anti-human CD49d	HP2/1	Immunotech, Marseille, France
Anti-human CD62P	G1/G1-4	Ancell, Bayport, USA
Anti-human CD147	UM-8D6	Ancell, Bayport, USA
Anti-human GPVI	5C4-Fab	Procorde GmbH, Martinsried
IgG <sub>1</sub> Isotypkontrolle	15H6	Biozol Diagnostica, Eching

#### Primärantikörper:

<u>Primärantikörper:</u>	<u>Klon:</u>	
Anti-human CD62P-FITC (Maus)	AK-4	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD147-FITC (Maus)	HIM6	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human GPVI (Maus)	4C9	Procorde GmbH, Martinsried
Anti-human SDF-1	79014	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-mouse CyPA (Kaninchen)		Abcam, Cambridge, UK
Anti-mouse CD147 (Ratte)		Abcam, Cambridge, UK
IgG <sub>1</sub> -FITC (Maus)	MOPC-21	Becton Dickinson, Heidelberg

#### Sekundärantikörper:

Anti-IgG <sub>1</sub> [Kaninchen], biotinyliert (Esel)	Amersham/GE, Freiburg
Anti-IgG <sub>1</sub> [Ratte], biotinyliert (Kaninchen)	Dako, Glostrup, Dänemark

## MATERIAL UND METHODEN

---

### 2.1.7 Zelllinien

CHO-F-Zellen	ProcordeGmbH, Martinsried
CHO-GPVI-Zellen	Procorde GmbH, Martinsried
CHO-EMMPRIN-Zellen	Procorde GmbH, Martinsried
Humane Monozyten	Gesunde humane Spender
Humane Thrombozyten	Gesunde humane Spender

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Thrombozytenisolation

Entsprechend der benötigten Menge an Thrombozyten wurde zunächst in vorher jeweils mit 4 ml ACD-Puffer befüllte 20 ml-Spritzen Blut abgenommen und dieses anschließend zu je 10 ml in 15 ml-Falcons überführt. Es folgte der erste Zentrifugationsschritt (210 g, 20 min, RT, ohne Bremse). Das gewonnene plättchenreiche Plasma (PRP) wurde mit einer Transferpipette an der Oberfläche abgenommen, zu maximal 10 ml pro Falcon in 50 ml-Falcons pipettiert und mit Tyrodes-Gebrauchslösung mit pH 6,5 auf ein Gesamtvolumen von 35 ml aufgefüllt.

Nach einer weiteren Zentrifugation (840 g, 10 min, RT, Bremse) konnte der Überstand dekantiert werden. Das verbliebene Thrombozytenpellet wurde mit 500 µl Tyrodes pH 6,5 resuspendiert, weitere 500 µl Tyrodes pH 7,4 hinzugeben und beides vermischt. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge an Tyrodes pH 7,4 die Thrombozytenkonzentration im hergestellten Isolat auf eine Konzentration von  $2 \times 10^8$ /ml eingestellt. Vor der experimentellen Verarbeitung des Thrombozytenisolates wurden noch jeweils 1 mmol/l  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$  zugegeben.

### 2.2.2 Monozytenisolation

Die Isolation humaner Monozyten aus Vollblut erfolgte durch Zentrifugation über einem sogenannten Ficollgradienten mit anschließender Selektion durch Zelladhäsion. Hierzu wurde zunächst eine genaue Menge Blut in CPDA-Monovetten zu je 8,5 ml abgenommen. Nachdem in 50 ml-Falconröhrchen jeweils 25 ml Ficoll-Trennlösung vorgelegt worden war, wurde diese mit derselben Menge CPDA-Blut vorsichtig überschichtet ohne dass sich die beiden Phasen miteinander vermischten.

Es folgte eine 17-minütige Zentrifugation (920 g, RT, ohne Bremse). Der entstandene milchig trübe Intermediärring enthielt vor allem monozytäre Zellen und Lymphozyten.

Dieser Intermediärring wurde mit einer sterilen Transferpipette abgenommen, in ein neues 50 ml-Falconröhrchen überführt und durch Auffüllen desselben mit PBS, sowie anschließender Zentrifugation (535 g, 10 min, RT, Bremse) "gewaschen". Derselbe Vorgang wurde in der Folge noch ein weiteres Mal wiederholt.

Um vitale Monozyten zu selektieren, wurde deren Eigenschaft ausgenutzt, im Gegensatz zu Lymphozyten unter Ausbildung von Pseudopodien an Plastikoberflächen zu adhären. Dazu wurde das gewonnene Zellpellet mononukleärer Zellen in 20 ml Monozytenmedium aufgenommen und gleichmäßig auf die Kammern einer 6-Loch-Gewebekulturplatte verteilt. Nach einer 12-stündigen Inkubation bei 37°C erfolgte eine mikroskopische Kontrolle. Anschließend wurde das Medium mitsamt den in Suspension verbleibenden Lymphozyten abgenommen, sowie weitere nicht adhärenente Lymphozyten durch vorsichtiges Spülen mit PBS unter wiederholter mikroskopischer Kontrolle entfernt. Die adhärenenten Monozyten wurden mit Trypsin-EDTA abgelöst und nach Zugabe von PBS durch Resuspendieren möglichst schonend vom Boden gelöst. Ein vollständiges Ablösen der Monozyten wurde im Anschluss mikroskopisch sichergestellt.

Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS, konnten die Monozyten gezählt und in gewünschter Konzentration in Monozytenmedium aufgenommen werden.

### 2.2.3 CHO-Zellkultivierung

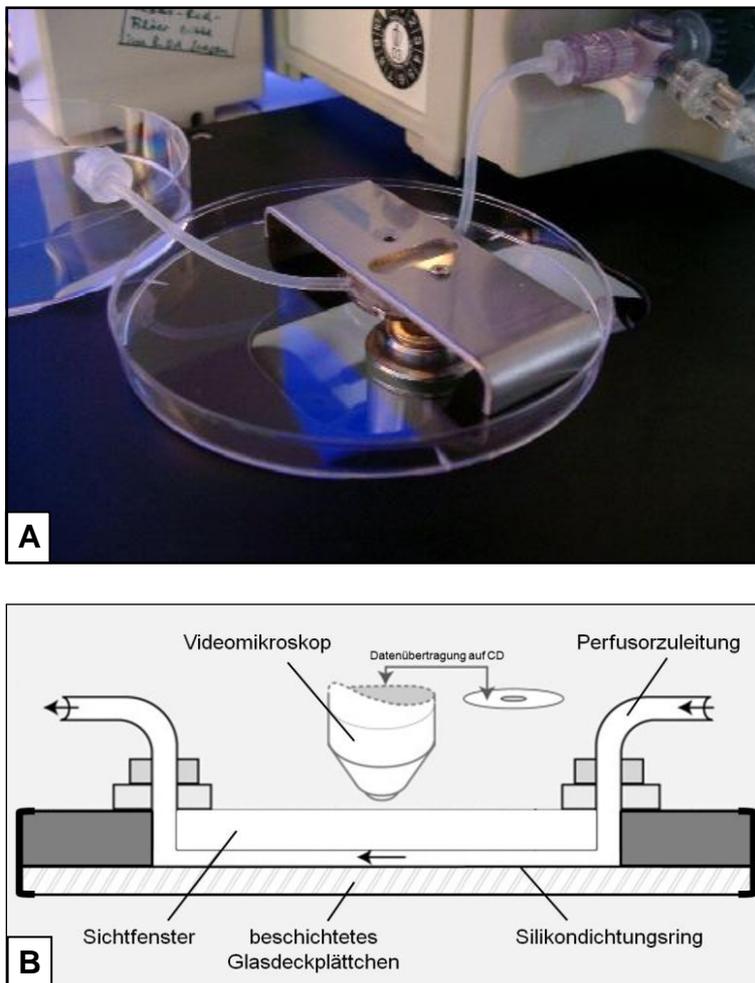
Die den Beschreibungen in Vorarbeiten entsprechend mit Glykoprotein VI oder EMMPRIN transfizierten bzw. nicht transfizierten CHO-Zellen<sup>124</sup> wurden mit CHO-Zell-Medium zu einem Gesamtvolumen von 25 ml in eine Zellkulturflasche gegeben und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Ab der zweiten Passage wurde der Zellkultur 500 µg/ml Hygromycin zugegeben. Das Wachstum der angelegten Kultur wurde einmal täglich mikroskopisch beurteilt. Waren die CHO-Zellen "konfluent", konnten sie abgelöst und experimentell verwendet werden. Zunächst wurde hierzu der Überstand aus der Zellkulturflasche vollständig abgezogen und mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin-EDTA über die anheftenden Zellen gegeben und für 1-2 min inkubiert. Nachdem die Zellkulturflasche danach kräftig beklopft worden war, wurde die erfolgreiche Ablösung der CHO-Zellen vom Flaschenboden mikroskopisch kontrolliert. Mit 5 ml Medium wurde das trypsinhaltige Zelllysat abgespült und der Flascheninhalt in ein 50 ml-Falcon überführt. Anschließend wurden die Zellkulturflasche mit 5 ml PBS ausgespült, dieses abgenommen und ebenfalls in den 50 ml-Falcon gegeben. Das Falcon wurde mit 300 g für 5 min bei RT mit Bremse zentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes das Zellpellet aus CHO-Zellen in 1 ml Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde dann nach Trypan-Blau-Färbung mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### 2.2.4 Flusskammer

Mit der Flusskammer lassen sich im arteriellen Endstromgebiet auftretende strömungsbedingte Scherkräfte in vitro simulieren und auf diese Weise unter dynamischen Bedingungen ablaufende zelluläre Interaktionen in einem realitätsnahen Modell untersuchen. Der Flusskammerversuchsaufbau ist nach oben von einer Plexiglasscheibe und nach unten von einem austauschbaren Glasdeckplättchen begrenzt, das zur Untersuchung von Zell-Matrix-Interaktionen unterschiedlich beschichtet werden kann. Aber auch Zellen wie Thrombozyten können auf den Glasdeckplättchen kultiviert und so Zell-Zell-Interaktionen untersucht werden.

## MATERIAL UND METHODEN

Mittels Perfusor kann die Kammer gleichmäßig mit in Medium gelösten Zellen perfundiert werden. Um Bedingungen wie in einem arteriellen Endstromgebiet zu schaffen, wurde bei 37°C und einem pH von 7,4 die Flussgeschwindigkeit des Perfusors so gewählt, dass die Scherrate bei allen Versuchen der Scherrate bei arteriellem Fluss ( $2000\text{ s}^{-1}$ ) entsprach. Die ablaufenden zellulären Interaktionen wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop (Axiovert 200) vergrößert und nach Aufzeichnung mittels digitaler Videokamera in einem definierten Sichtfeld ausgewertet.



**Abbildung 8** Versuchsaufbau einer dynamischen Flusskammeruntersuchung: Mittels Perfusor werden die zu untersuchenden Zellen in der entsprechenden Konzentration mit einer Flussgeschwindigkeit entsprechend der arteriellen Abscherungsrate über beschichtete Glasdeckplättchen perfundiert. Das Verhalten von Zellen unter Fluss wird mit einem Videomikroskop aufgezeichnet. **A** Fotografie (Stolla 2008). **B** Schema (Modifiziert nach Oligene, Berlin 2006).

### 2.2.4.1 Beschichtung der Deckgläser

Die Deckgläser wurden zunächst zu je einem Glas pro Loch (engl. well) auf 6-Loch-Platten verteilt, die Löcher mit Alkohol gefüllt und für eine Stunde stehen gelassen. Danach wurden die Deckgläser über offener Flamme getrocknet. Im Anschluss wurden die Deckgläser dann in PBS-gefüllte Löcher einer 6-Loch-Platte eingelegt, denen je nach gewünschter Beschichtung 5 µg/ml Fc-Fragment humanen Immunglobulins G oder 25 µg/ml GPVI- bzw. EMMPRIN-Fc zugegeben worden waren. Nach einstündiger Inkubation wurden die Deckgläser dann an der Luft getrocknet.

### 2.2.4.2 Vorinkubation mit blockierenden Antikörpern

Um Wechselwirkungen, die möglicherweise von bestimmten thrombozytär exprimierten Proteinen vermittelt werden, möglichst spezifisch inhibieren zu können, wurden die entsprechenden Thrombozyten vor Versuchsbeginn für 30 Minuten mit dem entsprechenden blockierenden Antikörper vorinkubiert. Es handelte sich dabei um die blockierenden Antikörper für 62P-Selektin, Glykoprotein IIb/IIIa, Glykoprotein VI, EMMPRIN oder den irrelevanten Kontrollantikörper für  $\alpha$ 4-Integrin. Die Antikörper wurden jeweils in einer Konzentration von 5 µg/ml zugegeben.

### 2.2.5 Aggregometrie

Die Aggregometrie ist ein photometrisches Messverfahren, bei dem mit Hilfe eines Schreibers der Grad der Thrombozytenaggregation als Änderung der optischen Dichte in einem zu bestimmenden Thrombozytenmedium in Form einer Kurve aufgezeichnet wird. Dabei ist entscheidend, dass die optische Dichte einer Partikelsuspension nicht von der Größe, sondern von der Zahl der Partikel abhängig ist. Je stärker die Thrombozyten in dem plättchenreichen Plasmamedium aggregieren, desto mehr erhöht sich dessen Lichtdurchlässigkeit. Dies wiederum hat einen Anstieg der Messkurvenamplitude zur Folge. Ebenfalls im Strahlengang des Photometers befindet sich eine Referenzküvette mit plättchenarmem Plasma, welche den 100%-Wert der

## MATERIAL UND METHODEN

---

Lichttransmission wiedergibt. Das PRP dagegen bezeichnet vor Zugabe des Agonisten bzw. des zu untersuchenden Agens den Nullwert der Lichttransmission. Für je drei aggregometrische Messansätze werden ungefähr 10 ml Citratblut benötigt, was einer gefüllten Monovette entspricht.

Nach Blutabnahme wurden die Citratblutmonovetten 10 min bei Raumtemperatur mit 210 g ohne Bremsezentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde das plättchenreiche Plasma abgehoben und die Thrombozytenkonzentration bestimmt. Anschließend wurde der Blutkuchen einschließlich eines belassenen Überstandes von ungefähr 200 µl erneut zentrifugiert, 10 min bei Raumtemperatur mit 2560 g und Bremse. 500 µl des im zweiten Zentrifugationsschritt gewonnenen PPP wurde in die Referenzküvette gegeben. Das verbliebene PPP wurde zur Verdünnung des PRP auf eine Konzentration von 200.000 Thrombozyten/µl verwendet. Unter konstanter Rührung mit 1000 rpm durch einen der Messküvette beigefügten Rührfisch wurde nach zwei Minuten der Plättchenagonist bzw. das zu untersuchende Agens dem PRP zugegeben und der Kurvenverlauf der nächsten fünf Minuten aufgezeichnet. Bewirkt die zugegebene Substanz eine Aggregation der Thrombozyten, so lässt sich dies anhand der ansteigenden Aggregationskurve infolge der abnehmenden Lichttransmission des PRP feststellen. Die ansteigende Aggregationskurve kann als Ausdruck der primären, noch reversiblen Aggregation im weiteren Verlauf entweder wieder zurückgehen (Deaggregation) oder bei sekundärer irreversibler Aggregation ein Plateau erreichen.

### 2.2.6 ELISA: GPVI-EMMPRIN-Bindungsversuch

Zunächst wurden die ELISA 96-Loch-Platten jeweils mit 250 nM Fc-EMMPRIN oder Fc-Kontrollprotein in Puffer zu je 100 µl/Loch beschichtet und über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Nachdem die Löcher danach mit 300 µl/Loch PBS gewaschen worden waren, wurden sie bei erneut 4°C über Nacht mit 300 µl Roti-Block pro Loch blockiert. Am nächsten Tag wurden die Löcher einmal mit 300 µl/Loch PBS gewaschen und verschiedene Konzentrationen von Digoxigenin-gefärbtem Fc-GPVI oder Fc-Kontroll-Protein zugegeben.

Nach einstündiger Inkubation wurden die Löcher mit jeweils 300 µl PBS fünfmal ausgewaschen, je 100 µl Anti-Dig-POD (poly) Fab zugegeben und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wusch man die Löcher erneut fünfmal mit je 300 µl PBS aus und gab in jedes Loch 100 µl gelöstes BM Blue POD Substrat. Nach fünfminütiger Inkubation wurden jedem Loch 100 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugegeben. Die nun folgende Absorptionsmessung wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gegenüber einer Referenzwellenlänge von 690 nm durchgeführt.

### 2.2.7 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)

Die SPR (surface plasmon resonance)-Spektroskopie ist eine Technik zur zeitaufgelösten Messung von Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen mit der Möglichkeit zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten zwischen Ligand und Rezeptor. Dabei bietet die SPR-Spektroskopie zwei besondere methodische Vorteile: Zum einen ist keinerlei, die Moleküleigenschaften möglicherweise verändernde Markierung (Labeling) der Bindungspartner notwendig. Zum anderen können, obwohl ein Bindungspartner auf der Oberfläche immobilisiert werden muss, in wässrigen Systemen Bindungsereignisse unter nahezu physiologischen Bedingungen detektiert werden.<sup>72</sup>

In diesem Fall sollte das Bindungsverhalten zwischen EMMPRIN und GPVI untersucht werden.

