

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Bedeutung der MAC-1-CD147-Interaktion für Monozyten
und Thrombozyten**

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

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

vorgelegt von

Nöthel, Moritz Thomas

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Seizer

2. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Beer-Hammer

Tag der Disputation: 12.05.2021

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

<u>1 EINLEITUNG</u>	- 1 -
1.1 ATHEROSKLEROSE UND DIE GRUNDLAGEN DER KORONAREN HERZKRAKHEIT	- 2 -
1.2 THROMBOZYTEN	- 3 -
1.3 MONOZYTEN	- 4 -
1.4 MATRIX METALLOPROTEASEN	- 5 -
1.5 MAC-1	- 6 -
1.6 CD147	- 7 -
<u>2 ZIEL DER ARBEIT</u>	- 9 -
<u>3 METHODEN UND MATERIALIEN</u>	- 10 -
3.1 MATERIAL	- 10 -
3.1.1 SUBSTANZEN	- 10 -
3.1.2 REKOMBINANTE PROTEINE	- 11 -
3.1.3 ANTIKÖRPER	- 12 -
3.1.4 VERBRAUCHSMATERIALEN	- 13 -
3.1.5 GERÄTE	- 13 -
3.1.6 SOFTWARE.....	- 14 -
3.2. METHODEN	- 16 -
3.2.1 ISOLATION VON MONOZYTEN	- 16 -
3.2.2 NEUBAUER-KAMMER	- 17 -
3.2.3 ISOLATION VON THROMBOZYTEN.....	- 17 -
3.2.4 UNTERSUCHUNGEN IN DER FLUSSKAMMER.....	- 18 -
3.2.5 STATISCHER ADHÄSIONS-ASSAY.....	- 21 -
3.2.6 ZYMOGRAMM	- 22 -
3.2.7 MAC-1/ CD147/ BSA-BINDUNGS-ELISA	- 23 -
3.2.8 FLUORESCENZFÄRBUNG HUMANER MONOZYTEN	- 24 -
3.3. GENEHMIGUNG DER TIERVERSUCHE	- 25 -
3.4. STATISTISCHE AUSWERTUNG	- 25 -
<u>4. ERGEBNISSE</u>	- 26 -
4.1. NACHWEIS EINER BINDUNG ZWISCHEN MAC-1 UND CD147	- 26 -

4.2 KOLOKALISATION VON MAC-1 UND CD147 AUF DER ZELLMEMBRAN DER MONOZYTEN	- 28 -
4.3. ADHÄRENZVERHALTEN HUMANER MONOZYTEN UNTER FLUSSBEDINGUNGEN NACH INHIBITION VON MAC-1 ODER CD147	- 32 -
4.3.1 MAC-1 BESCHICHTETE OBERFLÄCHE	- 32 -
4.3.2 CD147 BESCHICHTETE OBERFLÄCHE	- 36 -
4.4. VERMINDERTE ADHÄRENZ MURINER MONOZYTEN IM STATISCHEN MODELL BEI FEHLENDER MAC-1 EXPRESSION	- 39 -
4.5. REDUZIERTE ADHÄRENZ MURINER MONOZYTEN UNTER STATISCHEN BEDINGUNGEN BEI VERMINDERTER CD147-EXPRESSION	- 41 -
4.6. GERINGERE CD147-EXPRESSION MURINER MONOZYTEN BEWIRKT KEINE SIGNIFIKANTE ÄNDERUNG DER ADHÄSIONSFÄHIGKEIT UNTER FLUSSBEDINGUNGEN	- 43 -
4.8 MAC-1 INDUZIERT KEINE SIGNIFIKANTE SEKRETION VON MATRIX-METALLOPROTEASE-9 AUS MONOZYTEN.	- 49 -
5. DISKUSSION	- 52 -
5.1 MAC-1 IST EIN NEUER BINDUNGSPARTNER FÜR CD147	- 53 -
5.2. DIE INTERAKTION VON CD147 UND MAC-1 IST EIN WEITERER ANSATZPUNKT FÜR DIE ADHÄSION VON THROMBOZYTEN UND MONOZYTEN	- 55 -
5.3. MAC-1 INDUZIERT KEINE FREISETZUNG VON MATRIX-METALLOPROTEASEN	- 58 -
6. ZUSAMMENFASSUNG	- 59 -
7. LITERATURVERZEICHNIS	- 61 -
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	- 66 -
9. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	- 68 -
10. PUBLIKATIONSLISTE	- 70 -
11. DANKSAGUNG	- 71 -
12. LEBENSLAUF	- 72 -

Abkürzungsverzeichnis:

ACD	<i>Acid-Citrate-Dextrose</i>
ACS	<i>Acute coronary syndrome</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Angina pectoris
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CPDA	<i>Citrate phosphate dextrose adenine</i>
CypA	Cyclophilin A
EMMPRIN	<i>Extracellular matrix metalloproteinase inducer</i> syn. CD147, Basigin, Bsg
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
h	Stunden
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JAM-3	<i>Junctional adhesion molecule 3</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte-function associated antigen 1</i> syn. $\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18
LPS	Lipopolysaccharide
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MAC-1	<i>Macrophage-1 Antigen</i> syn. $\alpha_M\beta_2$, <i>complement receptor 3</i> (CR3), CD11b/CD18
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic Protein</i>
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minuten

ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloprotease
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
OD	<i>Optical density</i>
PBS	<i>Phosphate-bufferd saline</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute-1640</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
TBST	<i>Tris-buffered-saline with Tween-20</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinase</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VCAM-1	<i>Vascular-cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
vWF	Von-Willebrand Faktor
μm	Mikrometer

1 Einleitung

Erkrankungen des Kreislaufsystems stellen nach Angabe des statistischen Bundesamtes mit 35,3% die häufigste Todesursache in Deutschland dar. Im Jahr 2019 verstarben 331 211 Menschen in Deutschland an kardiovaskulären Erkrankungen, davon über 119 000 an den Folgen einer ischämischen Herzkrankheit. Aber auch andere Krankheitsbilder wie beispielsweise der Schlaganfall (10 702 Todesfälle 2019) mit allen seinen Folgeerscheinungen oder die periphere arterielle Verschlusskrankheit stellten ein häufiges Ereignis dar (1).

Die Kosten zur Behandlung der Erkrankungen des Kreislaufsystems beliefen sich 2015 auf 46.436 Mio. Euro. Dies entspricht 13,7 % der Kosten, die im deutschen Gesundheitssystem in diese Jahr anfielen (2).

Vor dem Hintergrund der Zunahme der individuellen Lebenserwartung wird sowohl für Länder mit hohen als auch mit niedrigen Einkommen eine hohe wirtschaftliche Belastung in den kommenden Jahren erwartet (3, 4).

Anlässlich der zunehmenden Morbidität sowie des enorm ansteigenden Kostenbedarfs stellt sich die Frage der weiteren ätiologischen Aufarbeitung sowie der Untersuchung neuer therapeutischer Ansätze.

Aufgrund der seit langem bestehenden Studienlage ist eindeutig gezeigt worden, dass beeinflusst durch die bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren (u.a. Nikotinabusus, Diabetes Mellitus, arterielle Hypertonie, Dyslipoproteinämie, genetische Prädisposition) die Atherosklerose pathophysiologisch die bedeutsamste Ursache der koronaren Herzkrankheit darstellt (3).

Untersuchungen unserer sowie anderer Arbeitsgruppen haben die wichtige Bedeutung des Immunsuperfamily Rezeptors *CD147* sowie des Oberflächenrezeptors MAC-1 für den Progress der Atherosklerose gezeigt (5, 6).

1.1 Atherosklerose und die Grundlagen der koronaren Herzkrankheit

Atherosklerose ist eine chronisch fortschreitende Erkrankung der großen Arterien. Die ersten Anzeichen, sogenannte „*Fatty Streaks*“, sind subendotheliale Anreicherungen von cholesterolhaltigen Makrophagen (auch Schaumzellen). Diese sind in den Herzkranzgefäßen bereits bei unter 20-Jährigen nachweisbar (7).

Hier kommt es initial durch einen erhöhten *Low-Density Lipoprotein-* (LDL-) Spiegel zu einer Ansammlung im Bereich der Intima (8-10). Durch Oxidation des LDL kommt es zu einer Entzündungsreaktion, welche über die Freisetzung von Phospholipiden zu einer vermehrten Endothelaktivierung führt (11). Dies findet vor allem an besonders strapazierten Segmenten mit oszillierendem Fluss aufgrund der vermehrten Scherkräfte statt (8).

Aufgrund der Aktivierung von Endothelzellen kommt es zu einer Hochregulation der Expression von Adhäsionsmolekülen. Adhäsionsmoleküle wie P- und E-Selektin vermitteln die Interaktion von Leukozyten über ein anfängliches „Rollen“ an der Gefäßwand hin zu einer festen Adhäsion. Dies wird vermittelt u.a. durch das *vascular-cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) (7). Insbesondere durch das ebenfalls hochregulierte *monocyte chemoattractant Protein-1* (MCP-1) werden vermehrt Monozyten adhären (7). Im Anschluss gelangen die adhären Leukozyten durch die sich öffnenden *Tight-junctions* in den Subendothelialraum (8).

Hier kommt es, vermittelt durch das ebenfalls durch oxidiertes LDL freigesetzt Zytokin *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), zu einer Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen (7).

Vermittelt über Scavenger-Rezeptoren wie SR-A und CD36 kommt es zur Phagozytose des oxidierten LDL. Dieses kumuliert im Zytosol, das typische Bild einer Schaumzelle entsteht (7, 8, 12).

Durch weitere Ansammlung von Leukozyten sowie Proliferation glatter Muskelzellen kommt es zu einer fortschreitenden Verdickung der Intima, welche

letztlich das Gefäßlumen einengt. Auf diese Weise entsteht das typische Bild der atherosklerotischen Plaque. Diese besteht aus einer fibrösen Kappe, welche den lipidhaltigen und thrombogenen Kern von dem Gefäßlumen separiert. Im Verlauf der Krankheit, oftmals beschleunigt durch persistierende kardiovaskuläre Risikofaktoren, kommt es zu einer zunehmenden Vergrößerung des lipidhaltigen Kerns. Hieraus können die Symptome einer stabilen Angina Pectoris (AP) resultieren, ein langer asymptomatischer Verlauf ist ebenfalls möglich (13-16). Kommt es allerdings im Bereich des Plaques zu einer Erosion oder Ruptur, so ist eine (sub-)totale Verlegung des Gefäßlumens die Folge. Ungefähr 60-70% der Myokardinfarkte entstehen auf diese Weise (14, 17, 18).

Möglich ist dies durch einen fragilen Übergangsbereich im Bereich der Schulter, dem Übergang zwischen Kappe und Gefäßwand. Durch T-Helferzellen wird eine Aktivierung von Makrophagen und Mastzellen induziert, welche u.a. zu einer Freisetzung von Interleukinen, Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) sowie Matrix Metalloproteasen (MMPs) führt. Letztere Proteasen sind in der Lage die extrazelluläre Matrix zu degradieren, es resultiert eine Ausdünnung der fibrösen Kappe (8, 10, 19).

Im Falle einer Ruptur/Erosion kommt es zu einer Freilegung der extrazellulären Matrix. Thrombozyten können unter Vermittlung des von Willebrand-Faktor (vWF) an diese binden, es kommt zu einer Thrombusbildung und einem (sub-)totalen Gefäßverschluss. Die Folge ist ein akutes Koronarsyndrom (ACS) (20).

1.2 Thrombozyten

Die kernlosen Thrombozyten entstehen als ca. 2,5 μm große Abschnürungen der Megakaryozyten. Sie nehmen eine wichtige Funktion in der primären und sekundären Hämostase ein. Hierfür zirkulieren die Thrombozyten frei in der Blutbahn. Kommt ein Thrombozyt im Rahmen einer Gefäßverletzung mit der extrazellulären Matrix in Kontakt, so kommt es zu einer rezeptorvermittelten Adhäsion (20).

Diese wird über den vWF und den entsprechenden Rezeptor (GPIb) initiiert. Im Anschluss sezerniert der Thrombozyt den Inhalt seiner Speichergranula, u.a. vWF, Fibrinogen, Fibronectin, Adenosindiphosphat (ADP) und Wachstumsfaktoren wie *platelet derived growth factor* (PDGF), P-Selectin (Synonym CD62P) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Dies führt zu einer Aktivierung weiterer Thrombozyten. Zudem ändert sich Aktin-vermittelt die Form des Thrombozyten, wodurch es zu einer Oberflächenvergrößerung kommt. Die Konformität des Fibrinogenrezeptors (GPIIb/IIIa) verändert sich ebenfalls, wodurch nun eine Bindung ermöglicht wird. Über die Quervernetzung mittels Fibrin bildet sich ein stabiler Thrombus (20, 21).

Über diesen Effekt hinaus konnte jedoch auch eine Beteiligung an atherosklerotischen Prozessen nachgewiesen werden, auch wenn kein Endothelschaden vorlag (22).

So wird über GPIIb α bei hohen einwirkenden Scherkräften eine Bindung an vWF und P-Selectin ermöglicht. Durch die Aktivierung der Thrombozyten und die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen kommt es zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen (u.a. VCAM-1) und Chemokinen (u.a. MCP-1) durch die Endothelzellen und konsekutiver Leukozytenadhäsion (23, 24).

1.3 Monozyten

Monozyten sind mit einer Größe von bis zu 20 μm die größten Leukozyten und leiten sich aus der hämatopoietischen Zellreihe ab. Sie verlassen nach kurzer Zirkulationszeit das Gefäßsystem um sich im Gewebe zu Makrophagen zu differenzieren. Diese nehmen eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem ein. Sie sind in der Lage Partikel, Zellbestandteile und auch pathogene Mikroorganismen zu phagozytieren und mittels Lysozym zu zersetzen. Darüber hinaus setzen Makrophagen diverse Zytokine (z.B. TNF, IL-1, IL-12) frei (20). Sie nehmen allerdings auch eine pro-entzündliche und regulatorische Funktion im Rahmen der Atherosklerose ein. Monozyten werden an der Gefäßmembran

durch Endothelschäden oder Aktivierung adhären (25). Dieser Prozess wird von adhären Plättchen unterstützt (5).

Anschließend sekretieren die Monozyten Matrix Metalloproteasen (MMPs) und exprimieren zudem membranständige MMPs, wodurch eine Migration in die Zellwand und somit in den entstehenden Plaque ermöglicht wird (5).

Dort differenzieren sich die Monozyten zu Makrophagen. Durch exprimierte Scavenger-Rezeptoren kommt es zu einer Bindung und anschließenden Phagozytose von oxidiertem Cholesterin, welches sich im Zytoplasma anreichert und so das typische Erscheinungsbild der Schaumzellen prägt (16, 26).

1.4 Matrix Metalloproteasen

Die über 20 verschiedenen Matrix-Metalloproteasen (MMP) sind Zink-abhängige Proteasen, die eine wichtige Rolle im Abbau von extrazellulärer Matrix spielen. Die meisten der MMPs sind sehr substratspezifisch. Dies ermöglicht eine Unterteilung in Kollagenasen (MMP-1/-8/-13), Gelatinasen (MMP-2/-9), Stromelysine (MMP-3/-10), Membrangebundene (MMP-14/-16) und sonstige (MMP-7/-12/-20) Matrixmetalloproteasen (27).

Da eine gesteigerte Aktivität zu einer Gewebsdestruktion führt, ist ein gut reguliertes Gleichgewicht essentiell. So besitzen die meisten der MMPs eine N-terminale Domäne, welche das katalytische Zentrum blockiert. Zudem ist eine Inaktivierung über sogenannte *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) möglich (27, 28).

Für die Progression der Atherosklerose spielt dies eine wichtige Rolle. So konnten in den Plaques vermehrt MMP-1/-2/-9 aber auch TIMP-1/-2 nachgewiesen werden, wobei es ein Ungleichgewicht zugunsten der Proteasen gab (29, 30). Dies geschieht vor allem durch eine gesteigerte Transkription, hierfür verantwortlich sind pro-inflammatorische Zytokine wie z.B. IL-1, IL-6, TNF- α und eine vermehrte CD40-vermittelte B-Zell-Aktivierung (29, 31).

Eine vermehrte Synthese von MMP-9 findet vor allem durch Monozyten statt, wenn eine Adhärenz an Kollagen und Thrombozyten besteht (32). Ein ähnlicher

Effekt kann bei Thrombozyten und MMP-2 nachgewiesen werden. Hier führt eine Aktivierung der Thrombozyten zur einer vermehrten Freisetzung von MMP-2, dies wiederum führt zu einer vermehrten ADP- und Thromboxan-unabhängigen Adhäsion weiterer Thrombozyten (33, 34).

Als weiterer Stimulator der Sekretion und Aktivierung von MMP-2, MMP-9 und MT1-MMP konnte der *extracellular matrix metalloproteinase inducer* (EMMPRIN, synonym auch CD147) nachgewiesen werden (35).

1.5 MAC-1

MAC-1 (*Macrophage-1 antigen*, synonym auch $\alpha_M\beta_2$, *complement receptor 3* (CR3) oder CD11b/CD18) ist ein β_2 -Integrin-Rezeptor, welcher aus einer α - und einer β -Untereinheit, beide mit einer extrazellulären Domäne, einem kurzen transmembranösen Anteil sowie einem zytoplasmatischem Schwanz besteht (36). Exprimiert wird MAC-1 auf Leukozyten (v.a. Neutrophile), Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie mononukleären Zellen wie Makrophagen. Hier kommt dem Integrin eine wichtige Rolle im Prozess der Phagozytose zu (36).

Normalweise befindet sich MAC-1 im Ruhezustand (*resting state*), eine Aktivierung ist über diverse Stimuli wie beispielsweise Phorbolster, Lipopolysaccharide (LPS), Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine möglich (37). Im Ruhezustand sind die transmembranösen und zytoplasmatischen Anteile der α - und β -Untereinheit dicht aneinander gelagert, dadurch bedingt ist die extrazelluläre Domäne auf die Zellmembran ausgerichtet und hat eine niedrige Affinität. Die sogenannte „*inside-out*“ Aktivierung führt zur Loslösung der Untereinheiten und damit zu einem Aufrichten der extrazellulären Domäne und konsekutiver Affinitätssteigerung (36, 38). Möglich wird die Trennung der Untereinheiten durch Anlagerung des zytoplasmatischen Proteins Talin an die β -Untereinheit. Eine Bindung an einen Liganden ist nun möglich (38, 39).

Anschließend kommt es im Rahmen der „*outside-in*“ Aktivierung zu einer Internalisierung des gebundenen Partikels (36). Dies erfolgt, anders als bei der

klassischen Phagozytose mit Ausbildung von Pseudopodien, durch ein Einsinken, ähnlich der Endozytose (40). In neueren Studien wurde jedoch auch eine Aktin- und Mikrotubuli-vermittelte Aufnahme durch eine gekräuselte Membran (*ruffled membrane*), die dem Einsinken vorausgeht, beschrieben (37). Die beschriebene Integrin-Aktivierung lässt sich ebenso auf das Adhäsionsverhalten anwenden (36). So wird wie Adhärenz zirkulierender Leukozyten an die Gefäßwand entscheidend durch β_2 -Integrine vermittelt. Diese binden an endotheliale Liganden (z.B. ICAM-1, VCAM-1) oder Bestandteile der extrazellulären Matrix (z.B. Fibrinogen) (41, 42).

MAC-1 spielt zudem eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Leukozyten und Plättchen: Nach initialer loser Interaktion und Rollen an aktivierten Thrombozyten, vermittelt durch P-Selektin, kommt es im Anschluss zu einer stabilen Bindung zwischen MAC-1 der Leukozyten und GPIIb α , *junctional adhesion molecule 3* (JAM-3) und GPIIb/IIIa (vermittelt über Fibrinogen). Nachfolgend findet eine Migration der Leukozyten in die Gefäßwand statt (41). Somit wird geschlossen, dass der Signalweg um MAC-1 ein Hauptakteur der vaskulären Entzündungsreaktion und somit Wegbereiter der Atherosklerose ist (42).

Ein Zusammenhang zwischen der MAC-1-vermittelten Adhäsion von Leukozyten und der Entwicklung einer Re-Stenose nach Koronarintervention wurde ebenfalls beschrieben (43).

1.6 CD147

CD147, auch bekannt als *extracellular matrix metalloproteinase inducer* (synonym EMMPRIN; CD147, Basigin) ist ein Glykoprotein der Immunglobulingruppe (44).

Erstmals nachgewiesen wurde CD147 als Oberflächenprotein bei Lungenkarzinomen mit einer Bedeutung für Metastasierung, Angiogenese und Chemoresistenz (45, 46). Im Verlauf gelang der Nachweis auf nicht-malignen Zellen, wenn auch in viel geringeren Mengen (47).

Es ist in der Lage, die Produktion verschiedener Matrix Metalloproteinasen (u.a. MMP-2/-3/-9/-14/-15) zu stimulieren, daher erfolgte eine Umbenennung in EMMPRIN, um dies zu verdeutlichen (45, 47).

CD147 wird konstitutiv auf Monozyten exprimiert, sowie u.a. auch in der hämatopoetischen Zellreihe, auf Endothelzellen, Keratinozyten und Thrombozyten (6, 48).

Es besteht aus einem 21 Aminosäuren großen Signalpeptid, einer 185 Aminosäure umfassenden extrazellulären Domäne, einer 24 Aminosäuren enthaltenden transmembranösen Domäne sowie einem zytoplasmatischen Anteil mit dem C-terminalen Ende, welches 39 Aminosäuren umfasst. Im extrazellulären Anteil sind zwei Cystein-Disulfidbrückenbindung ausgebildet, welche die zwei extrazellulären Ig-Domänen ECI (an der N-terminalen extrazellulären Domäne) und ECII (an C-terminalen extrazellulären Domäne) bilden. Der extrazelluläre Bereich besitzt zudem drei N-Glykosylierungen (46).

An der ECI-Domäne kommt es über eine homotypische Bindung mit einem weiteren CD147-Protein zu einer MMP-Induktion. Weitere Interaktionen an dieser Domäne wurden mit den Integrinen $\alpha_3\beta_1$ und $\alpha_6\beta_1$, beide wichtige Bindungspartner der Basalmembran, beschrieben (45, 49).

Ein direkter Zusammenhang konnte zwischen Caveolin-1 und der ECII-Domäne gezeigt werden: So vermittelt Caveolin-1 den Transport von CD147 aus dem Golgi-Apparat zur Zellmembran und verhindert hierbei eine Selbstaggregation mit weiteren CD147-Molekülen. Somit ist über Caveolin-1 eine Hemmung der CD147-Aktivität möglich (45, 50).