Für die Messung war es notwendig, einen Bindungspartner (hier GPVI) auf der Oberfläche eines Sensorchips zu immobilisieren. Die Immobilisation von GPVI erfolgte auf einem 80 nm dicken carboxylierten Hydrogelchip von mittlerer Dichte (Biosensorchip SD C 80 m). Die kovalente Bindung zwischen den Carboxyl-Gruppen der Chipoberfläche und den Amin-Gruppen des Proteins GPVI wurde durch ein Amin-Bindungs-Kit (EDC/NHS) gewährleistet. Um die Dissoziationskonstante  $K_d$  festlegen zu können wurden verschiedene Konzentrationen in Bindungspuffer gelösten EMMPRINs, eingestellt auf einen pH von 7,0, bei einer Temperatur von 20°C dem Zelldetektor zugeführt.

Die Interaktionen zwischen den untersuchten Proteinen wurden in der Folge für 400 s in einem optischen Zwei-Kanal-Messungssystem (Ibis) analysiert.

Nach Abschluss jedes Bindungsversuches wurde die Sensoroberfläche durch Inkubation mit 1 M NaCl von verbliebenen Liganden befreit und wieder in ihren Ausgangszustand überführt (Regeneration).

Die Daten wurden mit einer Kinetik-Berechnungssoftware ausgewertet und die kinetischen Parameter der entsprechenden Assoziationsphase mittels nicht-linearer Regressionsanalyse aus den jeweiligen Werten ermittelt.

Alle Messungen wurden am Institut für klinische Pharmakologie der Universität Ulm unter der Leitung von Herrn Professor Simmet durchgeführt.

### 2.2.8 Durchflusszytometrie (FACS)

Die FACS-Analyse (fluorescence-activated cell sorting) ist ein Verfahren, das eine schnelle, sowie objektive Charakterisierung und Zählung von Zellen unterschiedlichen Typs ermöglicht. Passieren die Zellen den Laserstrahl des Gerätes, so emittiert jede Zelle ein Streulicht, das durch Zellgröße, Struktur und Oberflächeneigenschaften der Zellmembran sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst wird.

So erlaubt das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) eine Aussage über die relative Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) charakterisiert die Granularität (Größe und Struktur der Zellorganellen) oder die Oberflächenbeschaffenheit der Zellen. Durch Anfärbung der zu analysierenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern lassen sich einzelne Antigene, sowie Oberflächenstrukturen spezifisch nachweisen und quantifizieren. Entsprechend fluoreszierende Farbstoffe sind beispielsweise Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE). Diese werden vom monochromatischen Licht des Lasers angeregt und in deren spezifischer Wellenlänge emittiert. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Anzahl der von einer Zelle entsprechend ihrer Oberflächenantigene spezifisch gebundener farbstoffkonjugierter Antikörper zu.

### 2.2.8.1 Durchflusszytometrische Analyse (FACS) der CHO-Zellen

Nachdem die „abtrypsinierten“ Zellen in der Neubauer Zählkammer gezählt und danach mit 300 g für 5 min bei Raumtemperatur (RT) mit Bremse abzentrifugiert worden waren, wurden sie mit PBS in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  CHO-Zellen/100  $\mu$ l aufgenommen. Anschließend wurden die CHO-Zellen, entsprechend CHO-GPVI oder CHO-EMMPRIN und jeweils die nicht transfizierten CHO-Zellen CHO-F zu je 100  $\mu$ l in die FACS-Röhrchen gegeben und je 10  $\mu$ l des entsprechenden FACS-Antikörpers bzw. der Isotypkontrolle IgG<sub>1</sub> hinzugegeben.

Nach 15-minütiger Inkubation, abgedunkelt bei RT, wurde jedem FACS-Röhrchen 1 ml PBS zugegeben und nach kurzem Vortexen für 5 min mit 300 g bei RT zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes und dem Auffüllen des Pellets mit 300  $\mu$ l PFA, konnten die CHO-Zellen durchflusszytometrisch auf ihre erfolgreiche Transfektion mit GPVI bzw. EMMPRIN bzw. auf die Expression des entsprechenden Proteins überprüft werden.

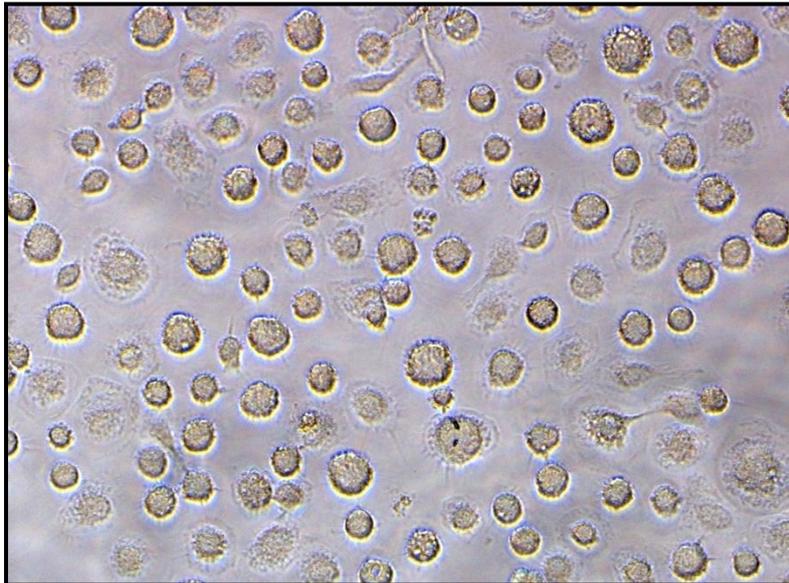
### 2.2.8.2 Durchflusszytometrische Analyse (FACS) der Thrombozyten

Nach einer möglichst schonenden Thrombozytenisolation gemäß Beschreibung (siehe 2.2.1) wurden jeweils  $1 \times 10^6$  in Tyrodes pH 7,4 gelöste Thrombozyten auf die FACS-Röhrchen verteilt. Anschließend wurden die Thrombozyten entweder zunächst noch für 30 min mit einem blockierenden Antikörper inkubiert oder direkt das Stimulanz bzw. die entsprechende Negativkontrolle zugegeben und das FACS-Röhrchen, nachdem mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l je Röhrchen aufgefüllt, für ebenfalls 30 min inkubiert. Danach wurde jedem Röhrchen jeweils 1 ml PBS zugegeben und mit 300 g bei RT 5 min zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurden die Proben in einem verbleibenden Volumen von je 100  $\mu$ l mit 20  $\mu$ l des entsprechenden fluoreszenzkonjugierten Antikörpers bzw. der äquivalenten Menge der entsprechenden Isotypkontrolle 30 min inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden jeweils 300  $\mu$ l PFA zugegeben und die Proben am FACSCalibur durchflusszytometrisch gemessen.

### 2.2.9 Schaumzellkultivierung

Zunächst waren Monozyten wie beschrieben zu isolieren (siehe 2.2.2). Allerdings war es nicht notwendig, diese in adhärenter Form nach nächtlicher Inkubation von den 6-Loch-Platten zu lösen. Vielmehr konnte nach Abnehmen des Mediums und zweimaligem Waschen mit PBS direkt speziell hergestelltes Schaumzellmedium (siehe 2.1.4) hinzu gegeben werden.

Nach einwöchiger Inkubation in Schaumzellmedium hatten sich die Monozyten zu Makrophagen differenziert, was mikroskopisch überprüft wurde. Danach erfolgte ein Mediumwechsel und dem neu zugegebenen Schaumzellmedium wurden 80 µg/ml acetyliertes LDL zugegeben. Nach weiteren drei Tagen erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der erfolgreichen monozytären Differenzierung zu Schaumzellen.



**Abbildung 9** Aus Monozyten kultivierte Schaumzellen: Makrophagen monozytären Ursprungs können sich durch Aufnahme von acetyliertem LDL innerhalb weniger Tage zu Schaumzellen differenzieren. Dargestellt ist ein repräsentatives lichtmikroskopisches Bild ausdifferenzierter Schaumzellen bei 20-facher Vergrößerung.

### 2.2.10 Zymographie

Bei einer SDS-Page-Gelatinzymographie werden die zugegebenen zu charakterisierenden Proteine zunächst denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die auf das Gel aufgetragenen Gelatine abbauenden Enzyme (Gelatinasen) wandern entlang eines angelegten elektrischen Gradienten in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes (MMP-2 ~72 kDa, MMP-9 ~92 kDa), um nach ihrer Renaturierung das dem Gel zugesetzte Substrat Gelatine in ihrer Umgebung während der folgenden 12-stündigen Inkubation bei 37°C abzubauen. Aus dem Umfang des abgebauten Substrats ist eine quantitative Aussage zur Enzymaktivität ableitbar. Zur Negativ-Darstellung kommen abgebaute Gelareale nach Färbung mit Coomassie-Blau.

Zunächst wurden je 10 µl der gewonnenen Zellkulturüberstände im Verhältnis 1:1 mit denaturierendem (nicht-reduzierendem) Probenpuffer inkubiert, während die Novex-Mini-Zellkammer mit 10%igen Gelatingelen bestückt und mit auf 4°C gekühltem SDS-Laufpuffer aufgefüllt wurde. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur waren die in den Überständen enthaltenen Proteasen reversibel inaktiviert und die Proben konnten, genauso wie das als Marker dienende See Blue Plus 2 in die Geltaschen pipettiert werden. Die Kammer wurde anschließend verschlossen und bei 4°C eine Spannung von 80 Volt angelegt. Zeigten 64er und 98er Bande beim Marker eine gute Auftrennung (ca. 2 cm), wurden die Gele aus den Kammern genommen und nach zweimaligem Waschen in Aqua dest. für 30 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur in Renaturierungspuffer inkubiert. Darunter wurden die Proteasen wieder in ihre ursprünglich enzymatisch aktive Form überführt. Der Renaturierungspuffer wurde abgegossen und Entwicklungspuffer zugegeben, in welchem die Gele über Nacht unter permanentem Schwenken bei 37°C inkubierten.

Am Folgetag wurden die Gele nach Abgießen des Entwicklungspuffers zweimal in Aqua dest. gewaschen, in verdünnter Coomassie-Blau-Lösung gefärbt und anschließend erneut in Aqua dest. gewaschen. Nun konnten die Gele zwischen zwei Cellophanfolien unter Zugabe von „Drying Solution“ getrocknet und anschließend ausgewertet werden.

### 2.2.11 Immunhistologie

Nach Entparaffinisierung der aus einer Mäuseaorta gewonnen Gefäßschnitte wurden diese in PBS gewaschen und dreimal fünf Minuten in Citratpuffer gekocht. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS wurden die Schnitte 15 min in 3%igem Wasserstoffperoxid inkubiert, bevor diese drei mal zwei Minuten in 0,05%igem Tween-PBS (Tween 20) und anschließend in 15%iges Kaninchenserum (bei Markierung von EMMPRIN) bzw. 15%iges Eselserum (bei Markierung von Cyclophilin A) eingelegt wurden.

Nach Abkippen des Überstandes wurden die Gefäßschnitte mit den entsprechenden Antikörpern gegen CD147 (1 mg/ml; 1:30 in 1% BSA) oder Cyclophilin A (0,5 mg/ml; 1:100 in 1% BSA) bzw. der IgG<sub>1</sub>-Kontrolle oder PBS eine Stunde bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte zunächst für fünf mal fünf Minuten mit 0,05%igem Tween-PBS und anschließend für weitere 30 min mit dem entsprechenden biotinylierten Zweitantikörper inkubiert. Nachdem die Schnitte erneut fünf mal fünf Minuten in 0,05%iges Tween-PBS eingelegt worden waren, wurde für 30 min der StreptABComplex/HRP zugegeben. Vor und nach dem folgenden fünf bis zehn minütigen Bad in DAB-Lösung wurden die Gefäßschnitte wieder fünfmal fünf Minuten mit 0,05%igem Tween-PBS inkubiert. Es folgte ein zweiminütiges Gegenfärben mit Hämalaunlösung, sowie das „Bläuen“ in lauwarmem Leitungswasser für 15 min.

### 2.2.12 Statistische Analyse

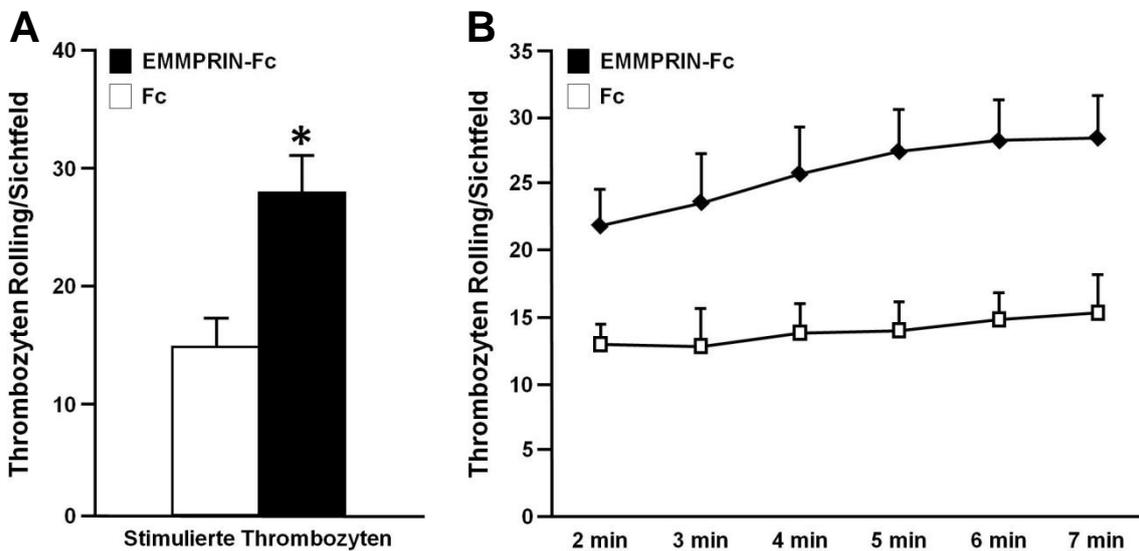
Die gewonnen Daten wurden mittels Student t-Test oder Varianzanalyse auf ihre statistische Aussagekraft hin untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 EMMPRIN vermittelt Rolling stimulierter Thrombozyten

Frisch isolierte Thrombozyten wurden auf eine „physiologische“ Konzentration von  $2 \times 10^8$ /ml eingestellt und nach einstündiger Vorinkubation mit  $10 \mu\text{M}$  ADP unter arteriellen Flussverhältnissen (Abscherungsrate von  $2000 \text{ s}^{-1}$ ) durch die Flusskammer perfundiert. Die Deckglasplättchen wurden dabei zuvor entweder mit EMMPRIN-Fc oder nur mit dem Fc-Fragment beschichtet. Die Auszählung erfolgte nach fünf Minuten für 30 Sekunden in drei repräsentativen Sichtfeldausschnitten.

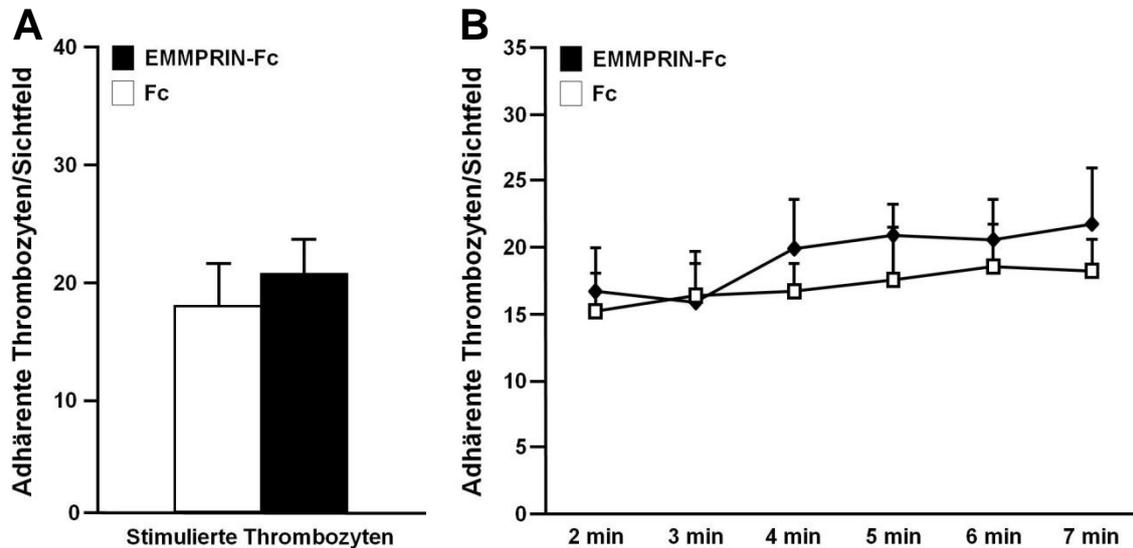
Es zeigte sich eine signifikante Aufregulation des thrombozytären „Rollings“, d.h. des losen Kontaktes von Thrombozyten mit der Oberfläche mit konsekutiver Verlangsamung der thrombozytären Flussgeschwindigkeit, bei Perfusion über eine EMMPRIN-Fc-beschichtete Oberfläche gegenüber einer lediglich mit Fc-Fragment beschichteten Kontrolle ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 10** Stimulierte Thrombozyten zeigen auf EMMPRIN signifikant gesteigertes Rolling: **A** Rolling ADP-stimulierter Thrombozyten auf EMMPRIN-Fc und Fc-Fragment (Flusskammer,  $n=4$ ,  $*p < 0,05$ ) nach fünf Minuten. **B** Zeitlicher Verlauf des thrombozytären Rollings zwischen der zweiten und siebten Minuten der Perfusion durch die Flusskammer.

## ERGEBNISSE

Eine signifikante Steigerung der festen Adhäsion von Thrombozyten auf immobilisiertem EMMPRIN gegenüber der Kontrollbeschichtung mit Fc-Fragment konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Vielmehr zeigte sich auch im Zeitverlauf eine nahezu identische Anzahl adhärenter Thrombozyten.



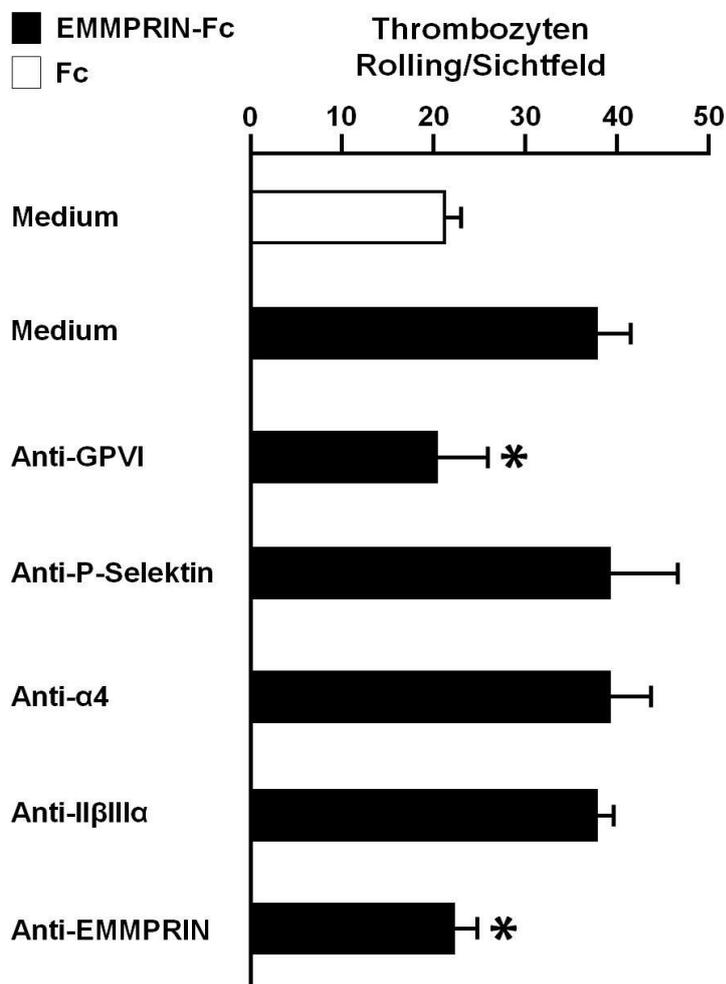
**Abbildung 11** EMMPRIN vermittelt keine signifikant erhöhte thrombozytäre Adhärenz: **A** Auf rekombinatem EMMPRIN fest adhärenter Thrombozyten nach fünf Minuten verglichen mit thrombozytärer Adhärenz auf der Kontrollbeschichtung mit Fc-Fragment (Flusskammer, n=4, p=n.s.). **B** Zeitlicher Verlauf der thrombozytären Adhärenz zwischen der zweiten und siebten Minuten der Perfusion durch die Flusskammer.

### 3.2 Gesteigertes thrombozytäres Rolling auf immobilisiertem EMMPRIN resultiert aus Interaktionen von EMMPRIN mit thrombozytärem GPVI und EMMPRIN

In einer Konzentration von  $2 \times 10^8$ /ml wurden frisch isolierte und mit ADP stimulierte Thrombozyten für 30 Minuten mit je 20  $\mu$ g/ml blockierendem Antikörper vorinkubiert. Anschließend wurden die entsprechend vorbehandelten Thrombozyten mit einer Abscherungsrate von  $2000 \text{ s}^{-1}$  in der Flusskammer über mit rekombinatem EMMPRIN oder dem Kontroll-Fc-Fragment beschichteten Untergrund perfundiert. Nach fünfminütiger Perfusion folgte unter Fluss für 30 Sekunden eine Auszählung rollender Thrombozyten in drei repräsentativen

## ERGEBNISSE

Sichtfeldausschnitten. Es wurden verschiedene Adhäsionsrezeptoren untersucht, die möglicherweise für die Vermittlung des thrombozytären Rollings auf EMMPRIN verantwortlich sein könnten. Tatsächlich ließ sich das auf immobilisiertem rekombinantem EMMPRIN beobachtete thrombozytäre Rolling durch Vorinkubation mit den blockierenden monoklonalen Antikörpern (Ak) anti-EMMPRIN und anti-GPVI signifikant reduzieren. Dagegen zeigte eine Vorbehandlung mit anderen blockierenden Antikörpern wie beispielsweise anti-P-Selektin, anti- $\alpha$ 4-Integrin oder anti-GPIIb/IIIa keinen Effekt.



**Abbildung 11** Eine Antikörper-vermittelte Blockade von thrombozytärem GPVI und EMMPRIN hemmt das Thrombozytenrolling auf EMMPRIN: Rolling ADP-stimulierter Thrombozyten auf rekombinantem EMMPRIN nach 30-minütiger Vorinkubation mit blockierenden monoklonalen Ak (Flusskammer, n=4, \*p<0,05).

### **3.3 EMMPRIN-EMMPRIN- und EMMPRIN-GPVI-Interaktionen vermitteln zelluläres Rolling**

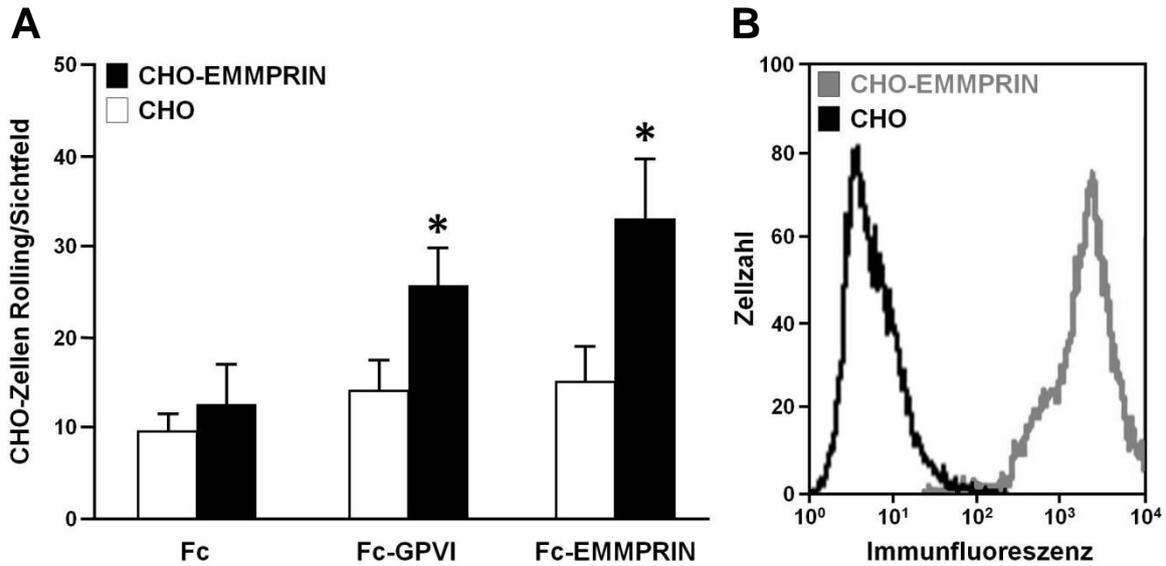
Thrombozyten exprimieren eine Vielzahl verschiedener Adhäsions- und Signalrezeptoren. Um auszuschließen, dass die beobachteten Rolling-vermittelnden Interaktionen zwischen EMMPRIN und GPVI, sowie zwischen EMMPRIN und EMMPRIN nicht zusätzlich von Wechselwirkungen mit weiteren Rezeptoren beeinflusst werden, wurden CHO-Zellen stabil mit GPVI- bzw. EMMPRIN-exprimierenden Plasmiden transfiziert.

Nachdem eine erfolgreiche Transfektion jeweils nochmals durchflusszytometrisch überprüft worden war, wurden die entsprechend GPVI- oder EMMPRIN-exprimierenden CHO-Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml und einer Abscherungsrate von  $2000 \text{ s}^{-1}$  in der Flusskammer über rekombinantes EMMPRIN, GPVI oder lediglich das Fc-Fragment (Kontrolle) perfundiert. Die Auszählung erfolgte nach fünf Minuten für je eine Minute, wobei jeweils das komplette Sichtfeld ausgewertet wurde.

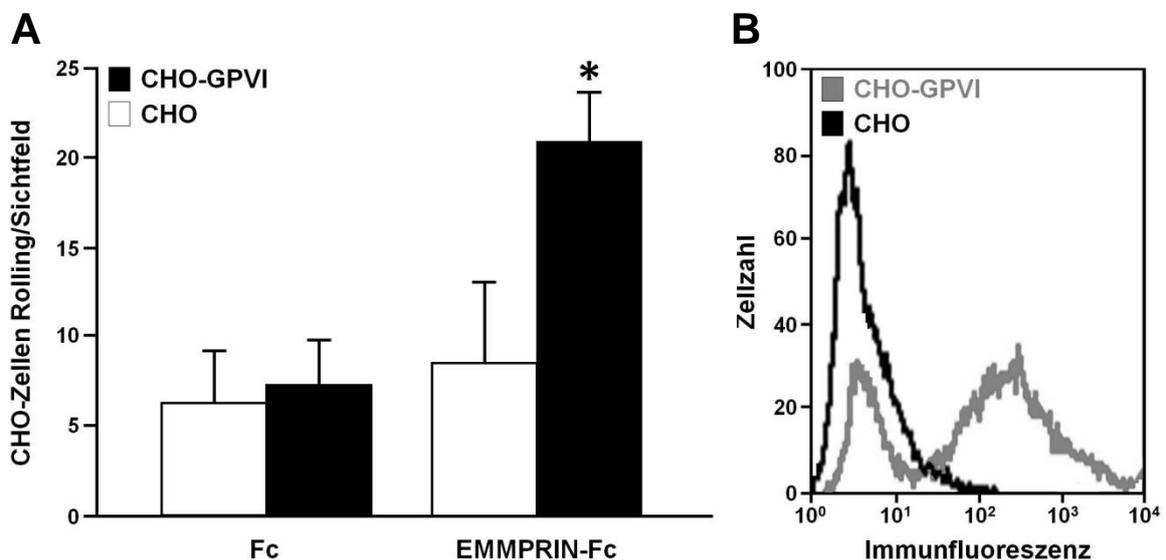
EMMPRIN-exprimierende CHO-Zellen zeigten sowohl auf rekombinantem EMMPRIN, als auch auf GPVI-beschichtetem Untergrund signifikant erhöhte Rolling-Eigenschaften gegenüber einer Beschichtung mit Kontroll-Fc. Nicht transfizierte CHO-Zellen zeigten diesen Effekt nicht.

GPVI-exprimierende CHO-Zellen wiesen auf rekombinantem EMMPRIN gegenüber rekombinantem Fc-Fragment ebenfalls ein gesteigertes Rolling auf, was bei nicht transfizierten CHO-Zellen nicht zu beobachten war.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 12** EMMPRIN-transfizierte CHO-Zellen zeigen signifikant erhöhtes Rolling auf rekombinatem Glykoprotein VI oder rekombinatem EMMPRIN: **A** Rolling EMMPRIN- oder nicht transfizierter CHO-Zellen auf rekombinatem GPVI oder EMMPRIN gegenüber Kontroll-Fc (Flusskammer, n=4, \*p<0,05). **B** Respräsentatives Histogramm der durchflusszytometrischen Prüfung einer erfolgreichen Transfektion der CHO-Zellen mit EMMPRIN.

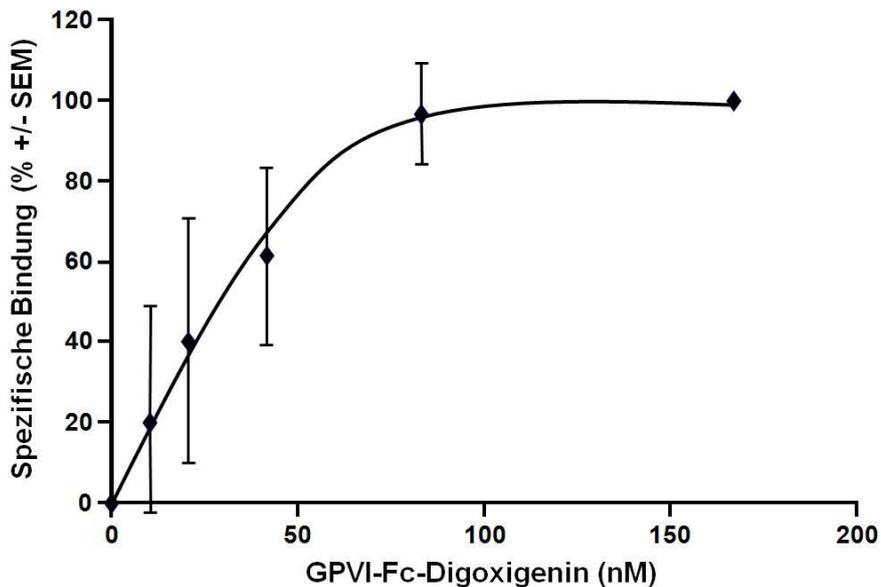


**Abbildung 13** Glykoprotein VI-exprimierende CHO-Zellen zeigen signifikant erhöhtes Rolling auf rekombinatem EMMPRIN: **A** Rolling GPVI- oder nicht transfizierter CHO-Zellen auf rekombinatem EMMPRIN gegenüber Kontroll-Fc (Flusskammer, n=4, \*p<0,05). **B** Respräsentatives Histogramm der durchflusszytometrischen Prüfung einer erfolgreichen Transfektion der CHO-Zellen mit Glykoprotein VI.

### 3.4 Rekombinantes Glykoprotein VI bindet spezifisch an immobilisiertes EMMPRIN

Mit Hilfe eines wie im Abschnitt „Material und Methoden“ beschrieben hergestellten modifizierten ELISAs sollte nachgewiesen werden, dass den beobachteten Wechselwirkungen zwischen EMMPRIN und Glykoprotein VI eine direkte Interaktion zugrunde liegt. Hierzu wurde das Bindungsverhalten von gelöstem rekombinatem Digoxigenin-gefärbtem GPVI-Fc an immobilisiertes EMMPRIN-Fc untersucht.

Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige spezifische Bindung von GPVI an EMMPRIN bis zu einer Konzentration von 170 nM, was sehr dafür spricht, dass dem beschriebenen Mechanismus der Aufregulation thrombozytären Rollings eine direkte Interaktion zwischen GPVI und EMMPRIN zugrunde liegen könnte.



**Abbildung 14** Rekombinantes GPVI-Fc bindet spezifisch an immobilisiertes EMMPRIN-Fc: Die ELISA-Platte wurden mit 250 nM EMMPRIN-Fc oder Fc-Kontrollprotein beschichtet. Nach Waschen und Blockieren der Platte wurden verschiedene Konzentrationen von Digoxigenin-gefärbtem GPVI-Fc oder Kontroll-Fc zugegeben. Die Absorptionsmessung wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm durchgeführt. Die Referenzwellenlänge betrug 690 nm.

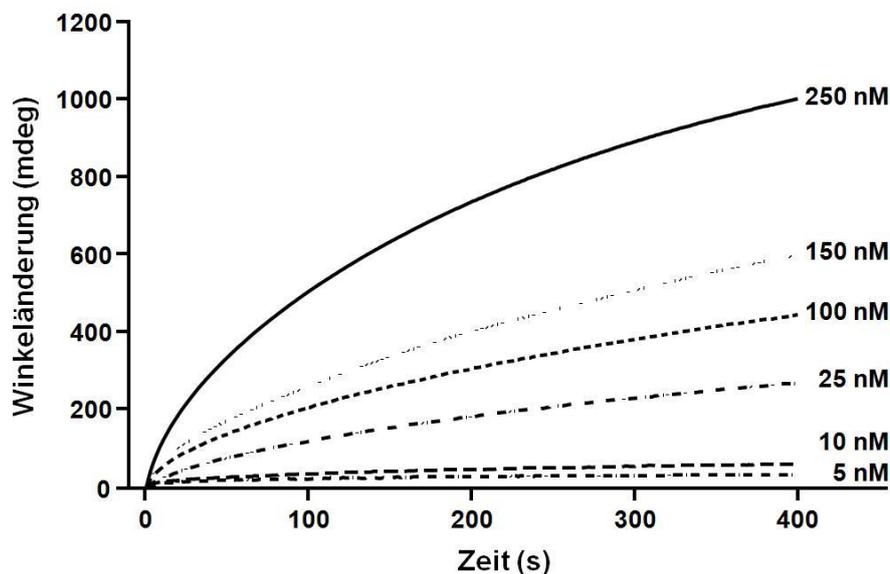
### 3.5 Gelöstes EMMPRIN bindet mit hoher Affinität an immobilisiertes Glykoprotein VI

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen EMMPRIN und GPVI wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für klinische Pharmakologie der Universität Ulm eine Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Spektroskopie durchgeführt.