Der transmembranöse Anteil interagiert mit Cyclophilin A und kann ebenfalls die Bildung von MMPs sowie die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen stimulieren (51). Die intrazelluläre Domäne ist assoziiert mit einer Funktion als Chaperone für MCT1,-3 und -4 (46, 51). Nicht-membranständiges CD147 wird entweder durch proteolytische Prozesse oder über Abschnürung von Microvesikeln freigesetzt (46, 52, 53).

Vermittelt durch homotypische Bindungen ist zudem eine Adhäsion zwischen Monozyten ebenso wie eine Monozyten-Thrombozyten-Interaktion unabhängig von GPIIb α und GPIIb über CD147 möglich (34).

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl die stabile koronare Herzkrankheit als auch der akute Myokardinfarkt mit einer erhöhten CD147-Expression einhergeht (5, 6).

2 Ziel der Arbeit

Es hat sich gezeigt, dass für die Entstehung und Progression der Atherosklerose die Monozyten eine zentrale Rolle einnehmen. Ein erster Schritt hierzu ist die Adhäsion an der Gefäßwand, wodurch letztendlich die Diapedese ermöglicht wird. Vorausgehende Untersuchungen haben hier sowohl die Bedeutung von CD147 als auch die von MAC-1 für die Monozytenadhäsion beschrieben (5, 42). Ziel dieser Arbeit war es, die MAC-1 vermittelte Adhäsion von Mono- und Thrombozyten unter statischen sowie Flussbedingungen genauer zu untersuchen.

Eine besondere Beachtung kam der Interaktion von MAC-1 und CD147 zu, da beiden ein ähnlicher Einfluss zugeschrieben wurde, eine etwaige Wechselwirkung in Hinblick auf die Adhäsion von Mono- und Thrombozyten bisher jedoch noch nicht beschrieben wurde.

Insgesamt soll diese Arbeit dazu dienen, den Prozess der Atherosklerose zu einem frühen Zeitpunkt besser zu verstehen, um neue therapeutische Ansätze erarbeiten zu können.

3 Methoden und Materialien

3.1 Material

3.1.1 Substanzen

Substanzen	Hersteller	Sitz
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Serva	Heidelberg, DE
Bovines Serumalbumin	Applichem	Darmstadt, DE
Coomassie Brilliant Blue R-250	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Ethanol absolut	VWR	Radnor, PA, USA
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco	Waltham, MA, USA
Ficoll-Paque	GE Healthcare	Chicago, IL, USA
Fluorescent Mounting Medium	DAKO	Santa Clara, CA, USA
Formalin/Formaldehyd	Otto Fischar GmbH	Saarbrücken, DE
Gel-Drying Solution	Invitrogen/ Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Gelatine	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Glucose	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF)	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, DE
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE
HRP-konjugiertes Streptavidin (p0397)	Thermo Fischer Scientific	Waltham, MA, USA
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
PBS + Ca ²⁺ Mg ²⁺	Gibco	Waltham, MA, USA
Penicillin /Streptavidin (Pen/Strep)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Phosphate-buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA

Poly L-Lysine	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
RPMI 1640	Gibco	Waltham, MA, USA
Schwefelsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE
SeeBlue Plus2 Prestaind Standart	Gibco Invitrogen	Karlsruhe, DE
TBST	Gibco	Waltham, MA, USA
To-Pro3 Iodine	Life Technology/ Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Trypsin	Gibco	Waltham, MA, USA
Tryptanblau	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Zymogramm Developing Buffer	Invitrogen/ Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Zymogramm Renaturing Buffer	Invitrogen/ Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Zymogramm Sample Buffer	Invitrogen/ Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
β-Mercaptoethanol	Gibco	Waltham, MA, USA

3.1.2 Rekombinante Proteine

Rekombinante Proteine	Hersteller	Sitz
Rekominantes humanes MAC-1	R&D Systems	Minneapolis, USA
Rekombinates murines MAC-1	R&D Systems	Minneapolis, USA
Rekombinantes CD147	Sino Biological Inc	Peking, VR

3.1.3 Antikörper

Blockierende Antikörper	Code	Hersteller	Sitz
Maus IgG	Mouse IgG ₁ -UNLB	SouthernBiotech	Birmingham, AL, USA
Anti-CD147	UM8D6	Ancell	Bayport, MN, USA
Anti-MAC-1	M1/70	Abcam	Cambridge, GB

Primärantikörper	Code	Hersteller	Sitz
Anti-CD147 (Maus)	ab666	Abcam	Cambridge, GB
Anti-MAC-1 (Maus)	sc-20050	Santa-Cruz	Dallas, TX, USA
Maus IgG	sc-2025	Santa Cruz	Dallas, TX, USA

Sekundärantikörper	Code	Hersteller	Sitz
Kaninchen anti-Maus Antikörper (biotinyliert)	E0464	DAKO	Glostrup, Dänemark
Alexa Fluor [®] 488 (Ziege anti-Maus)	A-11059	Invitrogen	Waltham, MA, USA
Alexa Fluor [®] 568 (Kaninchen anti-Maus)	A-11057	Invitrogen	Waltham, MA, USA

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Sitz
1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf Safe-Lock Tubes™)	Eppendorf	Hamburg, DE
15 ml Reaktionsgefäß (BD Falcon™)	BD Biosciences	Franklin Lakes, NJ, USA
50 ml Reaktionsgefäß (BD Falcon™)	BD Biosciences	Franklin Lakes, NJ, USA
8,5 ml CPDA- (Citrat- Phosphat-Dextrose-Adenin) Monovetten	Sarstedt	Nümbrecht, DE
Cellstar® Gewebekulturplatte (6-,96 Wells)	Greiner BioOne	Kremsmünster, AUT
Deckglas	Karl Hecht GmbH	Sondheim, DE
Immobilion-FL PVDF Transfer-membran	Merck Millipore	Billerica, MA, USA
Kanüle (Knochenmark) (BD Microlance 26G)	BD Medical	Franklin Lakes, NJ, USA
Perfusorspritze 50 ml	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, DE
Spritze (1ml, 5ml, 20ml)	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, DE
Whatman Papier	GE Healthcare	Chicago, IL, USA
Zellkulturflasche Größe 550 ml CellStar	Greiner BioOne	Kremsmünster, AUT

3.1.5 Geräte

Geräte	Hersteller	Sitz
CO ₂ Inkubator	Sanyo Panasonic	Moriguchi, JP
ELISA Lesegerät (BioRad Model 550)	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
Flusskammer	Provitro AG	Berlin, DE

Lichtmikroskop Axiovert 200	Carl-Zeiss	Jena, DE
LSM5 Exicter Confocal Laser Scanning Mikroskop	Carl-Zeiss	Jena, DE
Neubauer-Zählkammer	NanoEnTek	Seoul, KR
Perfusor fm	BBraun	Melsungen, DE
Pipette	Eppendorf Research	Hamburg, DE
Pippettierhilfe Brand® Accu-jet® pro	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Sterilbank Herasafe™, Type HS18	Thermo Fischer Scientific	Waltham, MA, USA
Sysmex Hämatologie-System KX-21N	Sysmex	Kobe, JP
Tischzentrifuge Heraeus Multifuge 1S	Thermo Fischer Scientific	Waltham, MA, USA
Transferpipette Research Plus	Eppendorf Research	Hamburg, DE

3.1.6 Software

Programme	Hersteller	Sitz
AxioVision Rel 4.8	Carl-Zeiss	Jena, DE
EndNote X8	Clarivate Analytics	Boston, MA, USA
GraphPad Prism 8	Graphpad Prism Software,	La Jolla, CA, USA
SketchBook	Autodesk	San Rafael, CA, USA
Zen	Carl-Zeiss	Jena, DE

3.1.7 Puffer, Zellmedien und Lösungen

Monozytenmedium	500 ml RPMI 1640 50 ml FCS 5 ml Pen/Strep
------------------------	---

DC-Medium	500 ml RPMI 1640 50 ml FCS 5 ml HEPES 5 ml Pen/Strep 1,8 µl β-Mercaptoethanol
Coomassie Blue	0,25 g Coomassie Brilliant Blue 45 ml Aqua dest 45 ml Methanol 10 ml Eisessig (Essigsäure)
ACD-Puffer	12,5 g Na ₃ -Citrat 6,82 g Citronensäure 10 g Glucose ad 500 ml mit Aqua dest. pH-Einstellung auf 4,69 mit 1 N Natriumhydroxid
Tyrodes 10x	80 g Natriumchlorid 10,15 g Natriumhydrogencarbonat 1,95 g Kaliumchlorid 1000 ml Aqua dest.
Tyrodes pH 7,4 pH (+0,1% Glucose + 0,1%BSA)	20 ml Tyrodes 10x 180 ml Aqua dest. 0,2 g BSA 0,2 g Glucose pH-Einstellung auf 7,4 mit HEPES
Tyrodes pH 6,5 (+0,1% Glucose + 0,1%BSA)	50 ml Tyrodes pH 7,4 + 0,1% BSA/Glucose pH-Einstellung auf 6,5 mit 1 N Salzsäure
Zymogramm-Sample-Buffer 5x	2 ml 10%iges SDS 1ml Glycerin 1 Spatelspitze Bromphenolblau 6,5 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8
SDS Kammerpuffer 10x	30 g Tris (250mM) à 121,1 g/mol 144 g Glycin (1920 mM) 10 g SDS (1%) Auffüllen auf 1 L mit Aqua dest.
Tris-Puffer 1M pH 6,8	12,21 g Tris base in 70 ml Aqua dest. pH 6,8 mit 1 N Salzsäure einstellen Auffüllen auf 100 ml mit Aqua dest.

3.2. Methoden

3.2.1 Isolation von Monozyten

3.2.1.1 Humane Monozyten

Das humane Blut wird von gesunden Freiwilligen (Genehmigung der Ethikkommission der Universität Tübingen 270/2011BO1) in CDPA-Monovetten entnommen. Anschließend wird das Vollblut in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und danach vorsichtig über 25 ml Ficoll-Trennlösung in einem weiteren 50 ml Falcon geschichtet. Nun wird 20 Minuten (920 x g, keine Bremse) zentrifugiert. Die dabei entstehende Intermediärschicht aus vor allem Leukozyten wird mit einer sterilen Transferpipette abgenommen, erneut mit PBS verdünnt und weitere 10 Minuten (535 x g, mit Bremse) zentrifugiert. Das Sediment wird in RPMI Medium ausgesät und über Nacht bei 37°C in einer Zellkulturflasche inkubiert.

Anschließend wird der Überstand verworfen, da nur vitale Monozyten zur Adhärenz an der Plastikoberfläche befähigt sind. Diese werden mit Trypsinogen gelöst. Die Lyse wird mit Monozytenmedium gestoppt, sobald das Ablösen eines Großteils der Monozyten mikroskopisch beobachtet werden kann. Die in der Medium-suspension enthaltenen Monozyten werden nun 10 Minuten (535 x g, mit Bremse) zentrifugiert. Das Sediment wird vorsichtig in Monozytenmedium suspendiert und die Zellzahl anschließend in einer Neubauer-Kammer gezählt.

3.2.1.2 Murine Monozyten

Der murine Femur der heterozygoten Mäuse (Basigin^{+/-}), der homozygoten Mäuse (MAC-1^{-/-}, freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Dr. I. Mitroulis und Prof. Dr. T. Chavakis) und der Wildtyp-Kontrollgruppe (C57BL/6J) werden einfach verblindet entnommen, mit Ethanol gereinigt und anschließend mit Monozytenmedium abgespült. Dann werden die Epiphysen durchtrennt und das

Knochenmark mit einer feinen Kanüle (BD Microbalance 26G 1/2') sondiert und mit Monozytenmedium ausgespült. Die gewonnene Suspension wird durch ein 70 µm Filter gegeben und anschließend fünf Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen. Die verbleibenden Erythrozyten werden mit 155mM Ammoniumchlorid fünf Minuten lang lysiert, anschließend wird mit Monozytenmedium neutralisiert und erneut bei 300 x g fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wird wieder verworfen und der Bodensatz mit Monozytenmedium resuspendiert. Danach wird wieder fünf Minuten bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Bodensatz in Medium resuspendiert. Die Suspension wird dann mit GMCSF in einer 6 Well-Platte ausgesät und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Danach werden die Überstände verworfen und die Monozyten unter Beigabe von Monozytenmedium mechanisch gelöst. Anschließend erfolgt die Zählung in der Neubauerkammer.