Darüber hinaus ließ sich so die Spezifität der Bindung unterstreichen, da bei der SPR-Spektroskopie keine Markierung der Bindungspartner notwendig war, die deren Moleküleigenschaften möglicherweise hätte verändern können.

GPVI wurde auf einem carboxylierten Biosensorchip mittels Amin-Bindungs-Kit immobilisiert und dem Zelldetektor anschließend bei 20°C, sowie pH 7,0 in Bindungspuffer gelöstes EMMPRIN zugeführt. Die ablaufenden Interaktionen zwischen EMMPRIN und GPVI wurden für die folgenden 400 s mit einem optischen Zwei-Kanal-Messungssystem analysiert.

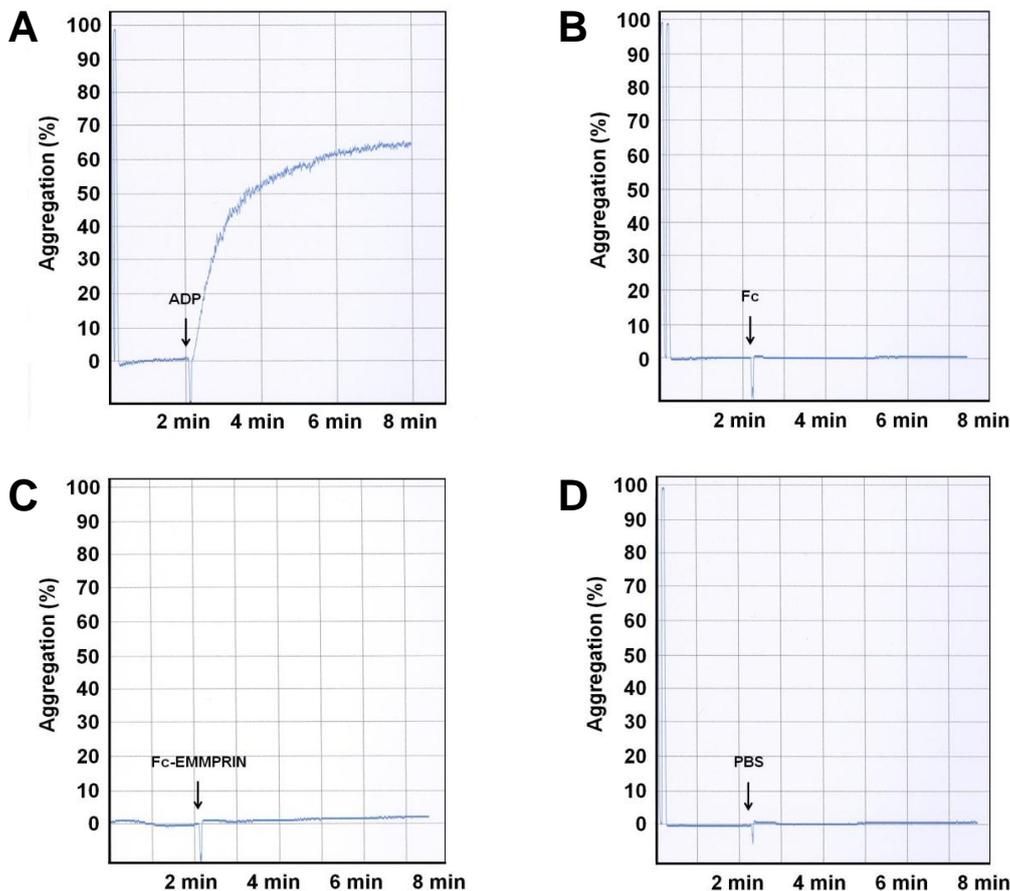
Die nichtlineare Regression der zugehörigen Werte ergab dabei eine Dissoziationskonstante von 88 nM, was eine hohe Bindungsaffinität zwischen den beiden untersuchten Proteinen EMMPRIN und GPVI widerspiegelt.



**Abbildung 15** Diagramm der Oberflächenplasmonenresonanzanalyse: Es zeigt die Assoziationsphase (0-400 s) der Interaktion zwischen in Bindungspuffer gelöstem EMMPRIN und an die Sensoroberfläche gebundenem GPVI. In unabhängigen Versuchen wurden die ablaufenden Interaktionen bei sechs verschiedenen EMMPRIN-Konzentrationen gemessen.

**3.6 Die Aggregation humaner Thrombozyten wird durch rekombinantes EMMPRIN nicht beeinflusst**

Zu aus Citratblut gewonnenem und auf eine Konzentration von  $2 \times 10^5$  Thrombozyten/ $\mu\text{l}$  eingestelltem plättchenreichem Plasma (PRP) wurde nach zweiminütiger photometrischer Aufzeichnung im Aggregometer unter konstanter Rührung mit 1000 rpm die zu untersuchenden Substanzen Fc (5  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Fc-EMMPRIN (25  $\mu\text{g/ml}$ ) zugegeben und in den darauffolgenden fünf Minuten der Verlauf der Aggregationskurve aufgezeichnet. Als Positivkontrolle diente ADP (5  $\mu\text{M}$ ), als Negativkontrolle PBS. Die photometrische Referenzküvette war mit plättchenarmem Plasma (PPP) gefüllt.



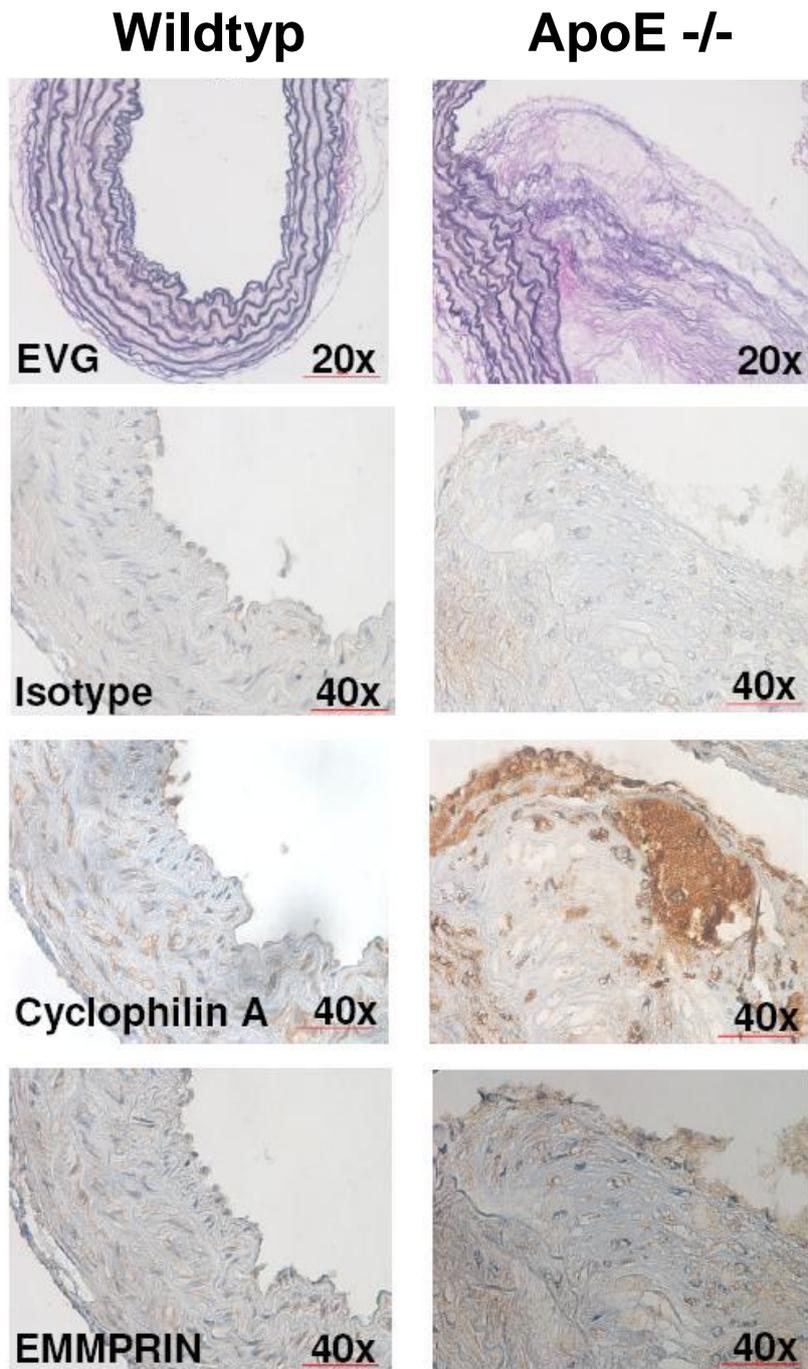
**Abbildung 16** Rekombinantes EMMPRIN führt nicht zu thrombozytärer Aggregation: Dargestellt sind repräsentative Aggregationskurvendiagramme nach Zugabe von ADP (5  $\mu\text{M}$ ), woraufhin sich eine deutliche Zunahme der Thrombozytenaggregation im fünfminütigen Verlauf zeigt (A), sowie nach Zugabe von Kontroll-Fc (5  $\mu\text{g/ml}$ ), Fc-EMMPRIN (25  $\mu\text{g/ml}$ ) und PBS, worauf sich in keinem Fall eine Aggregationszunahme feststellen ließ (B-D).

### **3.7 EMMPRIN und Cyclophilin A werden in atherosklerotischen Plaques ApoE-defizienter Mäuse exprimiert**

ApoE-defizienten Mäusen (C57BL/6J-ApoE<sup>tm1Unc</sup>) wurden nach sechzehn-wöchiger cholesterinhaltiger Ernährung (0,25%) ebenso wie acht bis zwölf Wochen alten Mäusen des Wildtyps (C57BL/6J) Teile des Aortenbogens entnommen und immunhistologisch untersucht. Dabei wurden neben einer Färbung nach van Gieson auch einem Standardprotokoll folgende Färbungen mit den Antikörpern anti-EMMPRIN und anti-Cyclophilin A, sowie einem Isotypenkontrollantikörper angelegt.

Es zeigte sich in den Plaques atherosklerotisch veränderter Aortenbögen der ApoE-defizienten Mäuse eine gleichermaßen starke Expression von EMMPRIN und Cyclophilin A mit überwiegender Lokalisierung im Bereich der fibrösen Kappe (siehe Abbildung 16). In den nicht atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden der Mäuse des Wildtyps fand sich weder eine signifikante Expression von EMMPRIN, noch von Cyclophilin A (siehe Abbildung 18).

Dies zeigt, dass sowohl EMMPRIN, als auch Cyclophilin A wesentlich an der Pathogenese atherosklerotischer Plaques beteiligt sind. Das nahezu identische Verteilungsmuster von EMMPRIN und Cyclophilin A im Bereich der fibrösen Kappe der atherosklerotischen Plaques weist auf mögliche Wechselwirkungen der beiden Proteine hin, die über die Freisetzung von Matrix Metalloproteinasen eine Ruptur der fibrösen Kappe zur Folge haben könnten.



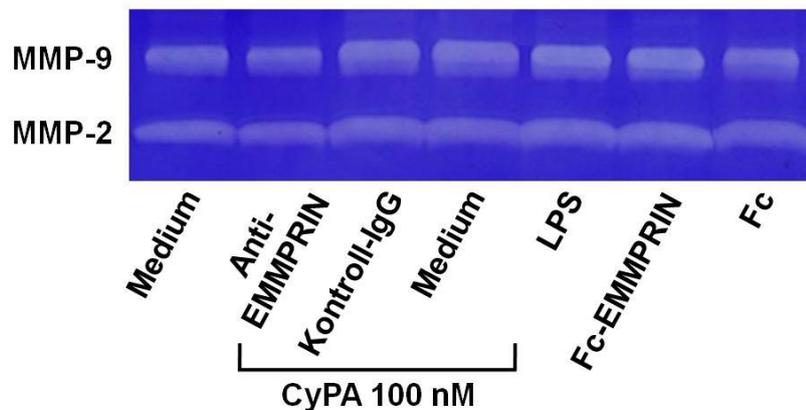
**Abbildung 18** Expression von EMMPRIN und CyPA in atherosklerotischen Plaques ApoE-defizienter Mäuse. Repräsentative *in situ* Immunfärbungen von Gefäßabschnitten von Wildtypmäusen und atheromatös veränderter Gefäßen ApoE-defizienter Mäuse, die mit monoklonalem anti-EMMPRIN-, anti-CyPA- oder Isotyp-Kontroll-Antikörper bzw. nach van Gieson gefärbt wurden. Plaques ApoE-defizienter Mäuse zeigten dabei eine hohe Prävalenz an EMMPRIN und Cyclophilin A. Gefäßwände von Mäusen des Wildtyps wiesen weder eine signifikante Expression von EMMPRIN, noch von Cyclophilin A auf.

**3.8 Cyclophilin A und rekombinantes EMMPRIN induzieren über Bindung an den monozytären EMMPRIN-Rezeptor eine Steigerung der proteolytischen Aktivität von Monozyten durch Aufregulation von MMP-9**

Jeweils 50.000 isolierte Monozyten wurden für 12 Stunden mit 100 nM CyPA oder 50 µg/ml rekombinatem Fc-EMMPRIN inkubiert. Als Positivkontrolle dienten 10 µg/ml LPS, als Negativkontrolle 10 µg/ml rekombinantes Fc-Fragmentes aus humanem IgG.

Dabei wiesen die Zymogramme der nach Ablauf der Inkubationszeit abgenommenen Überstände nach Zugabe von CyPA oder Fc-EMMPRIN eine deutlich höhere MMP-9-Aktivität auf.

Die stimulierende Wirkung von CyPA ließ sich durch einstündige Vorinkubation mit 20 µg/ml des blockierenden Antikörpers anti-EMMPRIN im Gegensatz zu 20 µg/ml eines Kontroll-Antikörpers IgG effektiv inhibieren.



**Abbildung 19** EMMPRIN-vermittelte Freisetzung von MMP-9 aus mit Cyclophilin A behandelten Monozyten: Humane Monozyten wurden für 12 Stunden mit 100 nM CyPA, 50 µg/ml rekombinatem Fc-EMMPRIN oder als Negativkontrolle mit 10 µg/ml rekombinatem Fc-Fragment des humanen IgG inkubiert. CyPA-behandelte Zellen waren zunächst für eine Stunde mit Medium, Kontroll-Ak IgG oder dem blockierenden anti-EMMPRIN-Ak in jeweils einer Konzentration von 20 µg/ml vorbehandelt worden. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Überstände entnommen und zymographisch untersucht. Ein repräsentatives von insgesamt sechs Zymogrammen ist dargestellt.

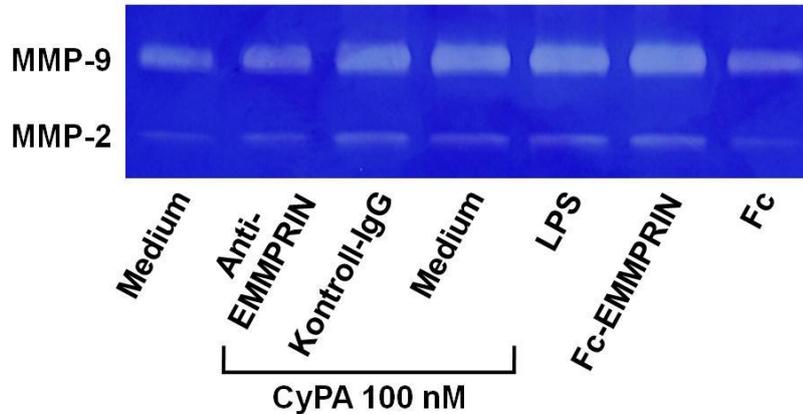
## ERGEBNISSE

### 3.9 Bindung von Cyclophilin A oder rekombinatem EMMPRIN an den EMMPRIN-Rezeptor führt zu einer gesteigerten Bildung von MMP-9 in humanen Schaumzellen

Eine 24-stündige Inkubation von jeweils 50.000 aus Monozyten kultivierten Schaumzellen mit rekombinatem Fc-EMMPRIN (50 µg/ml) oder Cyclophilin A (100 nM) führte zu einer ähnlich gesteigerten MMP-9-Sekretion im Zellüberstand wie nach Zugabe von Lipopolysaccharid (10 µg/ml).

Als Negativkontrolle dienten dabei 10 µg/ml rekombinanten Fc-Fragmentes aus humanem IgG.

Die von CyPA induzierte Aktivierung der Schaumzellen konnte durch einen EMMPRIN-blockierenden Antikörper wirkungsvoll und spezifisch aufgehoben werden, was zeigt, dass EMMPRIN als vermittelnder Rezeptor an diesem Aktivierungsvorgang maßgeblich beteiligt ist.



**Abbildung 20** Lösliches CyPA bzw. Fc-EMMPRIN induziert MMP-9-Freisetzung aus Schaumzellen: Schaumzellen wurden mit 100 nM CyPA, 50 µg/ml rekombinatem Fc-EMMPRIN oder als Negativkontrolle mit 10 µg/ml rekombinatem Fc-Fragment des humanen IgG inkubiert.

CyPA-stimulierte Zellen wurden mit Medium, Kontroll-Ak IgG oder dem blockierenden anti-EMMPRIN-Ak jeweils in einer Konzentration von 20 µg/ml vorbehandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Überstände entnommen und zymographisch untersucht. Ein repräsentatives von insgesamt drei Zymogrammen ist dargestellt.

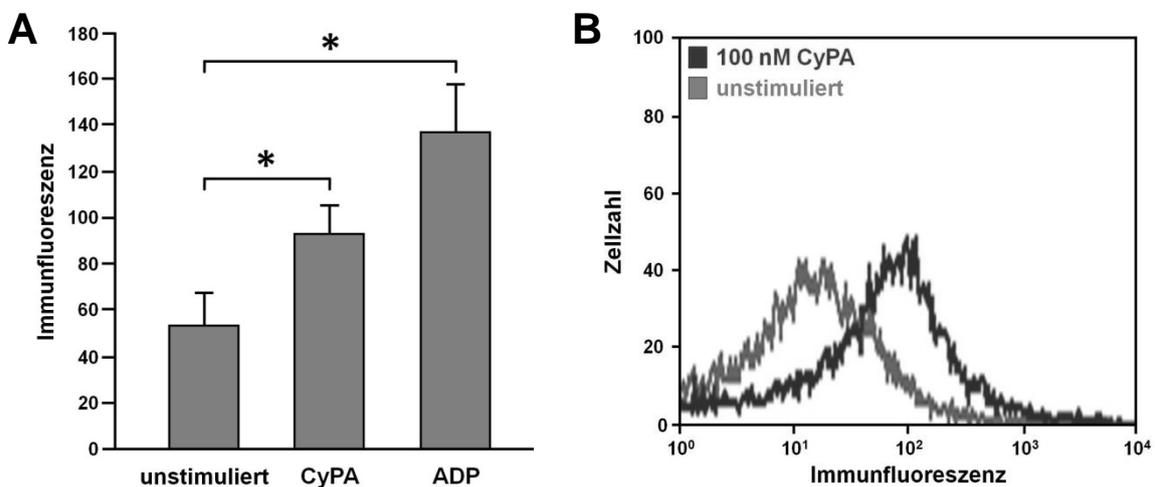
### 3.10 Cyclophilin A aktiviert humane Thrombozyten und führt zu einer Aufregulierung von P-Selektin, EMMPRIN und SDF-1

Frisch isolierte humane Thrombozyten wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^6/100 \mu\text{l}$  jeweils eine Stunde mit 100 nM CyPA stimuliert. Anschließend wurde durchflusszytometrisch die Expression verschiedener Oberflächenproteine in Abhängigkeit von einer vorausgegangenen Koinkubation mit CyPA gegenüber unstimulierten Thrombozyten bestimmt, denen lediglich PBS in äquivalenter Konzentration zugegeben wurde. Als Positivkontrolle diente eine einstündige Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  ADP.

Mit einem entsprechenden monoklonalen IgG-Kontrollantikörper wurde auch die unspezifische Fluoreszenz bestimmt und in der Auswertung berücksichtigt.

CyPA-stimulierte Thrombozyten wiesen in bis zu sechs unabhängigen Versuchen eine signifikante Aufregulierung ( $p < 0,05$ ) der Oberflächenexpression von P-Selektin (CD62P), EMMPRIN (CD147) und SDF-1 auf.

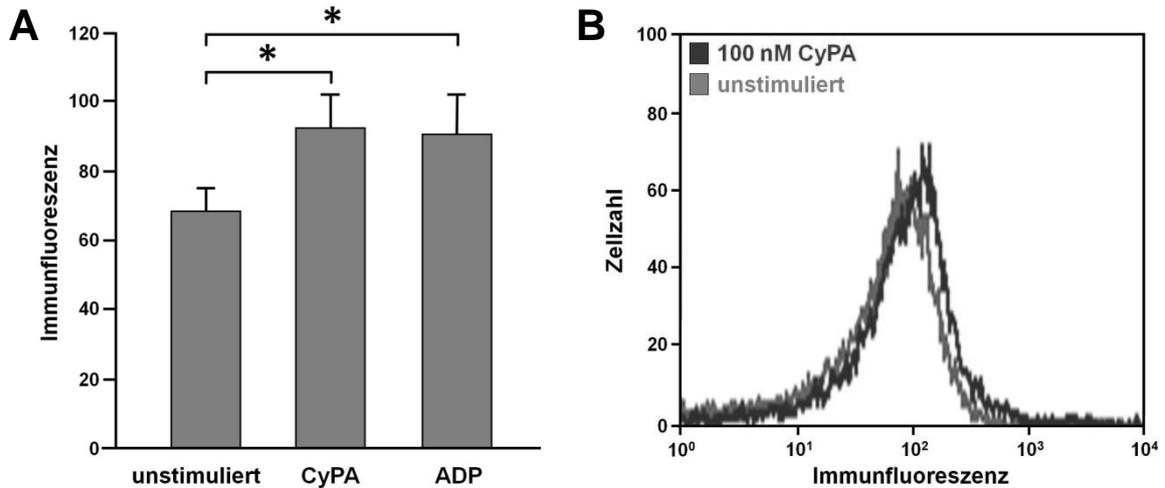
#### P-Selektin (CD62P)



**Abbildung 21** Thrombozytäre P-Selektin-Oberflächenexpression nach Stimulation mit 100 nM CyPA im Vergleich zu unstimulierten und ADP-stimulierten Thrombozyten: **A** Statistische Auswertung der Oberflächenexpression (Durchflusszytometrie,  $n=6$ ,  $*p < 0,05$ ) von P-Selektin auf unstimulierten, sowie CyPA- und ADP-stimulierten Thrombozyten. **B** Repräsentative durchflusszytometrische Histogramme.

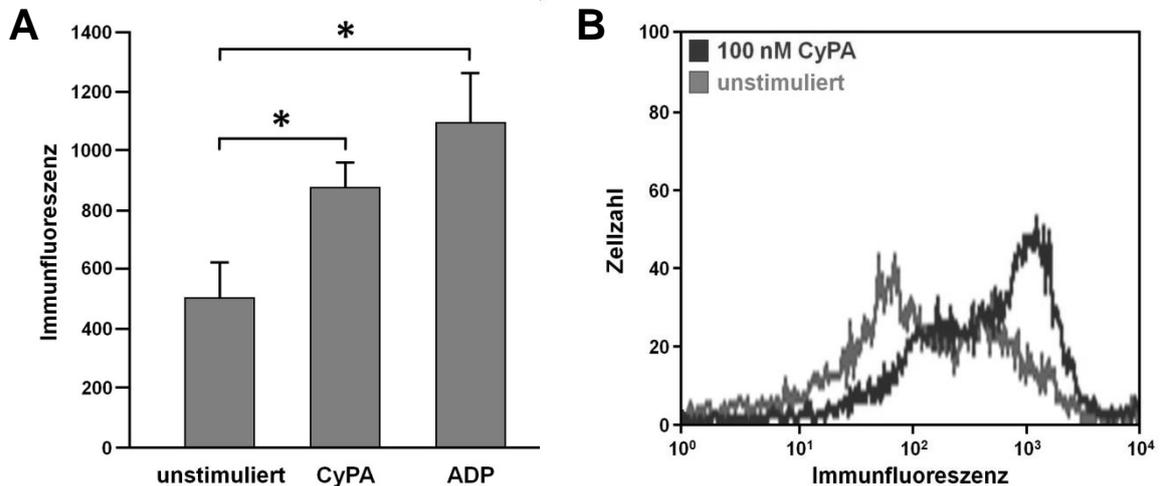
## ERGEBNISSE

### EMMPRIN (CD147)



**Abbildung 22** Thrombozytäre EMMPRIN-Oberflächenexpression nach Stimulation mit 100 nM CyPA im Vergleich zu unstimulierten und ADP-stimulierten Thrombozyten: **A** Statistische Auswertung der Oberflächenexpression (Durchflusszytometrie, n=4, \*p<0,05) von EMMPRIN auf unstimulierten, sowie CyPA- und ADP-stimulierten Thrombozyten. **B** Repräsentative durchflusszytometrische Histogramme.

### SDF-1

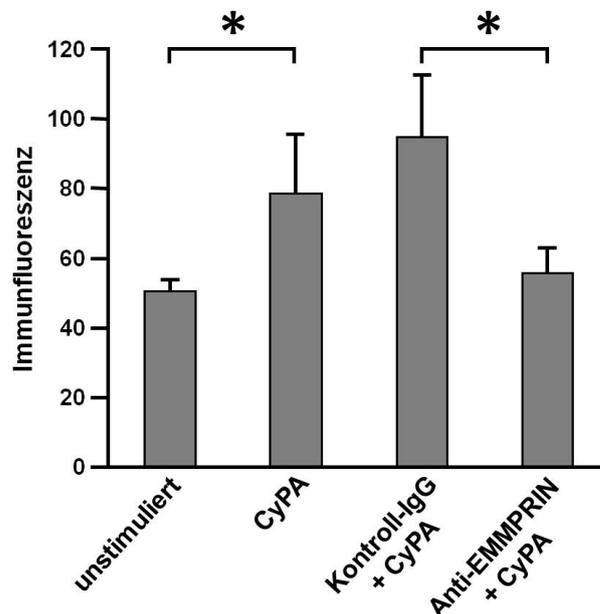


**Abbildung 23** Thrombozytäre SDF-1-Oberflächenexpression nach Stimulation mit 100 nM CyPA im Vergleich zu unstimulierten und ADP-stimulierten Thrombozyten: **A** Statistische Auswertung der Oberflächenexpression (Durchflusszytometrie, n=6, \*p<0,05) von SDF-1 auf unstimulierten, sowie CyPA- und ADP-stimulierten Thrombozyten. **B** Repräsentative durchflusszytometrische Histogramme.

**3.11 Cyclophilin A abhängige Aktivierung humaner Thrombozyten wird vermittelt durch Interaktionen mit thrombozytärem EMMPRIN**

Frisch isolierte humane Thrombozyten wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$  zunächst für 30 min mit  $20 \mu\text{g/ml}$  blockierendem monoklonalem Antikörper anti-EMMPRIN (anti-CD147) bzw. dem entsprechenden IgG-Kontrollantikörper inkubiert, bevor für weitere 30 min jeweils  $100 \text{ nM}$  CyPA zugegeben wurden. Die Negativkontrolle unstimulierter Thrombozyten wurde für 30 min nur mit PBS inkubiert, eine weitere Probe durch Zugabe von  $100 \text{ nM}$  CyPA für denselben Zeitraum lediglich stimuliert. Dabei zeigte sich durchflusszytometrisch eine signifikante Aufregulierung des thrombozytären Aktivierungsmarkers P-Selektin (CD62P), die sich durch den blockierenden Antikörper anti-EMMPRIN wirkungsvoll inhibieren ließ. Bei vorheriger Zugabe des Kontrollantikörpers IgG zeigte sich keine Reduktion dergleichen.

**P-Selektin (CD62P)**



**Abbildung 24** Die aktivierungsabhängige Aufregulierung thrombozytären P-Selektins durch CyPA lässt sich durch den blockierenden Antikörper anti-EMMPRIN wirkungsvoll inhibieren: Statistische Auswertung der Oberflächenexpression (Durchflusszytometrie,  $n=4$ ,  $*p<0,05$ ) von P-Selektin auf unstimulierten, sowie ohne bzw. nach Vorinkubation mit blockierendem Antikörper anti-EMMPRIN ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) oder Kontrollantikörper IgG ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) mit  $100 \text{ nM}$  CyPA stimulierten humanen Thrombozyten.

### 4 DISKUSSION

Die Atherosklerose ist eine chronisch-entzündliche und progressive Erkrankung der Gefäßwand. Die Ruptur der atherosklerotischen Plaque stellt einen Schlüsselprozess in der Auslösung des akuten Myokardinfarktes dar.<sup>199</sup> Die Vulnerabilität der Plaque ist dabei charakterisiert von einer Akkumulation inflammatorischer Zellen und MMPs, die die schützende fibröse Kappe der Plaque degradieren.<sup>105,117</sup> Hauptsächlich gebildet werden diese MMPs von in die Gefäßwand migrierten Monozyten, sowie aus Makrophagen hervorgegangenen Schaumzellen und ebenfalls eingewanderten glatten Gefäßmuskelnzellen.<sup>68</sup>

Das Glykoprotein EMMPRIN, dessen Expression und Funktion erstmals auf Tumorzellen beschrieben worden war,<sup>21,146</sup> scheint über bislang noch kaum verstandene Mechanismen die MMP-Aktivität in verschiedenen an der Atherosklerose maßgeblich beteiligten Zellen zu regulieren.<sup>171</sup>

Nachdem in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe EMMPRIN erst vor kurzem aktivierungsabhängig auch auf Thrombozyten nachgewiesen werden konnte,<sup>170</sup> konnten wir jetzt zeigen, dass EMMPRIN an zahlreichen inflammatorischen Prozessen in verschiedenen Stadien der Atherosklerose bis hin zur fatalen Plaqueruptur entscheidend beteiligt ist.

#### **4.1 Glykoprotein VI als neuer thrombozytärer Rezeptor für EMMPRIN und die Bedeutung EMMPRIN-vermittelter Interaktionen für thrombozytäre Adhäsionsmechanismen an der Gefäßwand**

In der vorliegenden Arbeit haben wir Glykoprotein VI als neuen thrombozytären Rezeptor für EMMPRIN identifiziert und erstmals nachweisen können, dass EMMPRIN nicht nur an der interzellulären Signalübertragung beteiligt ist, sondern auch als direkter Adhäsionsrezeptor fungieren kann. So beobachteten wir bei aktivierten Thrombozyten eine durch homophile Wechselwirkungen zwischen EMMPRIN-Proteinen, sowie Interaktionen zwischen EMMPRIN und Glykoprotein VI vermittelte Aufregulation des thrombozytären Rollings.

## DISKUSSION

---

Nach einer Plaqueruptur kommt es zu einer erheblichen Zunahme des thrombozytären Tetherings und Rollings, sowie schließlich zur festen Adhäsion von Thrombozyten mit konsekutiver Thrombusbildung. Bei Einreißen der fibrösen Kappe kommen Thrombozyten mit subendotheliale Kollagen in Kontakt. Dabei hängen der initiale thrombozytäre Kontakt mit Kollagen und die folgende, für Adhäsion und Thrombuswachstum entscheidende Initiierung der Integrinaktivierung grundlegend von einer Wechselwirkung mit thrombozytärem GPVI ab.<sup>141</sup> Es handelt sich dabei um direkte GPVI-Kollagen-Interaktionen, die entscheidend sind für eine unter niedrigem Scherstress auftretende erste lockere Thrombozytenbindung (Platelet tethering).<sup>71,123</sup> Bislang war neben Kollagen noch kein anderer an der thrombozytären Adhäsion beteiligter Bindungspartner von thrombozytärem Glykoprotein VI beschrieben worden. In diesem Zusammenhang scheint es allerdings wichtig zu erwähnen, dass wir keinerlei Einfluss von zwischen EMMPRIN und Glykoprotein VI möglicherweise stattfindenden Wechselwirkungen auf die feste Thrombozytenadhäsion feststellen konnten. Auch eine Zunahme der thrombozytären Aggregabilität infolge der beobachteten Interaktionen konnte aggregometrisch nicht nachgewiesen werden.

Vielmehr deuten unsere Untersuchungsergebnisse darauf hin, dass es während des Erstkontaktes von Thrombozyten mit EMMPRIN-exprimierenden Oberflächen oder Zellen zu temporären Wechselwirkungen zwischen thrombozytärem Glykoprotein VI und EMMPRIN oder auch homophilen EMMPRIN-Interaktionen kommt, die das thrombozytäre Rolling begünstigen.

Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom fanden wir erst vor kurzem eine erhöhte thrombozytäre Oberflächenexpression von GPVI.<sup>17</sup> So ist denkbar, dass Wechselwirkungen zwischen GPVI und EMMPRIN, das auf Monozyten bei akutem Myokardinfarkt<sup>171</sup> und aktivierungsabhängig auch auf Thrombozyten vermehrt exprimiert wird, über Induktion thrombozytären Rollings maßgeblich am Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen beteiligt sind.

Basierend auf diesen Erkenntnissen liegt es nahe anzunehmen, dass Wechselwirkungen zwischen EMMPRIN und EMMPRIN oder EMMPRIN und Glykoprotein VI Interaktionen zwischen Thrombozyten und Monozyten, sowie

## DISKUSSION

---

die dadurch bedingte Inflammation der Gefäßwand genauso unterstützen könnten wie einige verschiedene bereits in der Literatur beschriebene Adhäsionsrezeptorenpaare wie beispielsweise PSGL-1/P-Selektin oder auch Mac-1/GP1b. Zudem könnte eine interaktionsvermittelte Verstärkung der thrombozytären Aktivierung eine weitere aktivierungsabhängige Aufregulation der Expression von GPVI und EMMPRIN auf Thrombozyten induzieren. Immer weitere EMMPRIN/GPVI- und EMMPRIN/EMMPRIN-Interaktionen und ein damit verbundener fataler Circulus vitiosus sich immer weiter verstärkender thrombozytärer Aktivierung wären die Folge.