3.2.2 Neubauer-Kammer

Die Zellsuspension wird 1:2 mit Trypanblau verdünnt. Anschließend wird die mittlere Zellzahl pro Großquadrat bestimmt und mit dem Volumenfaktor sowie dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Es ergibt sich die Zellzahl in einem Milliliter.

3.2.3 Isolation von Thrombozyten

Die Isolation humaner Thrombozyten erfolgt nach einem mehrfach vorbeschriebenen Protokoll, beispielsweise in Langer et al. 2009 (54).

Das Blut von gesunden Freiwilligen (Genehmigung der Ethikkommission der Universität Tübingen 270/2011BO1) wird direkt mit ACD-Puffer in einer 20 ml Spritze aufgezogen, in zwei 15 ml Reaktionsgefäße überführt und anschließend bei 210 x g ohne Bremse 20 Minuten zentrifugiert. Das nun abgesetzte Plasma wird abpipettiert und mit dem Tyrodes-Puffer (pH 6,5) vermischt. Anschließend

wird die Suspension bei 836 x g 10 Minuten zentrifugiert. Danach wird der Überstand verworfen und das am Boden verbliebene Pellet in Tyrodes- Puffer (pH 6,5) gelöst und anschließend mit Tyrodes-Puffer (pH 7,4) neutralisiert. Die Anzahl der Thrombozyten wird hämatologisch mithilfe des Sysmex Hämatologie-Systems KX-21N bestimmt.

3.2.4 Untersuchungen in der Flusskammer

3.2.4.1 Flusskammer mit Monozyten

Um das Adhäsionsverhalten von Monozyten (und im weiteren Verlauf dieser Arbeit auch Thrombozyten) zu untersuchen, wird ein Flusskammermodell verwendet. Dieses bietet den Vorteil, dass das Adhäsionsverhalten unter Flussbedingungen beobachtet werden kann. Der Versuchsaufbau ist also der *in vivo*-Situation angenähert.

Hierfür werden sterile runde Deckgläser mit 0,2% Gelatine beschichtet und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Deckgläser entweder mit 2% BSA, rekombinantem MAC-1 (5 µg/ml) oder rekombinantem CD147 (10 µg/ml) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Zur Vorbereitung der Ansätze werden die gezählten isolierten Monozytensuspensionen (siehe 3.2.1.1 und 3.2.1.2) initial auf 1×10^6 Zellen/ml verdünnt und in vier Gruppen zwei Stunden bei 37°C wie nachfolgend aufgeführt inkubiert:

1. uninhibierte Monozyten (RPMI 1640 Medium) + LPS (1 µg/ml)
2. Anti-CD147 (20 µg/ml) + LPS (1 µg/ml)
3. Anti-MAC-1 (20 µg/ml) + LPS (1 µg/ml)
4. murines IgG (20 µg/ml) + LPS (1 µg/ml)

Anschließend werden die Ansätze auf 2×10^5 Zellen/ml verdünnt und in Perfusorspritzen gegeben. Diese werden in den Perfusor eingespannt und an das Flusskammermodell mit einem der zuvor beschichteten Deckgläser angeschlossen.

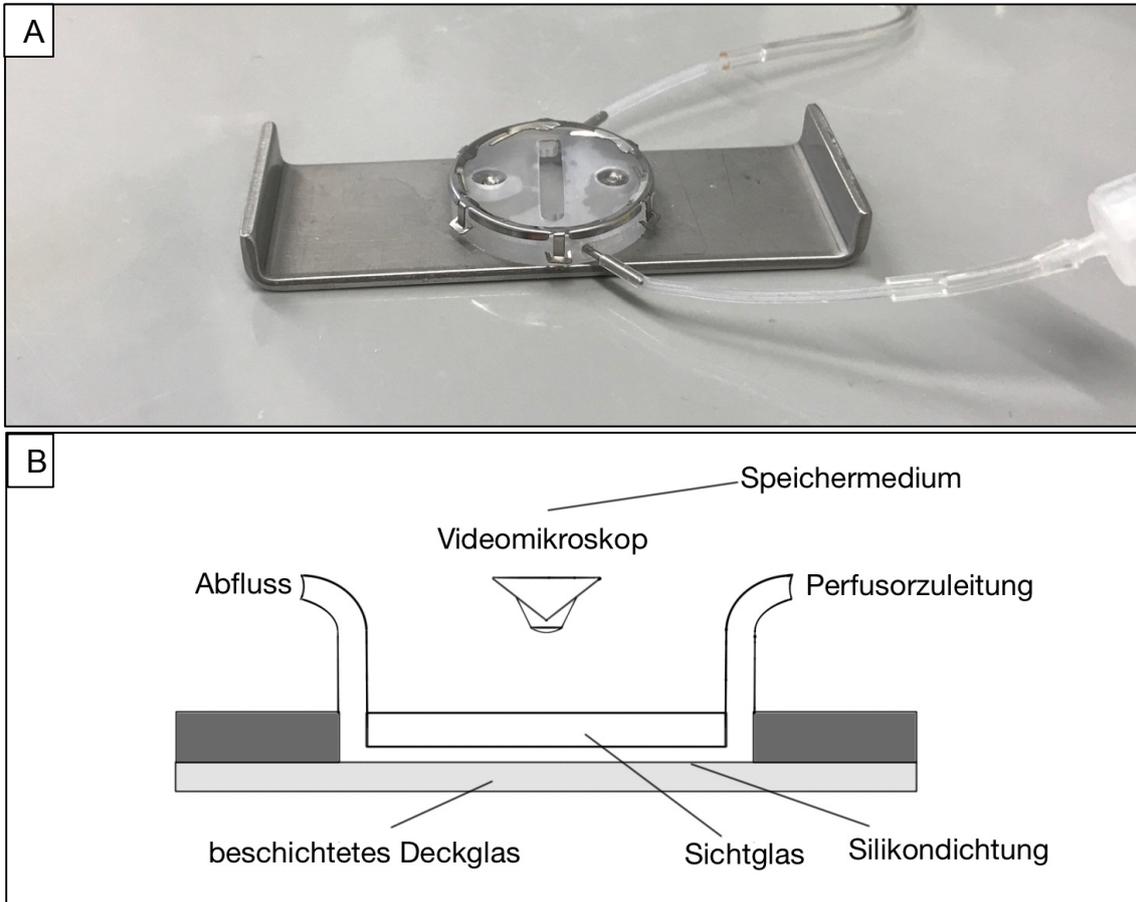


Abbildung 3.1: Aufbau einer Flusskammeruntersuchung: Durch eine Perfusorspritze werden die unterschiedlichen Zellansätze (z.B. Monozyten, Thrombozyten) mit einer konstanten Flussrate an den verschiedenen beschichteten Deckgläsern vorbeigeleitet. Das transparente Sichtglas ermöglicht es, die vorbeifließenden Zellen mit einem Videomikroskop aufzuzeichnen. Dies geschieht bei 20-facher Vergrößerung über einen Zeitraum von je 40 Sekunden an vier verschiedenen Bildausschnitten. **A** Photographie der verwendeten Flusskammer. **B** Schematische Zeichnung des Flusskammermodells.

Nach 10-minütiger Vorlaufzeit werden 4 Aufnahmesequenzen zu je 40 Sekunden bei 20-facher Vergrößerung an unterschiedlichen Stellen durchgeführt. Um

Verfälschungen oder Artefakte im Rahmen der Messung zu vermeiden, wird der Bildausschnitt mit ausreichend Abstand zu den seitlichen Begrenzungen gewählt. Anschließend wird das Deckglas gewechselt und das gesamte System mit Aqua dest. gereinigt. Danach wird mit einem neuen Ansatz fortgefahren.

Es erfolgt im Anschluss eine Auswertung der 40-sekündigen Sequenzen. Hierbei werden die Monozyten, die deutlich verlangsamt rollen oder während der Sequenz adhärent werden, gezählt. Der Mittelwert der Aufnahmen wird für die anschließende Auswertung verwendet.

In der statistischen Auswertung wird anschließend die IgG-Gruppe (im Sinne einer Placebo-Behandlung, um den Effekt der Inhibition zu untersuchen) jeweils mit den verschiedenen durch Antikörper blockierten Gruppen bzw. der uninhibierten Gruppen auf der gleichen Beschichtung verglichen.

3.2.4.2 Flusskammer mit Thrombozyten

Ergänzend zu den vorherigen Analysen wird auch das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten unter Flussbedingungen untersucht. Die Vorbereitung der Flusskammer erfolgt exakt wie die Flusskammer mit Monozyten (siehe 3.2.4.1). Die Deckgläser werden wieder mit BSA bzw. rekombinantem MAC-1 beschichtet. Es werden dann 1×10^8 /ml Thrombozyten in die Perfusorspritzen gefüllt und wie folgt inkubiert:

1. uninhibierte Thrombozyten (Tyrodes Puffer pH 7,4)
2. Anti-MAC1 (20 µg/ml)
3. Anti-CD147 (20 µg/ml)
4. murines IgG (20 µg/ml)

Diese Ansätze werden bei 37°C 30 Minuten inkubiert und dann bei einer Laufrate von 15 ml/h und einer Vorlaufzeit von 10 Minuten durch die Flusskammer laufen gelassen. Anschließend wird an vier verschiedenen Stellen je eine 40-sekündige

Sequenz aufgenommen. Danach erfolgt der Wechsel des Deckglases wie bereits beschrieben (siehe 3.2.4.1)

Die adhärennten und rollenden Thrombozyten werden anschließend gezählt, der Mittelwert der Aufnahmen wird für die anschließende Auswertung verwendet.

In der statistischen Auswertung wird anschließend die IgG-Gruppe (im Sinne einer Placebo-Behandlung, um den Effekt der Inhibition zu untersuchen) jeweils mit den verschiedenen, durch Antikörper blockierten Gruppen bzw. der nicht-inhibierten Gruppen auf der gleichen Beschichtung verglichen.

3.2.5 Statischer Adhäsions-Assay

Weiterführend wird das Adhäsionsverhalten von Monozyten unter statischen Bedingungen untersucht. Verwendet werden Monozyten mit entweder einem absoluten Mangel an MAC-1 (MAC-1^{-/-} Mäuse; C57BL/6) oder einem relativen CD147-Mangel (Basigin^{+/-} Mäuse; C57BL/6, ca. 50% CD147-Expression). Als Oberfläche dient entsprechend eine Beschichtung mit MAC-1 bzw. CD147.

Hierzu wird eine 96er Well-Platte entweder mit 1% BSA oder mit rekombinatem murinen MAC-1 (10 µg/ml) bzw. rekombinatem murinen CD147 (20 µg/ml) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Überstände verworfen und eine Stunde mit 4% BSA bei Raumtemperatur blockiert. Danach werden die Überstände entfernt und vorsichtig mit PBS gewaschen.