Homotypische EMMPRIN-EMMPRIN-Wechselwirkungen sind bereits in Zusammenhang mit EMMPRIN-vermittelter MMP-Induktion beschrieben worden.<sup>198,212</sup> Dennoch wurde EMMPRIN bislang mehr als Signal-, denn als Adhäsionsrezeptor aufgefasst und eingeordnet.<sup>211</sup>

Unsere Ergebnisse belegen jedoch, dass EMMPRIN nicht nur an der über freigesetzte MMPs ausgelösten Plaqueruptur als fataler Komplikation der Atherosklerose beteiligt ist, sondern auch bei der Vermittlung der initialen Zelladhäsion (wie für Rolling von Thrombozyten und CHO-Zellen belegt) entscheidend beteiligt ist. Mit EMMPRIN- bzw. GPVI-transfizierten CHO-Zellen konnten wir zeigen, dass sowohl EMMPRIN/EMMPRIN- als auch EMMPRIN/GPVI-Interaktionen stark genug sind, um zelluläres Rolling zu vermitteln.

Dass es sich hierbei um spezifische Wechselwirkungen zwischen EMMPRIN und GPVI handelt, konnte mittels ELISA konzentrationsabhängig nachgewiesen werden. Zudem konnte mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Spektroskopie eindeutig gezeigt werden, dass es zwischen Glykoprotein VI und EMMPRIN zu hochaffinen Interaktionen kommen kann. Ein besonderer methodischer Vorteil der SPR-Spektroskopie war dabei, dass keinerlei Markierung (Labeling) der Bindungspartner notwendig war und somit die Moleküleigenschaften nicht beeinflusst wurden, was die Spezifität der beschriebenen Interaktionen unterstreicht.

### 4.2 Bedeutung des EMMPRIN-Liganden Cyclophilin A für die Proteolyse der atherosklerotischen Plaque

Neben den beschriebenen Interaktionen zwischen EMMPRIN und GPVI, sowie den homophilen Bindungen unter EMMPRIN-Molekülen, stellt Cyclophilin A einen der bedeutendsten EMMPRIN-Liganden dar.<sup>213</sup> Von apoptotischen Zellen ist bekannt, dass sie große Mengen des intrazellulär hochgradig exprimierten CyPA freisetzen.<sup>64</sup> Erhöhte Spiegel extrazellulären CyPAs wurden bereits bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis<sup>18</sup> oder schwerer Sepsis<sup>195</sup> beschrieben.

So ist gut vorstellbar, dass absterbende Zellen und Zelltrümmer im so genannten nekrotischen Kern der Plaque zu einer Freisetzung signifikanter Mengen an Cyclophilin A führen könnten. Desweiteren wäre denkbar, dass es in der Folge zu Interaktionen des Immunophilins mit den unterschiedlichsten inflammatorischen zellulären Bestandteilen der fortgeschrittenen Plaque wie Monozyten, Schaumzellen oder auch glatten Muskelzellen kommen könnte, die letzten Endes die Ruptur der atherosklerotischen Plaque zur Folge hätten.

Eine fortgeschrittene atherosklerotische Plaque ist reich an aktivierten Makrophagen und Schaumzellen.<sup>132</sup> Tatsächlich konnten wir neben EMMPRIN auch Cyclophilin A hochexprimiert in fortgeschrittener Plaque ApoE-defizienter Mäuse nachweisen. Dabei zeigte sich ein nahezu identisches Verteilungsmuster der beiden Proteine mit Betonung der Expression im Bereich der Schulterregion der fibrösen Kappe, welche die Prädilektionsstelle einer Plaqueruptur darstellt.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse scheint es möglich, dass sowohl direkte homophile zelluläre Interaktionen unter Beteiligung von EMMPRIN, als auch die Bindung gelösten CyPAs an zellassoziertes EMMPRIN an inflammatorischen Prozessen in der atherosklerotischen Plaque beteiligt sein könnten. Tatsächlich ist es uns gelungen, eine funktionelle Relevanz von EMMPRIN und CyPA in Monozyten und Schaumzellen atherosklerotischer Plaques nachzuweisen. So sorgt EMMPRIN über Bindung einer seiner beiden Liganden, gelösten rekombinanten CyPAs oder rekombinanten EMMPRINs für eine Aufregulierung von MMP-9 in Monozyten und über denselben Mechanismus für die Produktion

von MMP-9 in reifen Schaumzellen. Dass es sich bei der von uns beobachteten von CyPA und EMMPRIN vermittelten MMP-Aufregulation in Monozyten und Schaumzellen um einen streng EMMPRIN-abhängigen Mechanismus handelt, zeigte sich durch eine wirkungsvolle Inhibition der MMP-Aufregulation nach vorausgehender Vorinkubation der entsprechenden Zellen mit dem EMMPRIN-blockierenden Antikörper.

Als eine mögliche Erklärung für die EMMPRIN-abhängige Freisetzung von Matrix Metalloproteinasen, welche jeweils mit Progression und Ruptur atherosklerotischer Plaques in Verbindung gebracht werden, ist eine interzelluläre Interaktion über homotypische EMMPRIN-EMMPRIN-Bindungen denkbar. Darüber hinaus ist nach Ergebnissen der vorliegenden Arbeit auch vorstellbar, dass extrazelluläres lösliches CyPA mit Zellmembran-gebundenem EMMPRIN interagiert und auf diese Weise die EMMPRIN-vermittelte MMP-Induktion in Gang bringen könnte.

### **4.3 EMMPRIN-abhängige Aktivierung von Thrombozyten durch das inflammatorische Zytokin Cyclophilin A**

Freigesetztes Cyclophilin A verhält sich allerdings nicht nur gegenüber Monozyten und Schaumzellen wie ein inflammatorisches Zytokin. Vielmehr zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass extrazelluläres CyPA auch Thrombozyten in einen aktivierten Zustand versetzt und bei diesen die rasche Freisetzung des Adhäsionsproteins P-Selektin, sowie des Chemokins SDF-1 und auch die von EMMPRIN signifikant aufreguliert. Diese auf den inflammatorischen Stimulus extrazellulären Cyclophilins A aus thrombozytärer  $\alpha$ -Granula freigesetzten Proteine sind an vielerlei biologischen Abläufen in der Pathogenese der Atherosklerose wie Zelladhäsion, Chemotaxis oder Proteolyse entscheidend beteiligt und fördern darüber hinaus weitere inflammatorische Prozesse in der Gefäßwand.

So stellt die Aufregulation von P-Selektin auf CyPA-stimulierten Thrombozyten einen zentralen Prozess bei der weiteren thrombozytären Rekrutierung zirkulierender Leukozyten zur arteriellen Gefäßwand dar.

## DISKUSSION

---

Leukozyten binden über PSGL-1-P-Selektin-Interaktionen locker an adhärenente Thrombozyten,<sup>49,209</sup> wodurch eine weitere Infiltration dieser inflammatorischen Zellen in die Gefäßwand und das Fortschreiten atherosklerotischer Läsionen ermöglicht wird. Darüber hinaus wird über die Bindung von PSGL-1 an thrombozytäres P-Selektin auch die monozytäre Expression von Proteinen wie dem Urokinaserezeptor gesteuert, der einen entscheidenden Oberflächenrezeptor für Proteasen und einen ebenso wichtigen Regulator der integrinvermittelten Leukozytenadhäsion darstellt.<sup>119,127,128,149,206</sup>

Ebenfalls auf mit CyPA-stimulierten Thrombozyten aufreguliert wurde thrombozytäres SDF-1. SDF-1 (CXCL-12) wird bei Gefäßverletzungen,<sup>172</sup> in atherosklerotischer Plaque, sowie nach Myokardinfarkt vermehrt exprimiert.<sup>10</sup> Das Chemokin nimmt beim „Homing“ zirkulierender CD34-Zellen in ischämisches Myokard,<sup>1</sup> sowie bei der Rekrutierung endothelialer Progenitorzellen zu einem arteriellen Thrombus eine zentrale Rolle ein.<sup>125</sup>

Eine aktivierungsabhängige Expression von EMMPRIN auf Thrombozyten konnte erst kürzlich von unserer Arbeitsgruppe erstmals nachgewiesen werden.<sup>170</sup> Wir konnten nun zeigen, dass es in Gegenwart von Cyclophilin A ebenfalls zu einer thrombozytären Degranulation mit einer weiteren Aufregulation der oberflächlichen Expression von EMMPRIN auf Thrombozyten kommt. Thrombozytär exprimiertes EMMPRIN vermittelt Interaktionen mit Monozyten und regt diese durch Aktivierung NFκB-vermittelter inflammatorischer Signalwege zur Freisetzung von MMP-9, IL-6, sowie TNF-α an.<sup>170</sup>

Auch Schaumzellen setzen gemäß Ergebnissen der vorliegenden Arbeit durch Interaktion mit EMMPRIN vermehrt MMP-9 frei, so dass CyPA hier neben seiner direkten Wirkung auch über die Aufregulation von EMMPRIN an einer vermehrten, die Plaque destabilisierenden Freisetzung von MMPs beteiligt zu sein scheint.

Dass auch der Mechanismus der thrombozytären Aktivierung durch CyPA streng EMMPRIN-abhängig reguliert ist, konnten wir in Bezug auf den thrombozytären Aktivierungsmarker P-Selektin (CD62P) durchflusszytometrisch nachweisen. Nach Vorinkubation mit dem blockierenden Antikörper anti-EMMPRIN blieb die

Aktivierung der Thrombozyten mit konsekutiver oberflächlicher Freisetzung von P-Selektin auch nach Zugabe des inflammatorischen Stimulus CyPA aus.

#### 4.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass EMMPRIN und sein Ligand CyPA in vielerlei Hinsicht Zellinteraktionen in der Pathogenese der Atherosklerose beeinflussen und daher viel versprechende Angriffspunkte zukünftiger Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall darstellen könnten. So ließ sich möglicherweise mit gezielt gegen EMMPRIN oder Cyclophilin A gerichteter antiinflammatorischer Therapie die proteolytische Aktivität in atherosklerotisch veränderten Gefäßen, sowie die Thrombozytenaktivierung und deren Interaktion mit inflammatorischen Zellen wie Monozyten oder Schaumzellen und die damit verbundene Progression der Atherosklerose mit der fatalen Komplikation der Plaqueruptur in einem frühen Stadium entscheidend vermindern.

Mögliche Therapeutika könnten spezifisch gegen EMMPRIN gerichtete Antikörper, sowie das hochpotente Immunsuppressivum Cyclosporin A, für welches Cyclophilin A den Hauptliganden bildet,<sup>36,63,111</sup> darstellen.

Auch eine Detektion von EMMPRIN oder CyPA, hinweisend auf erhöhte proteolytische Aktivität in atherosklerotisch veränderten Gefäßen, mittels markierter Antikörper könnte zukünftig eine spezifischere Diagnostik rupturgefährdeter Plaques ermöglichen und diese so einer gezielten interventionellen Therapie zugänglich gemacht werden.

Nach diesen viel versprechenden *in vitro*-Ergebnissen werden nun *in vivo*-Studien zeigen müssen, welches therapeutische Potential tatsächlich in einer Blockierung von EMMPRIN in Bezug auf eine günstige Beeinflussung der Entwicklung atherosklerotischer Gefäßveränderungen steckt.

### 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass EMMPRIN bei der Vermittlung von Zell-Zell-Interaktionen, über die sich EMMPRIN-exprimierende Zellen wie Thrombozyten, Monozyten oder auch Schaumzellen gegenseitig aktivieren, im Rahmen atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen eine zentrale Rolle spielt.

So konnten wir in dieser Arbeit Glykoprotein VI als neuen thrombozytären Rezeptor für EMMPRIN identifizieren und haben erstmals nachweisen können, dass EMMPRIN neben seiner Funktion für die Signalübermittlung auch als direkter Adhäsionsrezeptor dienen kann. Über homophile Interaktionen zwischen EMMPRIN und EMMPRIN, sowie spezifische Wechselwirkungen zwischen EMMPRIN und GPVI wird der Erstkontakt von Thrombozyten mit EMMPRIN-exprimierenden Zellen oder Oberflächen („Rolling“) unterstützt. Dieser Erstkontakt könnte sowohl durch Stabilisierung der Zellbindung, wie auch durch rasche Signaltransduktion den Prozess der Zelladhäsion und -rekrutierung initiieren.

Cyclophilin A, welches möglicherweise vermehrt aus Zelltrümmern im nekrotischen Kern atherosklerotischer Plaques freigesetzt wird, stellt einen der bedeutendsten EMMPRIN-Liganden dar. Sowohl CyPA, als auch EMMPRIN werden vermehrt in der Schulterregion der fibrösen Kappe exprimiert, welche eine Prädilektionsstelle der Plaqueruptur darstellt. Beide Proteine induzieren über jeweils EMMPRIN-abhängige Wechselwirkungen eine Aufregulation von MMP-9 in Monozyten wie auch in Schaumzellen und steuern so die proteolytische Aktivität in der atherosklerotischen Plaque.

CyPA induziert außerdem EMMPRIN-vermittelt eine Thrombozytenaktivierung und -degranulation mit thrombozytärer Aufregulation von P-Selektin, SDF-1 und EMMPRIN.

EMMPRIN und sein Ligand CyPA stellen folglich vielversprechende Angriffspunkte zur Inhibition atherogener und inflammatorischer Prozesse dar.

*In vivo*-Studien werden jetzt zeigen müssen, welches therapeutische Potential tatsächlich in einer Blockierung von EMMPRIN steckt.

### 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromalcell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 2004; 110:3300-3305.
2. Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic SJ, Clinton SK, Brinckerhoff CE, Sukhova GK, Libby P. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation* 1998; 97:2433-2444.
3. Allain F, Vanpouille C, Carpentier M, Slomianny MC, Durieux S, Spik G. 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 USA* 2002; 26:26.
4. Altieri DC, Bader R, Mannucci PM, Edgington TS. Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. *J Cell Biol* 1988; 107:1893-1900.
5. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1991; 11:1223-1230.
6. American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics – 2008 Update. Dallas, Texas. American Heart Association 2008.
7. Amorino GP, Hoover RL. Interactions of monocytic cells with human endothelial cells stimulate monocytic metalloproteinase production. *Am J Pathol* 1998; 152:199-207.
8. Arora K, Gwinn WM, Bower MA, Watson A, Okwumabua I, MacDonald HR, Bukrinsky MI, Constant SL. Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *J Immunol* 2005; 175:517-522.
9. Arya M, Lopez JA, Romo GM, Cruz MA, Kasirer-Friede A, Shattil SJ, Anvari B. Glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin alpha(IIb)beta(3): effects of receptor clustering and von Willebrand factor adhesion. *J Thromb Haemost* 2003; 1:1150-1157.
10. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn MS. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003; 362:697-703.
11. Badimon JJ, Lettino M, Toschi V, Fuster V, Berrozpe M, Chesebro JH, Badimon L. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effect of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation* 1999; 99:1780-1787.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

12. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002; 115:3719-3727.
13. Ball RY, Stowers EC, Burton JH, Cary NR, Skepper JN, Mitchinson MJ. Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis* 1995; 114:45-54.
14. Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, Reidy MA. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res* 1994; 75:539-545.
15. Berditchevski F, Chang S, Bodorova J, Hemler ME. Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6. *J Biol Chem* 1997; 272:29174-29180.
16. Best D, Senis YA, Jarvis GE, Eagleton HJ, Roberts DJ, Saito T, Jung SM, Moroi M, Harrison P, Green FR, Watson SP. GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear. *Blood* 2003; 102:2811-2828.
17. Bigalke B, Lindemann S, Ehlers R, Seizer P, Daub K, Langer H, Schöneberger T, Kremmer E, Siegel-Axel D, May AE, Gawaz M. Expression of platelet collagen receptor glycoprotein VI is associated with acute coronary syndrome. *Eur Heart J* 2006; 27:2165-2169.
18. Billich A, Winkler G, Aschauer H, Rot A, Peichl P. Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1997; 185:975-80.
19. Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7:728-735.
20. Biswas C. Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 109:1026-1034.
21. Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, Nabeshima K. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* 1995; 55:434-439.
22. Björkerud S, Björkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesion, especially in inflammatory cells (macrophages and T-cells) and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol* 1996; 149:367.
23. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477:267-283.
24. Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Loushin C, Isner JM. Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions: association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation* 1995; 91:2125-2131.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

25. Burke AP, Farb A, Malcolm GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med* 1997; 336:1276-1282.
26. Burke AP, Farb A, Malcolm GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Effect of risk factors on the mechanism of acute thrombosis and sudden coronary death in women. *Circulation* 1998; 97:2110-2116.
27. Cabeza N, Li Z, Schulz C, Kremmer E, Massberg S, Bültmann A, Gawaz M. Surface expression of collagen receptor Fc receptor-gamma/glycoprotein VI is enhanced on platelets in type 2 diabetes and mediates release of CD40 ligand and activation of endothelial cells. *Diabetes* 2004; 53:2117-2121.
28. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases; the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87:840-844.
29. Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Bondjers G. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: Pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis* 1998; 139:205-222.
30. Caudroy S, Polette M, Tournier JM, Burlet H, Toole B, Zucker S, Birembaut P. Expression of the extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and the matrix metalloproteinase-2 in broncho-pulmonary and breast lesions. *J Histochem Cytochem* 1999; 47:1575-80.
31. Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, De Blasi A, Ready N, Furie BC, Furie B. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:8767-8771.
32. Chavakis T, Santoso S, Clemetson KJ, Sachs UJ, Isordia-Salas I, Pixley RA, Nawroth PP, Colman RW, Preissner KT. High molecular weight kininogen regulates platelet-leukocyte interactions by bridging Mac-1 and glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 2003; 278:45375-45381.
33. Cheng GC, Loree HM, Kamm RD, Fishbein MC, Lee RT. Distribution of circumferential stress in ruptured and stable atherosclerotic lesions. A structural analysis with histopathological correlations. *Circulation* 1993; 87:1179-1187.
34. Chesler N, Ku D, Galis ZS. Transmural pressure induces matrix degrading activity in porcine arteries ex vivo. *Am J Physiol* 1999; 277:2002-2009.
35. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* 2001; 86:189-197.
36. Colgan J, Asmal M, Yu B, Luban J. Cyclophilin A-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine. *J Immunol* 2005; 174:6030-6038.
37. Corti R, Fuster V. New understanding, diagnosis, and prognosis of atherothrombosis and the role of imaging. *Am J Cardiol* 2003; 91(suppl.):17-26.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

38. Cosemans JM, Kuijpers MJ, Lecut C, Loubele ST, Heeneman S, Jandrot-Perrus M, Heemskerk JW. Contribution of platelet glycoprotein VI to the thrombogenic effect of collagens in fibrous atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 2005; 181:19-27.
39. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251:788-791.
40. Dalager-Pedersen S, Ravn HB, Falk E. Atherosclerosis and acute coronary events. *Am J Cardiol* 1998; 82:37-40.
41. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993; 171:223-229.
42. Davies MJ. Stability and instability. The two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture, 1995. *Circulation* 1996; 94: 2013-2020.
43. Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart* 2000; 83:361-366.
44. De Caterina R, Libby P. Endothelial dysfunctions and vascular disease. Blackwell Futura 2007.
45. Diacovo TG, de Fougerolles AR, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest* 1994; 94:1243-1251.
46. Dollery CM, Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res* 2006; 69:625-635.
47. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 1995; 77:863-868.
48. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette P, Hynes R, Wagner D. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1998; 102:145-152.
49. Evangelista V, Manarini S, Sideri R, Rotondo S, Martelli N, Piccoli A, Totani L, Piccardoni P, Vestweber D, de Gaetano G, Cerletti C. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood* 1999; 93:876-885.
50. Fadool JM, Linser PJ. 5A11 antigen is a cell recognition molecule which is involved in neuronal-glia interactions in avian neural retina. *Dev Dyn* 1993; 196:252-262.
51. Falk E, Shah P, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92:657-671.
52. Falk E. Why do plaques rupture? *Circulation* 1992; 86:III30-III42.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

53. Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J, Virmani R. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core: A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation* 1996; 93:1354-1363.
54. Felton CV, Crook D, Davies MJ, Oliver MF. Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1337-1345.
55. Fernandez-Patron C, Martinez-Cuesta MA, Salas E, Sawicki G, Wozniak M, Radomski MW, Davidge ST. Differential regulation of platelet aggregation by matrix metalloproteinases-9 and -2. *Thromb Haemost* 1999; 82:1730-1735.
56. Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Montani AS, Reidy MA, Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* 1991; 253:1129-1132.
57. Fischer G, Bang H, Mech C. Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline containing peptides. *Biomed Biochim Acta* 1984; 43:1101-1111.
58. Foda HD, Rollo EE, Drews M, Conner C, Appelt K, Shalinsky DR, Zucker S. Ventilator-induced lung injury upregulates and activates gelatinases and EMMPRIN: attenuation by the synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, Prinomastat (AG3340). *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25:717-724.
59. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* 2000; 191:1413-1422.
60. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7450-7454.
61. Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO, Wagner DD. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood* 1998; 91:1318-1324.
62. Frenette P, Wagner D. Adhesion molecules. *N Engl J Med* 1996; 334:1526-1529.
63. Fruman DA, Burakoff SJ, Bierer BE. Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB J* 1994; 8:391-400.
64. Galat A. Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem* 1993; 216:689-707.
65. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis. The good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002; 90:251-262.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

66. Galis ZS, Kranzhofer R, Fenton JW, Libby P. Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:483-489.
67. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, et al. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res* 1994; 75:181-189.
68. Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhöfer R, Clark S, Libby P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:402-406.
69. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 94:2493-2503.
70. Galt SW, Lindemann S, Medd D, Allen LL, Kraiss LW, Harris ES, Prescott SM, McIntyre TM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 by monocytes adherent to collagen and platelets. *Circ Res* 2001; 89:509-516.
71. Gardiner EE, Arthur JF, Kahn ML, Berndt MC, Andrews RK. Regulation of platelet membrane levels of glycoprotein VI by a platelet-derived metalloproteinase. *Blood* 2004; 104:3611-3617.
72. Gavel Y, von Heijne G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* 1990; 3:433-442.
73. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115:3378-3384.
74. Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, Barnes M, Watson SP. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor  $\gamma$ -chain. *FEBS Lett* 1997;413:255-259.
75. Gimbrone M Jr, Cybulsky MI, Kume N, Collins T, Resnick N. Vascular endothelium: An integrator of pathophysiological stimuli in atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 748:122-131.
76. Gimbrone MA Jr., Nagel T, Topper JN. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest* 1997; 99:1809-1813.
77. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The road ahead. *Cell* 2001; 104: 503-516.
78. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitor of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; 74:111-122.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

79. Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biswas C. Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1997; 272:24-27.
80. Hamm CW. Guidelines: Acute coronary syndrome. *Z Kardiol* 2004; 93: 324-341.
81. Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 1984; 226:544-547.
82. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1876-1890.
83. Haseneen NA, Vaday GG, Zucker S, Foda HD. Mechanical stretch induces MMP-2 release and activation in lung endothelium: role of EMMPRIN. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284:541-547.
84. Haug C, Lenz C, Diaz F, Bachem MG. Oxidized low-density lipoproteins stimulate extracellular matrix metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) release by coronary smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1823-1829.
85. Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, Foster K, Hembry R, Murphy G, Humphries S. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:8154-8158.
86. Jandrot-Perrus M, Busfield S, Lagrue AH, Xiong X, Debili N, Chickering T, Le Couedic JP, Goodearl A, Dussault B, Fraser C, Vainchenker W, Villeval JL. Cloning, characterization and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* 2000; 96:1798-1807.
87. Jarvis GE, Atkinson BT, Snell DC, Watson SP. Distinct roles of GPVI and integrin  $\alpha 2\beta 1$  in platelet shape change and aggregation induced by different collagens. *Br J Pharmacol* 2002; 137:107-117.
88. Jin ZG, Lungu AO, Xie L, Wang M, Wong C, Berk BC. Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1186-1191.
89. Jin ZG, Melaragno MG, Liao DF, Yan C, Haendeler J, Suh YA, Lambeth JD, Berk BC. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ Res* 2000; 87:789-796.
90. Kahn ML. Platelet-collagen responses: molecular basis and therapeutic promise. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30:419-425.
91. Kanekura T, Chen X, Kanzaki T. Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int J Cancer* 2002; 99:520-528.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

92. Kasirer-Friede A, Ware J, Leng L, Marchese P, Ruggeri ZM, Shattil SJ. 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* 2002; 277:11949–11956.
93. Kataoka H, DeCastro R, Zucker S, Biswas C. Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Res* 1993; 53:3154-3158.
94. Kim H, Kim WJ, Jeon ST, Koh EM, Cha HS, Ahn KS, Lee WH. Cyclophilin A may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages. *Clin Immunol* 2005; 116: 217-224.
95. Kim SH, Lessner SM, Sakurai Y, Galis ZS. Cyclophilin A as a novel biphasic mediator of endothelial activation and dysfunction. *Am J Pathol* 2004; 164:1567-1574.
96. Koch C, Staffler G, Hüttinger R, Hilgert I, Prager E, Cerny J, Steinlein P, Majdic O, Horejsi V, Stockinger H. T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density. *Int Immunol* 1999; 11:777-786.
97. Kofron JL, Kuzmic P, Kishore V, Colon-Bonilla E, Rich DH. Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis–trans isomerases by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry* 1991; 30:6127-6134.
98. KonttinenYT, Li TF, Mandelin J, Liljeström M, Sorsa T, Santavirta S, Virtanen I. Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 2000; 43:275-280.
99. Kruth HS. The fate of lipoprotein cholesterol entering the arterial wall. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8:246-252.
100. Lamparter S, Maisch B. Bedeutung von Matrix Metalloproteinasen bei kardiovaskulären Erkrankungen. *Z Kardiol* 2000; 89:949-957.
101. Laszik Z, Jansen PJ, Cummings RD, Tedder TF, McEver RP, Moore KL. P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some non hematopoietic cells. *Blood* 1996; 88:3010-3021
102. Lee RT, Schoen FJ, Loree HM, Lark MW, Libby P. Circumferential stress and matrix metalloproteinase 1 in human coronary atherosclerosis: implications for plaque rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:1070-1073.
103. Lendon CL, Davies MJ, Born GV, Richardson PD. Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophages density is increased. *Atherosclerosis* 1991; 87:87-90.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

104. Liang L, Major T, Bocan T. Characterization of the promoter of human extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN). *Gene* 2002; 282:75-86.
105. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation* 2002; 104:365-372.
106. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr* 2006; 83 (suppl.):456-460.
107. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420:868-874.
108. Libby P. The molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91:2844-2850.
109. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993; 13:197-204.
110. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmermann GA, Weyrich AS. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol* 2001; 154:485-490.
111. Liu J, Farmer JDJ, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; 66:807-815.
112. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res* 2000; 46:214-224.
113. Li Z, Li L, Zielke HR, Cheng L, Xiao R, Crow MT, Stetler-Stevenson WG, Froehlich J, Lakatta EG. Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1996; 148:121-128.
114. Loftus IM, Naylor AR, Bell PRF, Thompson MM. Matrix metalloproteinases and atherosclerotic plaque instability. *British Journal of Surgery* 2002; 89:680-694.
115. Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Crowther M, Jones L, Bell PR, Thompson MM. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke* 2000; 31:40-47.
116. Loree HM, Kamm RD, Stringfellow RG, Lee RT. Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels. *Circ Res* 1992; 71:850-858.
117. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233-241.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

118. Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation* 1997; 96:396-399.
119. Mahoney TS, Weyrich AS, Dixon DA, McIntyre T, Prescott SM, Zimmerman GA. Cell adhesion regulates gene expression at translational checkpoints in human myeloid leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:10284-10289.
120. Major TC, Liang L, Lu X, Rosebury W, Bocan TM. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is induced upon monocyte differentiation and is expressed in human atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1200-1207.
121. Malik N, Greenfield BW, Wahl AF, Kiener PA. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *J Immunol* 1996; 156:3952-3960.
122. Martinez A, Salas E, Radomski A, Radomski MW. Matrix metalloproteinase-2 in platelet adhesion to fibrinogen: interactions with nitric oxide. *Med Sci Monit* 2001; 7:646-651.
123. Massberg S, Gawaz M, Grüner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhöfer D, Heinzmann U, Nieswandt B. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med* 2003; 197:41-49.
124. Massberg S, Konrad I, Bültmann A, Schulz C, Münch G, Peluso M, Lorenz M, Schneider S, Besta F, Müller I, Bin H, Langer H, Kremmer E, Rudelius M, Heinzmann U, Ungerer M, Gawaz M. Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *FASEB J* 2004; 18:397-399.
125. Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlnhoefer D, Hoppe K, Schiemann M, Kennerknecht E, Sauer S, Schulz C, Kerstan S, Rudelius M, Seidl S, Sorge F, Langer H, Peluso M, Goyal P, Vestweber D, Emambokus NR, Busch DH, Frampton J, Gawaz M. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1 alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med* 2006; 203:1221-1233.
126. May AE, Kälsch T, Massberg S, Herouy Y, Schmidt R, Gawaz M. Engagement of glycoprotein IIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation* 2002; 106:2111-2117.
127. May AE, Kanse SM, Lund LR, Gisler RH, Imhof BA, Preissner KT. Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via beta2-integrins in vivo. *J Exp Med* 1998; 188:1029-1037.
128. May AE, Neumann FJ, Schömig A, Preissner KT. VLA-4 (alpha(4)beta(1)) engagement defines a novel activation pathway for beta(2) integrin-dependent leukocyte adhesion involving the urokinase receptor. *Blood* 2000; 96:506-513.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

129. May AE, Seizer P, Gawaz M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:5-10.
130. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997; 100:97-103.
131. Miyauchi T, Kanekura T, Yamaoka A, Ozawa M, Miyazawa S, Muramatsu T. Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the beta-chain of major histocompatibility complex class II antigen. *J Biochem* 1990; 107:316-323.
132. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation* 1994; 90:775-778.
133. Murphy G, Willenbrock F. Tissue inhibitors of matrixmetalloendopeptidases. *Meth Enzymol* 1995; 248:496-510.
134. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of Risk factors: Global burden of disease study. *Lancet* 1997; 349:1436-42.
135. Nabeshima K, Lane WS, Biswas C. Partial sequencing and characterization of the tumor cell-derived collagenase stimulatory factor. *Arch Biochem Biophys* 1991; 285:90-96.
136. Nabeshima K, Suzumiya J, Nagano M, Ohshima K, Toole BP, Tamura K, Iwasaki H, Kikuchi M. Emmprin, a cell surface inducer of matrixmetalloproteinases (MMPs), is expressed in T-cell lymphomas. *J Pathol* 2004; 202:341-351.
137. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274:21491-21494.
138. Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meinel C, May AE, Schömig A. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation* 1997; 95:2387-2394.
139. Nieswandt B, Bergmeier W, Schulte V, Rackebrandt K, Gessner JE, Zirngibel H. Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRγ-chain. *J Biol Chem* 2000; 275:23998-24002.
140. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fässler R. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001; 20:2120-2130.
141. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003; 102:449-461.
142. Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE, Clowes AW. Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation* 1995; 92:1393-1398.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

143. Pathak SK, Basu S, Bhattacharyya A, et al. TLR4-dependent NF $\kappa$ B activation and mitogen- and stress-activated protein kinase1-triggered phosphorylation events are central to *Helicobacter pylori* peptidyl prolyl cis-, trans-isomerase (HP0175)-mediated induction of IL-6 release from macrophages. *J Immunol* 2006; 177:7950-7958.
144. Payeli SK, Schiene-Fischer C, Steffel J, Camici GG, Rozenberg I, Lüscher TF, Tanner FC. Cyclophilin A differentially activates monocytes and endothelial cells: role of purity, activity, and endotoxin contamination in commercial preparations. *Atherosclerosis* 2008; 197:564-571.
145. Penz S, Reiningner AJ, Brandl R, Goyal P, Rabie T, Bernlochner I, Rother E, Goetz C, Engelmann B, Smethurst PA, Ouwehand WH, Farndale R, Nieswandt B, Siess W. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *FASEB J* 2005; 19:898-909.
146. Pizzi MA, Crowe MJ. Transplantation of fibroblasts that overexpress matrix metalloproteinase-3 into the site of spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 2006; 23:1750-1765.
147. Poole A, Gibbins JM, Turner M, Vugt van MJ, Winkel van de JGJ, Saito T, Watson SP. The Fc receptor  $\gamma$ -chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelet by collagen. *EMBO J* 1997; 16:2333-2341.
148. Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1992; 140:665-673.
149. Preissner KT, Kanse SM, May AE. Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12:621-628.
150. Pressemitteilung des Statistischen Bundesamtes Deutschland 2006.
151. Pushkarsky T, Yurchenko V, Vanpouille C, Brichacek B, Vaisman I, Hatakeyama S, Nakayama KI, Sherry B, Bukrinsky MI. Cell surface expression of CD147/EMMPRIN is regulated by cyclophilin 60. *J Biol Chem* 2005; 280:27866-27871.
152. Pushkarsky T, Zybarth G, Dubrovsky L, Yurchenko V, Tang H, Guo H, Toole B, Sherry B, Bukrinsky M. CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:6360-6365.
153. Radomski A, Stewart MW, Jurasz P, Radomski MW. Pharmacological characteristics of solid-phase von Willebrand factor in human platelets. *Br J Pharmacol* 2001; 134:1013-1020.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

154. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. *J Clin Invest* 1996; 98:2572-2579.
155. Rekhater MD. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc Res* 1999; 41:376-384.
156. Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol* 1990; 136:1229-1233.
157. Romanic AM, Madri JA. The induction of 72-kD gelatinase in T cells upon adhesion to endothelial cells is VCAM-1 dependent. *J Cell Biol* 1994; 125:1165-1178.
158. Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC, Lopez JA. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counter receptor for P-selectin. *J Exp Med* 1999; 190:803-814.
159. Rong JX, Rangaswamy S, Shen L, Dave R, Chang YH, Peterson H, Hodis HN, Chisolm GM, Sevanian A. Arterial injury by cholesterol oxidation products causes endothelial dysfunction and arterial wall cholesterol accumulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1885-1894.
160. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 1998; 29:2189-2195.
161. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126.
162. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002; 8:1227-1234.
163. Sameshima T, Nabeshima K, Toole BP, Inoue T, Yokogami K, Nakano S, Ohi T, Wakisaka S. Correlation of emmprin expression in vascular endothelial cells with blood-brain-barrier function: a study using magnetic resonance imaging enhanced by Gd-DTPA and immunohistochemistry in brain tumors. *Virchows Arch* 2003; 442:577-584.
164. Santos-Martinez MJ, Medina C, Jurasz P, Radomski MW. Role of metalloproteinases in platelet function. *Thromb Res* 2008; 121:535-542.
165. Santoso S, Sachs UJ, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, Chavakis T. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med* 2002; 196:679-691.
166. Sawicki G, Salas E, Murat J, Miszta-Lane H, Radomski MW. Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature* 1997; 386:616-619.
167. Sawicki G, Sanders EJ, Salas E, Wozniak M, Rodrigo J, Radomski MW. Localization and translocation of MMP-2 during aggregation of human platelets. *Thromb Haemost* 1998; 80:836-839.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