Nun werden die in 3.2.1.2 isolierten murinen Monozyten in einer Konzentration von 2×10^4 Zellen/ 50µl in den Wells eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt werden die Überstände verworfen und zweimal mit RPMI 1640 Medium gewaschen.

Anschließend erfolgt die Fotodokumentation bei 20-facher Vergrößerung. Die im Well adhärennt verbliebenen Zellen werden gezählt.

In der anschließenden statistischen Auswertung wird die Anzahl der Zellen der BSA-Beschichtung mit denen der Antikörperbeschichtung innerhalb des gleichen Genotyps verglichen.

3.2.6 Zymogramm

Um eine mögliche Freisetzung von MMPs nach Stimulation durch MAC-1 bzw. CD147 aus Monozyten zu detektieren, wurde eine Zymographie durchgeführt. Es werden 5×10^4 Monozyten/ml in einer 96er Well Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und die Ansätze wie folgt stimuliert:

1. unstimulierte Monozyten in RPMI 1640 Medium
2. LPS (1 µg/ml)
3. rekombinantes MAC-1 (10 µg/ml)
4. rekombinantes CD147 (10 µg/ml)

Danach erfolgt die erneute Inkubation bei 37°C über Nacht. Nun werden die Überstände in Eppendorfbehälter überführt und mit Aqua dest. 1:15 verdünnt. Danach wird der Zymogramm-Sample-Buffer zugegeben und 10 Minuten inkubiert.

Zwischenzeitlich wird die Kammer vorbereitet, hierzu werden die Invitrogen-Zymogramm-Gele eingesetzt und der SDS-Kammerpuffer (1:10 verdünnt) hinzugegeben.

Die erste Tasche wird mit dem SeeBlue Plus 2 Marker befüllt, in die andere Kammer kommen die Ansätze. Dann wird der Gellauf bei 60 Volt gestartet.

Nach Durchlaufen der Banden wird das Gel herausgelöst und mit Aqua dest. gewaschen. Danach wird es in den Renaturing Buffer für 30 Minuten gegeben und dann erneut gewaschen. Anschließend wird Developing Buffer hinzugegeben und bei 37°C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird erneut gewaschen und die Banden mit Coomassie Blue angefärbt. Nach der Anfärbung wird das Coomassie Blue verworfen und das überschüssige Coomassie Blue durch Waschen entfernt. Danach wird das Gel mit der Gel-Drying Lösung für fünf Minuten inkubiert.

Zuletzt wird das Gel in Cellophan fixiert und eingescannt, anschließend werden die Banden nach ihrer optischen Dichte ausgewertet. Verglichen werden die verschiedenen stimulierten Ansätze jeweils mit der unstimulierten Kontrolle.

3.2.7 MAC-1/ CD147/ BSA-Bindungs-ELISA

Um eine mögliche Bindung zwischen MAC-1 und CD147 aufzuzeigen, wird ein ELISA durchgeführt. Kommt eine Bindung zustande, so kann diese nachgewiesen werden, indem ein Primärantikörper an die entsprechende Zielstruktur bindet. Über einen an wiederum diesen bindenden Sekundärantikörper kann eine enzymatische Farbreaktion hervorgerufen werden.

Dafür wird eine sterile 96er Well Platte mit rekombinatem MAC-1, CD147 (beide 10 µg/ml) oder 4% BSA beschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend werden die Wells mit TBST zweimal gewaschen und mit 4% BSA bei Raumtemperatur eine Stunde lang blockiert. Danach werden die Überstände verworfen und rekombinantes humanes MAC-1 bzw. rekombinantes humanes CD147 in aufsteigenden Konzentrationen (bei beiden je 0, 5, 10 und 20 µg/ml) in den verschiedenen Wells hinzugefügt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Wells mit TBST gewaschen und die Primärantikörper hinzugegeben: anti-CD147 (1 µg/ml) bzw. anti-MAC-1 (1 µg/ml) und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte ein erneutes Waschen mit TBST. Nun wird der biotinylierte Sekundärantikörper (Kaninchen gegen Maus) in einer Verdünnung von 1:1000 (Stammkonzentration 0,53 g/l) hinzugegeben, im Anschluss wird eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Platten mit TBST gewaschen und *Horseradish Peroxidase*- (HRP-) konjugiertes Streptavidin hinzugegeben, da dieses an Biotin bindet und für die spätere ELISA-Messung die nötige Enzymaktivität liefert. Die Inkubationszeit beträgt eine Stunde bei Raumtemperatur, anschließend wird wieder mit TBST gewaschen.

Nun wird das Detektionsreagenz 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben und nach 90 Sekunden bzw. dem Einsetzen einer Blaufärbung mit 1M H₂SO₄ gestoppt.

Im Anschluss wird die Well-Platte im ELISA-Lesegerät bei 450 nm und einem Referenzwert von 570 nm ausgewertet.

Die Absorption der verschiedenen Ansätze wird einzeln gemessen. Anschließend wird die Absorption der jeweiligen Antikörperbeschichtung mit der zugehörigen BSA-Kontrolle verglichen.

3.2.8 Fluoreszenzfärbung humaner Monozyten

Mittels Fluoreszenzfärbung lassen sich auf der Zellmembran befindliche Proteine darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode genutzt, um eine mögliche räumliche Nähe zwischen MAC-1 und CD147 auf der Oberfläche von Monozyten aufzuzeigen.

Hierfür werden Monozyten wie in 3.2.1 beschrieben isoliert. Abgelöst aus der Kulturflasche werden die Zellen hier jedoch mit Accutase. Die Monozyten werden auf mit Poly-L-Lysine beschichteten Deckgläsern bei 37°C über Nacht inkubiert. Danach wird der Überstand abpipettiert, die Deckgläser werden mit 2% Formalin 15 min fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Nun werden die Deckgläser mit 1% BSA eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend werden die ersten Primärantikörper gegen MAC-1 (Maus gegen MAC-1) bzw. IgG (Maus IgG) hinzugegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die ungebundenen Antikörper werden mit PBS abgewaschen und der erste Sekundärantikörper (Ziege gegen Maus) hinzugegeben. Danach erneutes Waschen mit PBS und blockieren mit 1% BSA. Nun Zugabe des zweiten Primärantikörpers gegen CD147 (Maus gegen CD147) bzw. IgG (Maus IgG) und Inkubieren bei 4°C über Nacht. Danach erfolgt ein erneutes Waschen mit PBS und die Zugabe des zweiten Sekundärantikörpers (Kaninchen gegen Maus). Anschließend wird erneut mit PBS gewaschen und abschließend werden die Deckgläser mit DAKO Fluorescent Mounting Medium fixiert.

Die Aufnahme wurde an einem LSM5 Exciter Confocal Laser Scanning Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung durchgeführt, anschließend erfolgte eine qualitative Beurteilung der Überlagerung.

3.3. Genehmigung der Tierversuche

Alle Tierversuche wurden nach dem dt. Tierschutzgesetz und Genehmigung durch das Regierungspräsidium Tübingen §8a Anzeige vom 06.05.2014 (AZ 35./9185.82-2) durchgeführt.

3.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 8. Zur Bestimmung der Signifikanz diente ein unabhängiger t-Test, bei mehr als zwei Gruppen wurde eine Dunnett's One-Way ANOVA durchgeführt. Ein p-Wert von unter 0,05 wurde als signifikant erachtet.

Alle angegebenen Werte zeigen Mittelwert + Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

4. Ergebnisse

4.1. Nachweis einer Bindung zwischen MAC-1 und CD147

In diesem Bindungs-ELISA wurde das Bindungsverhalten zwischen MAC-1 und CD147 *in vitro* untersucht. Als Zielstruktur des Primärantikörpers diente das an die entsprechende Oberflächenbeschichtung gebundene MAC-1 bzw. CD147. Über einen biotinylierten Sekundärantikörper und nachfolgender enzymatischer Reaktion konnte eine quantitative Aussage über die Menge an gebundenem

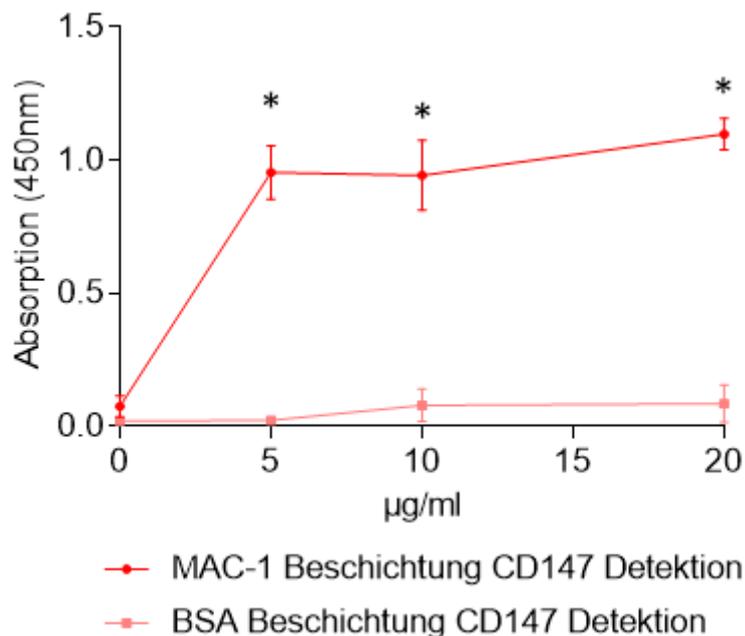


Abbildung 4.1: MAC-1/BSA-CD147-Bindungs-ELISA: In dem Bindungs-ELISA mit MAC-1 Beschichtung (n=6, entsprechend der Anzahl der Versuche pro Bedingung) konnte ein signifikantes Bindungsverhalten zwischen MAC-1 und CD147 aufgezeigt werden. Erwartungsgemäß bestand bei einer BSA-Beschichtung keine relevante Bindung zwischen MAC-1 und BSA. Die MAC-1-CD147 Interaktion zeigte sich bereits ab einer CD147-Konzentration von 5 µg/ml gesättigt.

(* zeigt einen signifikanten Unterschied, hier $p < 0,05$ verglichen mit der jeweiligen BSA Kontrolle)

modifiziert nach Heinzmann, Nöthel et al., 2020 (55)

MAC-1/ CD147 getroffen werden.

Wie in Abbildung 4.1 zu sehen, kommt es bei dem MAC-1-CD147-Bindungs-ELISA zu einem signifikanten Anstieg der Bindung zwischen MAC-1 und CD147 auf der MAC-1 beschichteten Oberfläche. Eine Bindung zwischen MAC-1 und CD147 konnte bereits ab einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ CD147 gezeigt werden. Auch ist zu sehen, dass bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ bereits eine Sättigung erreicht ist und es zu keinem weiteren Anstieg der Absorption und

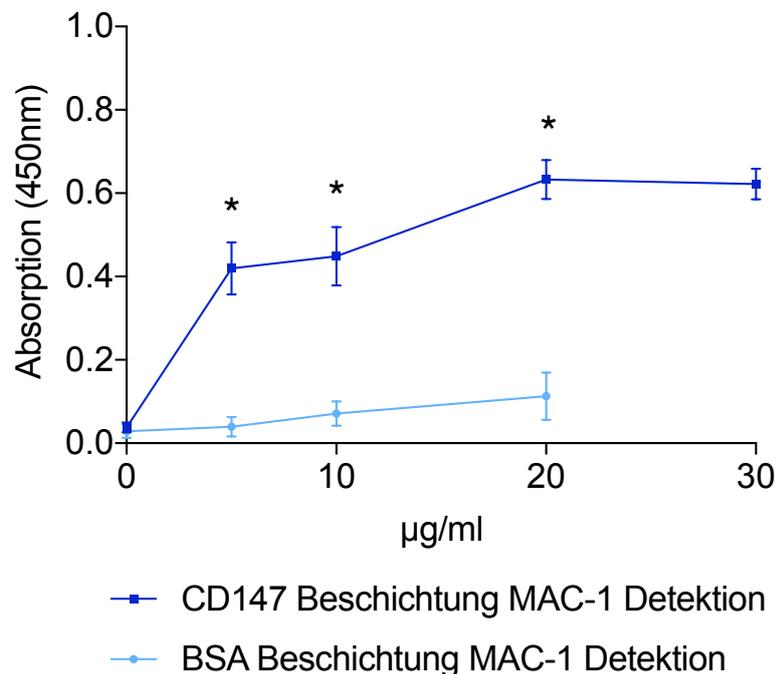


Abbildung 4.2: CD147/BSA-MAC-1-Bindungs-ELISA. In dem Bindungs-ELISA mit CD147 Beschichtung ($n \geq 6$, entsprechend der Anzahl der Versuche pro Bedingung) konnte ein signifikant erhöhtes Bindungsverhalten zwischen MAC-1 und CD147 nachgewiesen werden. Dagegen konnte keine Bindung zwischen MAC-1 und der BSA Beschichtung gezeigt werden. Der größte Anstieg der MAC-1-CD147 Interaktion zeigte sich schon bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ erreicht.

(* zeigt einen signifikanten Unterschied, hier $p < 0,05$ verglichen mit der jeweiligen BSA Kontrolle)

damit der Bindung bei höheren CD147-Konzentrationen kommt. Im Gegensatz dazu konnte keine Bindung von CD147 an BSA detektiert werden, unabhängig von der CD147-Konzentration.

Wie in der Abbildung 4.2 zu sehen, kommt es auch in entgegengesetzter Richtung zu einer Bindung von CD147 und MAC-1.

Hier konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es bereits ab einer Konzentration von 5 µg/ml MAC-1 zu einer signifikanten Bindung an eine CD147 beschichtete Oberfläche kommt. Wie auch schon in der reziproken Versuchskonstellation kam es bis 5 µg/ml zu dem größten Anstieg der Bindungskurve. Auch hier zeigte sich keine Interaktion zwischen der MAC-1 und BSA in der Bindung.

4.2 Kolokalisation von MAC-1 und CD147 auf der Zellmembran der Monozyten

Nachdem *in vitro* gezeigt werden konnte, dass es zwischen MAC-1 und CD147 eine Bindung gibt, wurde als nächstes die Bindung *ex vivo* mit humanen Monozyten bestätigt.

Dafür wurde auf der Oberfläche der humanen Monozyten MAC-1 (Abbildung 4.3) und CD147 (Abbildung 4.4) angefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie dargestellt. Dabei konnte, wie in Abbildung 4.5 zu sehen, gezeigt werden, dass es zu einer Kolokalisation zwischen MAC-1 und CD147 kommt.

In der Isotyp Kontrolle (Abbildung 4.6 A-C) konnte wie erwartet kein Signal detektiert werden.

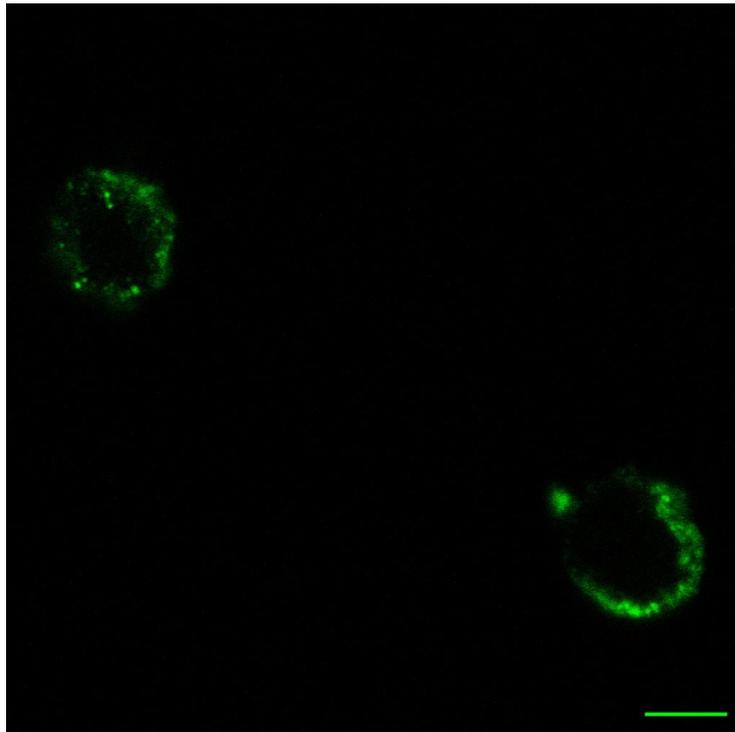


Abbildung 4.3: Lokalisation von MAC-1 auf der Zellmembran von Monozyten: Die repräsentative Abbildung (n=6, entspricht der Anzahl der angefertigten Aufnahmen verschiedener Zellen) wurde mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen und zeigt die Lokalisation von MAC-1 (in grün) auf der Zellmembran von Monozyten. Der Maßstabbalken entspricht 5 μm .

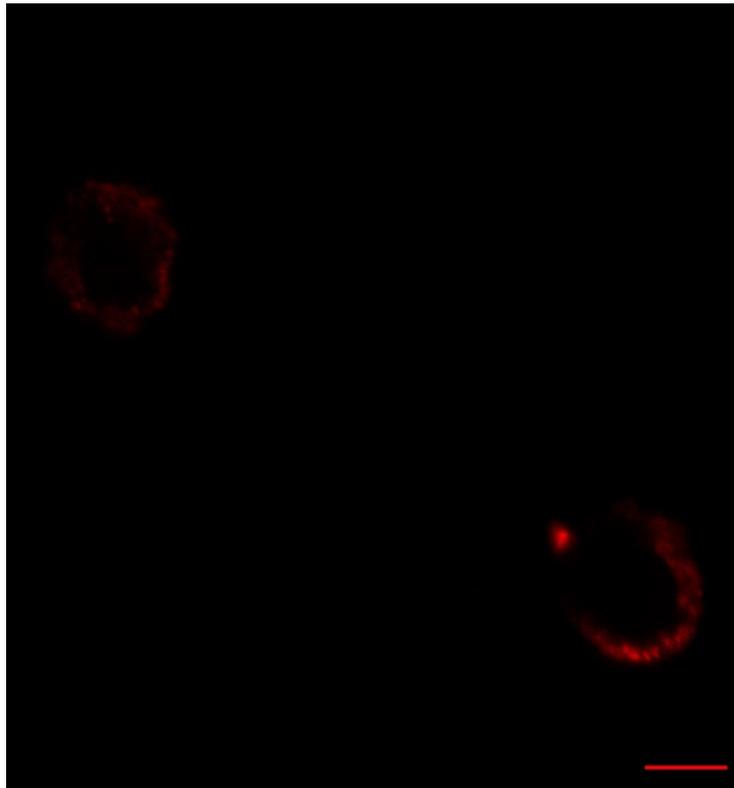


Abbildung 4.4: Lokalisation von CD147 auf der Zellmembran von Monozyten: Die repräsentative Abbildung (n=6, entsprechend der Anzahl der angefertigten Aufnahmen verschiedener Zellen) wurde mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen und zeigt die Expression von CD147 (in rot) auf der Oberfläche von Monozyten. Der Maßstab balken entspricht 5 μm .

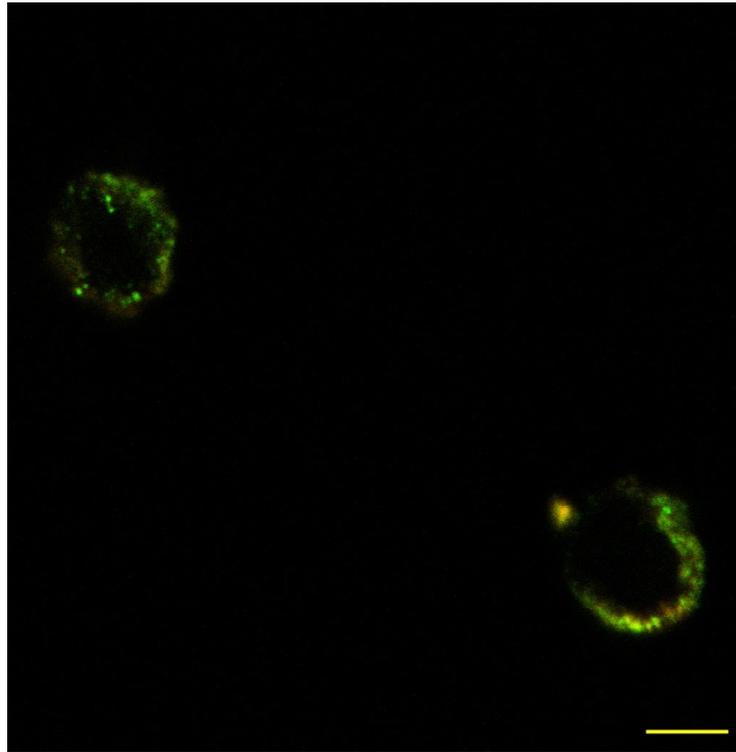


Abbildung 4.5: Kolokalisation von MAC-1 und CD147 auf der Zellmembran von Monozyten: Die repräsentative Abbildung (n=6, entsprechend der Anzahl der angefertigten Aufnahmen verschiedener Zellen) zeigt, dass es zu einer Kolokalisation von MAC-1 (grün) und CD147 (rot) auf der Oberfläche von Monozyten kommt. Der Maßstabbalken beträgt 5 μm .

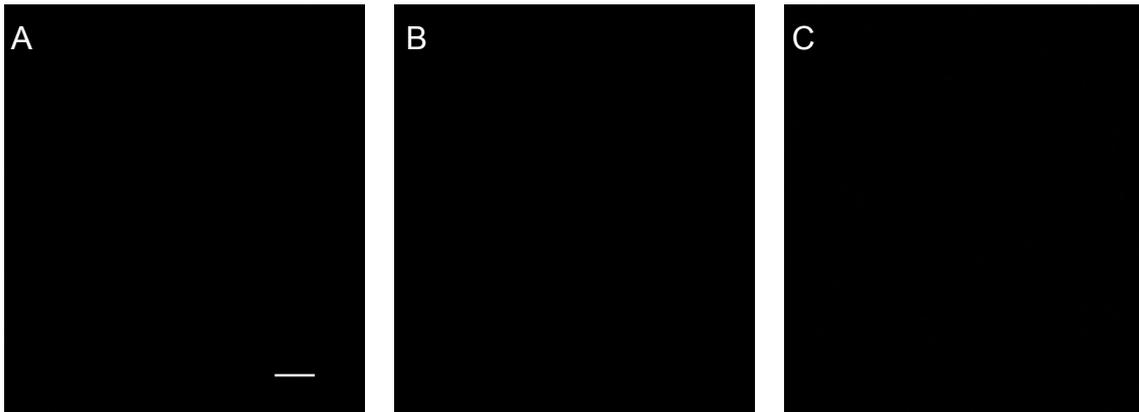


Abbildung 4.6: IgG Kontrollgruppe. Zur Überprüfung der Spezifität der Antikörper wurden IgG Kontrollen durchgeführt, wie in den repräsentativen Abbildungen A-C (n=2, entsprechend der Anzahl der angefertigten Aufnahmen verschiedener Zellen) zu sehen. A - Overlay; B - IgG CD147 (Spezie IgG); C - IgG MAC-1 (Spezie IgG). Es konnte keine relevante Emission detektiert werden. Der Maßstabbalken gilt für die Abbildungen A-C und beträgt 10 µm.