168. Schlosshauer B, Bauch H, Frank R. Neurothelin: amino acid sequence, cell surface dynamics and actin colocalization. *Eur J Cell Biol* 1995; 68:159-166.
169. Schlosshauer B. The blood-brain barrier: morphology, molecules, and neurothelin. *Bioessays* 1993; 15:341-346.
170. Schmidt R, Bültmann A, Fischel S, Gillitzer A, Cullen P, Walch A, Jost P, Ungerer M, Tolley ND, Lindemann S, Gawaz M, Schömig A, May AE. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor- $\kappa$ B-dependent inflammation in monocytes. *Circ Res* 2008; 102:302-309.
171. Schmidt R, Bültmann A, Ungerer M, Joghetaei N, Bulbul O, Thieme S, Chavakis T, Toole BP, Gawaz M, Schomig A, May AE. Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction. *Circulation* 2006; 113:834-841.
172. Schober A, Knarren S, Lietz M, Lin EA, Weber C. Crucial role of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2003; 108: 2491-2497.
173. Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, Libby P. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T-lymphocytes. *Circ Res* 1997; 81:448-454.
174. Seizer P, Gawaz M, May AE. Platelet-monocyte interactions – a dangerous liaison linking thrombosis, inflammation and atherosclerosis. *Curr Med Chem* 2008; 15:1976-1980.
175. Sherry B, Yarlett N, Strupp A, Cerami A. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:3511-3515.
176. Sheu JR, Fong TH, Liu CM, Shen MY, Chen TL, Chang Y, Lu MS, Hsiao G. Expression of matrix metalloproteinase-9 in human platelets: regulation of platelet activation in in vitro and in vivo studies. *Br J Pharmacol* 2004; 143:193-201.
177. Sidhu SS, Mengistab AT, Tauscher AN, LaVail J, Basbaum C. The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions. *Oncogene* 2004; 23: 956-963.
178. Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J, McIntire LV, Ballantyne CM, Zhang L, Furman MI, Berndt MC, Lopez JA. Platelet glycoprotein Ib $\alpha$  is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med* 2000; 192:193-204.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

179. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, Bond BR, Gunasinghe HR, Etoh T, Goldberg AT, Zellner JL, Crumbley AJ. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation* 2000; 102:1944-1949.
180. Springmann EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen B, Van Wart HE. Multiple methods of activation of latent fibroblast collagenase: evidence for the role of Cys73 active-site zinc complex in latency and a „cystein-switch“ mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:364-368.
181. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte migration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76:301-314.
182. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and histological classification of atherosclerosis: A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis. *Circulation* 1995; 92:1355-1374.
183. Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* 2002; 105:2107-2111.
184. Stephens G, Yan Y, Jandrot-Perrus M, Villeval JL, Clemetson KJ, Phillips DR. Platelet activation induces metalloproteinase-dependent GPVI cleavage to down-regulate platelet reactivity to collagen. *Blood* 2005; 105:186-191.
185. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:463-516.
186. Subramaniam M, Frenette PS, Saffaripour S, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice. *Blood* 1996; 87:1238-1242.
187. Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman HA, Libby P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1998; 102:576-583.
188. Sun J, Hemler ME. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res* 2001; 61:2276-2281.
189. Suzuki J, Jin ZG, Meoli DF, Matoba T, Berk BC. Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2006; 98:811-817.
190. Tabas I. Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis. *Ann Rev Nutr* 1999; 19:123-139.
191. Tangelder GJ, Slaaf DW, Arts T. Wall shear rate in arterioles in vivo: least estimates from platelet velocity profiles. *Am J Physiol* 1988; 254:1059-1064.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

192. Tang W, Chang SB, Hemler ME. Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. *Mol Biol Cell* 2004; 15:4043-4050.
193. Tang W, Hemler ME. Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering. *J Biol Chem* 2004; 279:11112-11118.
194. Tang Y, Nakada MT, Kesavan P, McCabe F, Millar H, Rafferty P, Bugelski P, Yan L. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 2005; 65:3193-3199.
195. Tegeder I, Schumacher A, John S, Geiger H, Geisslinger G, Bang H, Brune K. Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis. *J Clin Immunol* 1997; 17:380-386.
196. Tolonen H, Dobson A, Kulathinal S. Effect on trend estimates of the difference between survey respondents and non-respondents: Results from 27 populations in the WHO MONICA project. *Eur J Epidemiol* 2005; 20:887-898.
197. Tomita T, Nakase T, Kaneko M, Shi K, Takahi K, Ochi T, Yoshikawa H. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 373-378.
198. Toole BP. EMMPRIN (CD 147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production by fibroblasts. *J Cell Physiol* 2001; 186:371-379.
199. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1262-1275.
200. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92:827-839.
202. Wang J, Sica A, Peri G, Walter S, Padura IM, Libby P, Ceska M, Lindley I, Colotta F, Mantovani A. Expression of chemotactic protein and interleukin-8 by cytokine-activated human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991; 11:1166-1174.
203. Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res* 2005; 96:612-616.
204. Westermarck J, Kähäri V. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999; 13:781-792.
205. Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, Prescott SM, Zimmermann GA. Activated signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest* 1996; 97:1525-1534.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

206. Weyrich AS, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA. Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation. *J Clin Invest* 1995; 95:2297-2303.
207. Witztum JL, Berliner JA. Oxidized phospholipids and isoprostanes in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9:441-448.
208. Xu Q, Leiva MC, Fischkoff SA, Handschumacher RE, Lyttle CR. Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J Biol Chem* 1992;
209. Yang J, Furie BC, Furie B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost* 1999; 81:1-7.
210. Yang Y, Zhu P. CD147 facilitates Cyclophilin A-induced MMP-9 expression on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis. *Journal of US-China Medical Science* 2007; 4:55-62.
211. Yan L, Zucker S, TooleBP. Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. *Thromb Haemost* 2005; 93:199-204.
212. Yoshida S, Shibata M, Yamamoto S, Hagihara M, Asai N, Takahashi M, Mizutani S, Muramatsu T, Kadomatsu K. Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its N-terminal immunoglobulin domain. *Eur J Biochem* 2000; 267:4372-4380.
213. Yurchenko V, Constant S, Bukrinsky M. Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins. *Immunology* 2006; 117:301-309.
214. Yurchenko V, Zybarth G, O'Connor M, Dai WW, Franchin G, Hao T, Guo H, Hung HC, Toole B, Gallay P, Sherry B, Bukrinsky M. Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J Biol Chem* 2002; 277:22959-22965.
215. Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev* 2007; 21:99-111.
216. Zheng YM, Liu C, Chen H, Locke D, Ryan JC, Kahn ML. Expression of the platelet receptor GPVI confers signaling via the Fc receptor  $\gamma$ -chain in response to the snake venom convulxin but not to collagen. *J Biol Chem* 2001; 276:12999-13006.
217. Zhu P, Ding J, Zhou J, Dong WJ, Fan CM and Chen ZN. Expression of EMMPRIN on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis: its potential role in monocyte accumulation and matrix metalloproteinase production. *Arthritis Res Ther* 2005; 7:1023-1033.
218. Zirlik A, Maier C, Gerdes N, MacFarlane L, Soosairajah J, Bavendiek U, Ahrens I, Ernst S, Bassler N, Missiou A, Patko Z, Aikawa M, Schönbeck U, Bode C, Libby P, Peter K. CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation* 2007; 115:1571-1580.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

219. Zucker S, Hymowitz M, Rollo EE, Mann R, Conner CE, Cao J, Foda HD, Tompkins DC, Toole BP. Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer. *Am J Pathol* 2001; 158:1921-1928.

**7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1	Initiierung der atherosklerotischen Läsionsbildung.....	2
Abbildung 2	Läsionsprogression .....	3
Abbildung 3	Plaqueruptur und Thrombusbildung .....	5
Abbildung 4	Thrombozyten-Interaktionen bei der Bildung atherosklerotischer Plaques.....	8
Abbildung 5	Aktivierungskaskade der Matrix Metalloproteinasen .....	12
Abbildung 6	Aufbau von EMMPRIN .....	14
Abbildung 7	Lokalisation thrombozytären EMMPRINs.....	16
Abbildung 8	Versuchsaufbau einer dynamischen Flusskammeruntersuchung .....	30
Abbildung 9	Aus Monozyten kultivierte Schaumzellen.....	36
Abbildung 10	Stimulierte Thrombozyten zeigen auf EMMPRIN signifikant gesteigertes Rolling.....	39
Abbildung 11	EMMPRIN vermittelt keine signifikant erhöhte thrombozytäre Adhärenz.....	40
Abbildung 12	Eine Antikörper-vermittelte Blockade von thrombozytärem GPVI und EMMPRIN hemmt das Thrombozytenrolling auf EMMPRIN .....	41
Abbildung 13	EMMPRIN-transfizierte CHO-Zellen zeigen signifikant erhöhtes Rolling auf rekombinantem Glykoprotein VI oder rekombinantem EMMPRIN.....	43
Abbildung 14	Glykoprotein VI-exprimierende CHO-Zellen zeigen signifikant erhöhtes Rolling auf rekombinantem EMMPRIN.....	43
Abbildung 15	Rekombinantes GPVI-Fc bindet spezifisch an immobilisiertes EMMPRIN-Fc.....	44
Abbildung 16	Diagramm der Oberflächenplasmonenresonanzanalyse .....	45
Abbildung 17	Rekombinantes EMMPRIN führt nicht zu thrombozytärer Aggregation.....	46
Abbildung 18	Expression von EMMPRIN und CyPA in atherosklerotischen Plaques ApoE-defizienter Mäuse.....	48

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abbildung 19	EMMPRIN-vermittelte Freisetzung von MMP-9 aus mit Cyclophilin A behandelten Monozyten .....	49
Abbildung 20	Lösliches CyPA bzw. Fc-EMMPRIN induziert MMP-9-Freisetzung aus Schaumzellen .....	50
Abbildung 21	Thrombozytäre P-Selektin-Oberflächenexpression nach Stimulation mit 100 nM CyPA im Vergleich zu unstimulierten und ADP-stimulierten Thrombozyten .....	51
Abbildung 22	Thrombozytäre EMMPRIN-Oberflächenexpression nach Stimulation mit 100 nM CyPA im Vergleich zu unstimulierten und ADP-stimulierten Thrombozyten .....	52
Abbildung 23	Thrombozytäre SDF-1-Oberflächenexpression nach Stimulation mit 100 nM CyPA im Vergleich zu unstimulierten und ADP-stimulierten Thrombozyten .....	52
Abbildung 24	Die aktivierungsabhängige Aufregulation thrombozytären P-Selektins durch CyPA lässt sich durch den blockierenden Antikörper Anti-EMMPRIN wirkungsvoll inhibieren.....	53

### 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACD	Acid-Citrate-Dextrose
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
ApoE	Apolipoprotein E
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CD	Zelloberflächenmarker (cluster of differentiation)
CHO-Zellen	Ovarialzellen chinesischer Hamster (Chinese hamster ovary cells)
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
CsA	Cyclosporin A
CyP	Cyclophilin
ECM	Extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDC	Ethylldiaminopropylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
EMMPRIN	Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer
F(ab)	Antikörperfragment (antigen binding fragment)
FACS	Fluoreszenz-aktiviertes Zellsortierungssystem (fluorescence activated cell sorting system)
Fc	konstanter Abschnitt eines Antikörpers
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
g	(Erd-) Schwerebeschleunigung
GP	Glykoprotein
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül (intercellular adhesion molecule-1)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
JAM-C	Junctional adhesion molecule-C
kDa	Kilodalton
L	Ligand
l	Liter
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (low density lipoprotein)
MAC-1	Makrophagenantigen-1 (macrophage antigen-1)
mAk	monoklonaler Antikörper
mdeg	Millidegree
MCP-1	Protein für die Chemotaxis von Monozyten (monocyte chemotactic protein-1)
M-CSF	Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor (macrophage-colony stimulation factor)
MCT-1	Monocarboxylat-Transporter-1
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MOPS	3-N-Morpholino-Propansulfonsäure
MT-MMP	membranständige MMPs (membrane type-MMPs)
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogenkarbonat
NF-κB	nukleärer Transkriptionsfaktor (nuclear factor 'κ-light-chain-enhancer' of B-cells)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
oxLDL	Oxidiertes LDL
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PDGF	Wachstumsfaktor von Thrombozyten abstammend (platelet derived growth factor)
PF4	Plättchenfaktor 4
pH	Kraft des Wasserstoffes (potentia Hydrogenii)
PPP	Plättchenarmes Plasma (platelet poor plasma)
PRP	Plättchenreiches Plasma (platelet rich plasma)
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand
rpm	Umdrehungen/min (rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkription
SDF-1	Stromal derived factor-1
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (sodium dodecyl sulfat)
SSC	Seitwärtsstreulicht(side scatter)
TCSF	Tumor cell derived collagenase stimulatory factor
TGF- $\beta$	transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor- $\beta$ )
TIMP	Inhibitoren der MMPs des Gewebes (tissue inhibitors of metalloproteinases)
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheiten (Units)
uPAR	Urokinase Plasminogen-aktivierender Rezeptor (urokinase plasminogen activator receptor)
VCAM-1	Adhäsionsmolekül für vaskuläre Zellen (vascular cell adhesion molecule-1)
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	von Willebrand Faktor
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

### 9 DANKSAGUNG

An erster Stelle derer, bei denen ich mich an dieser Stelle besonders herzlich bedanken möchte, steht sicher Herr Professor Andreas May, leitender Oberarzt der Kardiologie des Universitätsklinikums Tübingen. Dieser überließ mir dieses interessante Thema und gab mir die unschätzbare Möglichkeit, unter seiner persönlichen Betreuung die Fragestellungen der vorliegenden Dissertation in der experimentellen Kardiologie zu bearbeiten. Dabei stand mir Herr Professor May jederzeit mit wertvollen Ratschlägen zur Seite.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Professor Meinrad Gawaz, dem ärztlichen Direktor der Kardiologie des Universitätsklinikums Tübingen, für die durch ihn geschaffenen hervorragenden Arbeitsbedingungen in den von ihm freundlicherweise zu Verfügung gestellten Forschungseinrichtungen.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Peter Seizer und Herrn Dr. Harald Langer. Beide hatten bei Rückfragen immer wieder äußerst hilfsbereit zur Verfügung gestanden.

Herrn Professor Thomas Simmet (Universitätsklinik Ulm) danke ich ebenso wie Frau Dr. Tanja Schönberger und Herrn Dr. Andreas Bültmann für die stets freundliche und überaus fruchtbare Zusammenarbeit.

Abschließend möchte ich mich noch besonders bei Iris Schäfer, Heike Runge, Hanna Schnell und Klaudia Posavec für die tolle Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken.

### 10 Curriculum vitae

#### Schulbildung:

- 1988-1992 Besuch der Grundschule in Eningen u.A.  
1992-2001 Besuch des Friedrich-List-Gymnasiums in Reutlingen  
Abitur im Juni 2001

#### Zivildienst:

- 2001-2002 Rettungsdienst des DRK Kreisverband Reutlingen  
Ausbildung zum Rettungssanitäter

#### Studium:

- 2002-2007 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen  
09/04 Ärztliche Vorprüfung/1. Ärztliche Prüfung  
Famulaturen:  
03/05-04/05 Innere Medizin KKH Reutlingen  
08/05-09/05 Pädiatrie Universitätsklinik Tübingen  
02/06-04/06 Unfallchirurgie Kantonsspital Luzern  
08/06-10/06 Kardiologie Universitätsspital Zürich  
02/07-04/07 Chirurgie Katutura State Hospital Windhoek/NA  
01/08-02/08 Kardiologie Universitätsklinik Freiburg  
04/07-07/07 Studentischer Tutor  
Kinderkardiologie Universitätsklinik Tübingen
- 2007/2008 Wissenschaftliche Mitarbeit in der Experimentellen Kardiologie  
Medizinische Klinik III des Universitätsklinikums Tübingen
- 2008/2009 Praktisches Jahr  
02/08-06/08 Anästhesiologie KKH Reutlingen  
06/08-09/08 Herz-Thorax-Chirurgie Kantonsspital Luzern  
09/08-11/08 Kardiologie Universitätsspital Zürich  
11/08-01/09 Innere Medizin Kantonsspital Luzern
- 2009 04/09-06/09 Staatsexamen/2. Ärztliche Prüfung („sehr gut“)  
05.06. 2009 Erlangung der Ärztlichen Approbation