4.3. Adhärenzverhalten humaner Monozyten unter Flussbedingungen nach Inhibition von MAC-1 oder CD147

4.3.1 MAC-1 beschichtete Oberfläche

Das Adhäsionsverhalten von Monozyten unter Flussbedingungen wurde daraufhin untersucht, wie es sich unter blockiertem MAC-1 oder CD147 auf einer mit rekombinanten MAC-1 beschichteten Oberfläche verhält. Um aufzuzeigen, dass eine MAC-1 Beschichtung zu einer gesteigerten Adhärenz führt, wurde zudem in einer Gruppe lediglich eine BSA-Beschichtung gewählt. Alle Ansätze wurden mit LPS stimuliert um eine proinflammatorische Aktivierung zu erreichen. Die ausschließlich mit LPS stimulierte Gruppe zeigt somit eine maximale Aktivität der Monozyten an („Positivkontrolle“). Eine mit zusätzlich IgG inhibierte Gruppe dient zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung als mögliche Ursache

(„Negativkontrolle“) und wird als Vergleichsgröße für die statistische Auswertung herangezogen.

Beobachtet wurden (wie in 3.2.4.1 beschrieben) sowohl die „rollenden“ als auch die „adhärenten“ Monozyten.

Bei Betrachtung der rollenden Monozyten (vgl. Abbildung 4.7) zeigte sich nach Inhibition von MAC-1, dass signifikant weniger Monozyten ein stark verlangsamtes Flussverhalten aufwiesen als in der IgG Kontrollgruppe (IgG $34,2 \pm 3,7$ vs. MAC-1 $10,4 \pm 1,0$). Eine signifikante Reduktion konnte auch nach CD147-Inhibition nachgewiesen werden ($10,8 \pm 1,0$). Zwischen der nicht inhibierten Positivkontrolle ($33,6 \pm 4,6$) und dem mit IgG inkubierten Ansatz zeigte kein signifikanter Unterschied.

Nachdem eine deutliche Reduktion der Adhärenz der rollenden Monozyten aufgezeigt werden konnte, erfolgte wie in Abbildung 4.8 zu sehen, die Auswertung der im Aufnahmezeitraum adhärent gewordenen Monozyten. Auch hier konnte eine signifikante Reduktion sowohl nach Inhibition von MAC-1 als auch nach erfolgter Inhibition von CD147 festgestellt werden, verglichen mit der IgG-Kontrolle (IgG $0,8 \pm 0,9$ vs. MAC-1 $0,3 \pm 0,1$ bzw. CD147 $0,1 \pm 0,5$). In der nicht inhibierten Gruppe ($1,0 \pm 0,3$) konnte kein signifikanter Unterschied zu der IgG-Kontrolle gezeigt werden.

Durch die Inhibition des monozytären MAC-1 bzw. CD147 wird somit die Adhäsionsfähigkeit von Monozyten an die MAC-1 beschichtete Oberfläche effektiv reduziert.

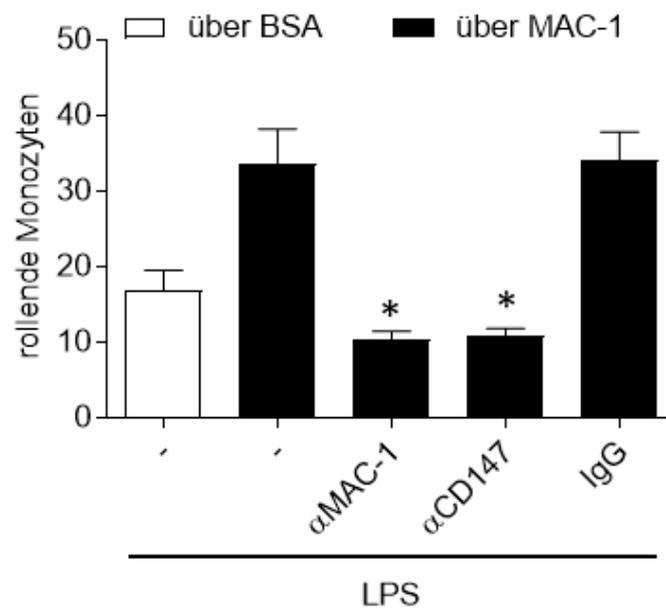


Abbildung 4.7: Inhibition von MAC-1 oder CD147 auf LPS-stimulierten Monozyten reduziert das Adhärenzverhalten. Die Abbildung zeigt die Anzahl der gezählten Monozyten, welche im Beobachtungszeitraum ein deutlich verlangsamtes Flussverhalten („rollend“) aufgewiesen haben. Der weiße Balken repräsentiert die Anzahl der Zellen, die auf einer BSA-Beschichtung einen rollenden Zustand aufwiesen. Die schwarzen Balken repräsentieren die Anzahl der Zellen, die auf einer MAC-1-beschichteten Oberfläche einen rollenden Zustand aufwiesen. Alle Zellen wurde im Vorfeld mit LPS stimuliert.

In den beiden Versuchsgruppen ($n \geq 7$, entsprechend der Anzahl unabhängiger Versuchen mit verschiedenen Spendern) mit entweder Inhibition von MAC-1 oder CD147 zeigte sich eine signifikante Reduktion der rollenden Monozyten verglichen mit der IgG-Kontrollgruppe ($n \geq 7$) auf einer MAC-1-beschichteten Oberfläche. Ein signifikanter Unterschied zwischen den ausschließlich mit LPS stimulierten Zellen auf einer MAC-1-beschichteten Oberfläche und der IgG-Kontrollgruppe bestand nicht.

(* zeigt einen signifikanten Unterschied, hier $p < 0,0001$ verglichen mit der IgG-Kontrollgruppe)

modifiziert nach Heinzmann, Nöthel et al., 2020 (55)

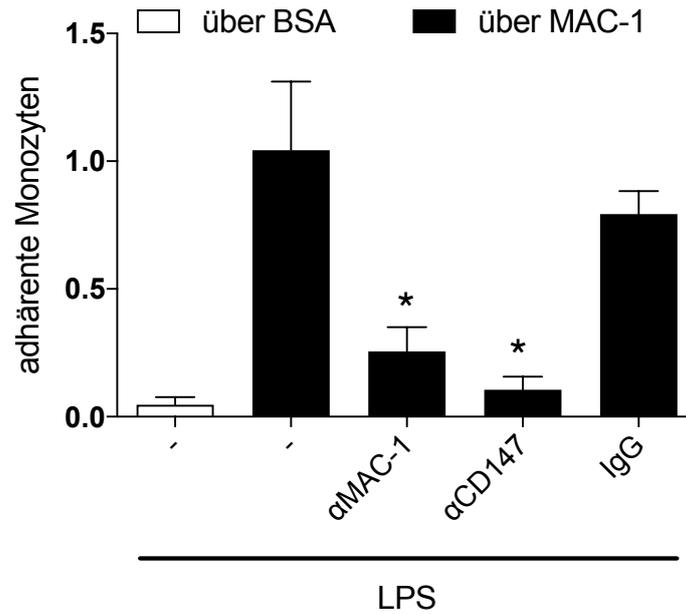


Abbildung 4.8: Inhibition von MAC-1 oder CD147 auf LPS-stimulierten Monozyten reduziert die Anzahl adhärenter Monozyten. Die Abbildung zeigt die Anzahl der gezählten Monozyten, welche im Beobachtungszeitraum adhären wurden. Der weiße Balken repräsentiert die Zellen, die auf einer BSA-Beschichtung adhären wurden. Die schwarzen Balken repräsentieren die Anzahl der Zellen, die auf einer mit rekombinantem MAC-1-beschichteten Oberfläche adhären wurden. Alle Zellen wurde im Vorfeld mit LPS stimuliert.

Die absolute Anzahl bindender Zellen war in allen Ansätzen sehr niedrig, trotzdem konnten Unterschiede in der Häufigkeit beobachtet werden. Bei einer BSA-Beschichtung wurden nahezu keine Zellen adhären, dies trat nur vermehrt bei MAC-1-Beschichtungen auf.

In beiden Versuchsgruppen (beide $n \geq 7$, entsprechend der Anzahl unabhängiger Versuche mit verschiedenen Spendern) mit entweder Inhibition von MAC-1 oder CD147 zeigte sich eine signifikante Reduktion der adhärenter Monozyten verglichen mit der IgG-Kontrollgruppe ($n \geq 7$). Ein signifikanter Unterschied zwischen den ausschließlich LPS-stimulierten Monozyten auf einer MAC-1-beschichteten Oberfläche ($n \geq 7$) und der IgG Gruppe bestand nicht.

(* zeigt einen signifikanten Unterschied, hier $p < 0,05$ verglichen mit der IgG-Kontrollgruppe)

modifiziert nach Heinzmann, Nöthel et al., 2020 (55)

4.3.2 CD147 beschichtete Oberfläche

Als Nächstes wurde die dynamische Bindung zwischen MAC-1 und CD147 auf einer CD147-beschichteten Oberfläche untersucht.

Auch hier wurden alle Zellreihen mit LPS stimuliert, um eine Aktivierung der Monozyten sicherzustellen.

Um den Einfluss der CD147-Beschichtung aufzuzeigen, wurde einer der Ansätze über eine BSA-Beschichtung geführt. Im Weiteren erfolgte in den Versuchsgruppen die Inhibition von entweder MAC-1 oder CD147 auf den Monozyten mittels spezifischer Antikörper. Eine Negativkontrolle erfolgte mittels Inhibition durch IgG, die Positivkontrolle erfolgte mittels alleiniger LPS Stimulation. Es erfolgte erneut die Unterteilung in rollende und adhärenente Monozyten

Wie in Abbildung 4.9 zu sehen zeigte sich, dass LPS stimulierte Monozyten vermehrt über eine CD147 Beschichtung rollen im Vergleich zu einer BSA Beschichtung.

Durch eine Inhibierung des Rezeptors CD147 wird die Interaktion der Monozyten mit dem rekombinanten CD147 signifikant reduziert im Vergleich zur IgG Kontrolle (IgG $35,2 \pm 3,3$ vs. CD147 $19,5 \pm 2,0$).

Auch die Inhibition von MAC-1 führte zu einer signifikant niedrigeren Anzahl rollender Monozyten (MAC-1 $22,1 \pm 2,8$). Wie erwartet konnte zwischen der IgG-Kontrolle und der nicht inhibierten Kontrolle ($36,3 \pm 3,2$) kein signifikanter Unterschied gemessen werden.

Neben den rollenden Monozyten wurde auch die Adhärenz von Monozyten auf rekombinantem CD147 untersucht, wie in Abbildung 4.10 zu sehen.

Dabei kommt es zu einer vermehrten Adhärenz der Zellen auf rekombinantem CD147 verglichen mit der BSA-Beschichtung.

Nach Inhibition von CD147 kam es zu einer signifikanten Reduktion der adhärenenten Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit IgG (IgG $2,7 \pm 0,5$ vs. CD147 $1,1 \pm 0,3$).

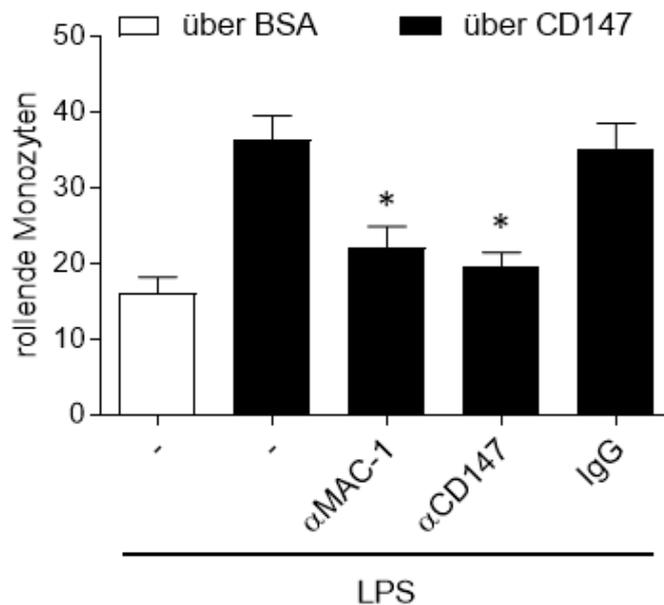


Abbildung 4.9: Inhibition von MAC-1 oder CD147 auf LPS-stimulierten Monozyten reduziert das Adhärenzverhalten. Die Abbildung zeigt die Anzahl der gezählten Monozyten, welche im Beobachtungszeitraum ein deutlich verlangsamtes Flussverhalten („rollend“) aufgewiesen haben. Der weiße Balken repräsentiert die Anzahl der Zellen, die auf einer BSA-Beschichtung einen rollenden Zustand aufwiesen. Die schwarzen Balken repräsentieren die Anzahl der Zellen, die auf einer mit rekombinatem CD147-beschichteten Oberfläche einen rollenden Zustand aufwiesen. Alle Zellen wurde im Vorfeld mit LPS stimuliert.

In den beiden Versuchsgruppen ($n \geq 13$, entsprechend der Anzahl unabhängiger Versuche mit verschiedenen Spendern) mit entweder Inhibition von MAC-1 oder CD147 zeigte sich eine signifikante Reduktion der rollenden Monozyten verglichen mit der IgG-Kontrollgruppe ($n \geq 13$) auf einer CD147-beschichteten Oberfläche. Ein signifikanter Unterschied zwischen den ausschließlich mit LPS stimulierten Zellen auf einer CD147-beschichteten Oberfläche ($n \geq 13$) und der IgG-Kontrollgruppe bestand nicht.

(* zeigt einen signifikanten Unterschied, hier $p < 0,05$ verglichen mit der IgG-Kontrollgruppe)

modifiziert nach Heinzmann, Nöthel et al., 2020 (55)

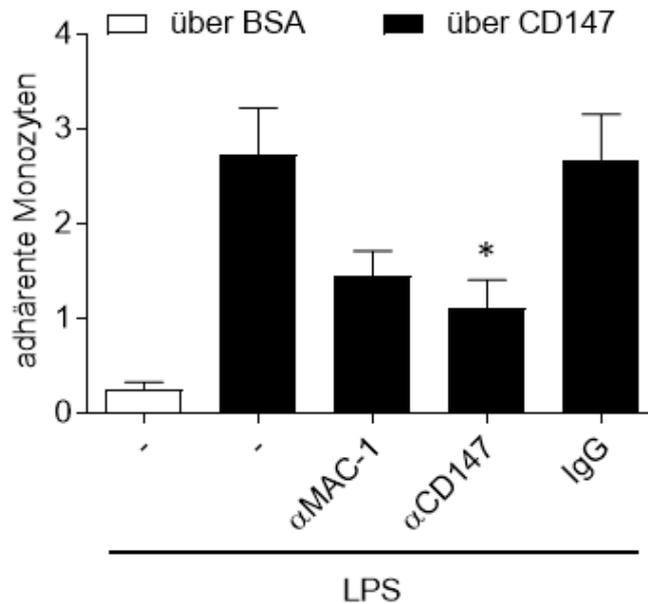


Abbildung 4.10: Inhibition von MAC-1 oder CD147 reduziert die Anzahl adhärenter Monozyten. Die Abbildung zeigt die Anzahl der gezählten Monozyten, welche im Beobachtungszeitraum adhären wurden. Der weiße Balken repräsentiert die Zellen, die auf einer BSA-Beschichtung adhären wurden. Die schwarzen Balken repräsentieren die Anzahl der Zellen, die auf einer MAC-1-beschichteten Oberfläche adhären wurden. Alle Zellen wurde im Vorfeld mit LPS stimuliert.

Es zeigte sich eine signifikant niedrigere Zellzahl nach Inhibition von CD147 im Vergleich IgG-Kontrollgruppe (beide $n \geq 13$, entsprechend der Anzahl unabhängiger Versuche mit verschiedenen Spendern). Nach MAC-1-Inhibition ($n \geq 13$) zeigte sich ebenfalls eine deutliche Reduktion, jedoch wurde hier keine statistische Signifikanz erreicht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den ausschließlich mit LPS stimulierten Zellen auf einer CD147-beschichteten Oberfläche und der IgG-Kontrollgruppe bestand nicht.

(* zeigt einen signifikanten Unterschied, hier $p < 0,05$ verglichen mit der IgG-Kontrollgruppe)

modifiziert nach Heinzmann, Nöthel et al., 2020 (55)

Nach Inhibition von MAC-1 zeigte sich ebenfalls eine deutliche Reduktion der adhärennten Zellen ($1,5 \pm 0,3$), diese ist allerdings nicht statistisch signifikant. Zwischen der ausschließlich mit LPS stimulierten Positivkontrolle ($2,7 \pm 0,5$) und der IgG-Fraktion gab es keinen signifikanten Unterschied.

Somit reduziert die Inhibition von MAC-1 bzw. CD147 nachweislich die Adhäsionsfähigkeit von Monozyten an eine CD147-exprimierende Oberfläche.

4.4. Verminderte Adhärenz muriner Monozyten im statischen Modell bei fehlender MAC-1 Expression

Nachfolgend (siehe Abbildung 4.11) wurde das Adhäsionsverhalten von Monozyten an CD147 unter statischen Bedingungen weiter untersucht. Hierfür wurden Monozyten aus dem Knochenmark von Knock-Out Mäusen mit einer MAC-1 Defizienz isoliert (vgl. 3.2.1.2) und mit denen einer Wildtyp-Kontrollgruppe verglichen. Dies erfolgte nach vorheriger Inkubation auf einer entweder mit BSA oder CD147 beschichteten Oberfläche. Gezählt wurden die Monozyten, die nach den in 3.6 beschriebenen Reinigungsschritten im Well verblieben.

Bei Betrachtung der Wildtyp-Gruppe ohne MAC-1 Defizienz zeigte in den mit BSA beschichteten Wells eine signifikant geringere Anzahl adhärenter Zellen als in denen, wo eine Beschichtung mit CD147 erfolgte (BSA $24,9 \pm 4,9$ vs. CD147 $42,6 \pm 4,9$). Somit führt das Vorhandensein von CD147 auf der Oberfläche zu einer gesteigerten Adhärenz. Im Vergleich hierzu konnte man in der Versuchsgruppe mit bestehender MAC-1 Defizienz keinen signifikanten Unterschied zwischen der Beschichtung mit BSA oder CD147 feststellen (BSA $18,5 \pm 1,3$ vs. CD147 $19,5 \pm 1,9$).

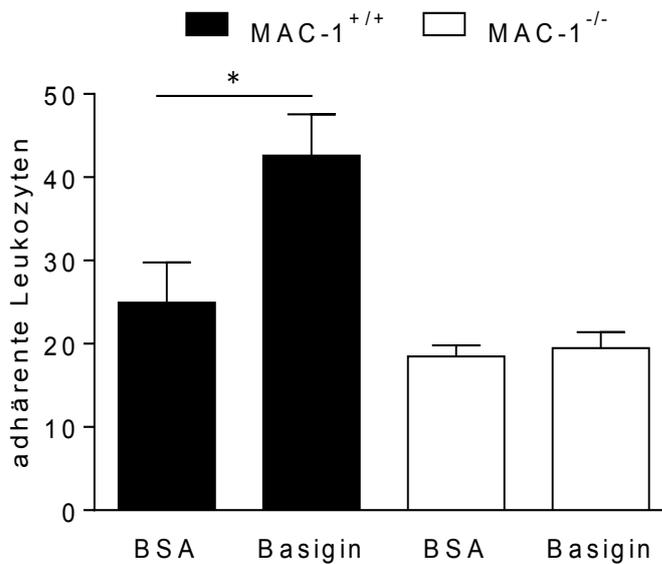


Abbildung 4.11: Fehlende Expression von MAC-1 führt zu einer geringeren Adhärenz von murinen Monozyten. Die Abbildung zeigt die Anzahl der adhärenen Monozyten an einer mit CD147 (Basigin) bzw. BSA beschichtete Oberfläche. Die weißen Balken beschreiben hierbei die Knock-Out Mäuse, die schwarzen Balken die Wildtypen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Monozyten von MAC-1 Knock-Out Mäusen auf einer mit CD147 beschichteten Oberfläche im statischen Modell nicht signifikant häufiger adhären werden als auf einer mit BSA beschichteten Oberfläche (n=5, entsprechend der Anzahl der Versuche mit verschiedenen Versuchstieren). Im Vergleich hierzu bestand in der Wildtyp-Population ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (n=5). Bei Vorhandensein von MAC-1 auf der Zellmembran der Monozyten liegt somit eine gesteigerte Adhärenz an die CD147 beschichtete Oberflächen vor bzw. führt ein Mangel zur Abnahme der Adhäsionsfähigkeit.

(* zeigt einen signifikanten Unterschied, hier $p < 0,005$ verglichen mit der BSA-Gruppe des gleichen Genotyps)

modifiziert nach Heinzmann, Nöthel et al., 2020 (55)

4.5. Reduzierte Adhärenz muriner Monozyten unter statischen Bedingungen bei verminderter CD147-Expression

Um die in 4.4 festgestellten Unterschiede in der Adhäsion von Monozyten bei MAC-1 Defizienz auch im Hinblick auf die Expression von CD147 zu untersuchen, wurde der gleiche Versuchsaufbau auch mit CD147-defizienten Monozyten durchgeführt. Entscheidender Unterschied ist hierbei jedoch, dass die Population der Mäuse ein heterozygoten Expressionmuster für CD147 besaß. Somit bestand lediglich ein relativer CD147-Mangel (ca. 50%-ige Reduktion von CD147).

Die verwendeten Wells waren entweder mit BSA oder MAC-1 beschichtet, nach Auswaschen der nicht-adhärenen Zellen wurden die verbliebenen Monozyten gezählt.

Wie in der Abbildung 4.12 dargestellt, zeigte sich in der Kontrollgruppe der Wildtyp-Population eine signifikant gesteigerte Anzahl adhärenen Monozyten zugunsten der MAC-1 Beschichtung (BSA $11,1 \pm 2,0$ vs. MAC-1 $27,8 \pm 7,8$). In der Versuchsgruppe mit relativem Mangel von CD147 bestand hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen der BSA- und der MAC-1-Beschichtung (BSA $20,9 \pm 6,3$ vs. MAC-1 $27,9 \pm 6,0$). Somit führt die reduzierte Expression von CD147 auf der Zellmembran muriner Monozyten zu keiner vermehrten Adhäsion bei MAC-1 Beschichtung.

Nebenbefundlich zeigte sich in der Versuchsgruppe der heterozygoten Mäuse ein erhöhtes Bindungsniveau bei BSA, welches a.e. durch ein verstärktes unspezifisches Bindungsverhalten zu erklären ist.

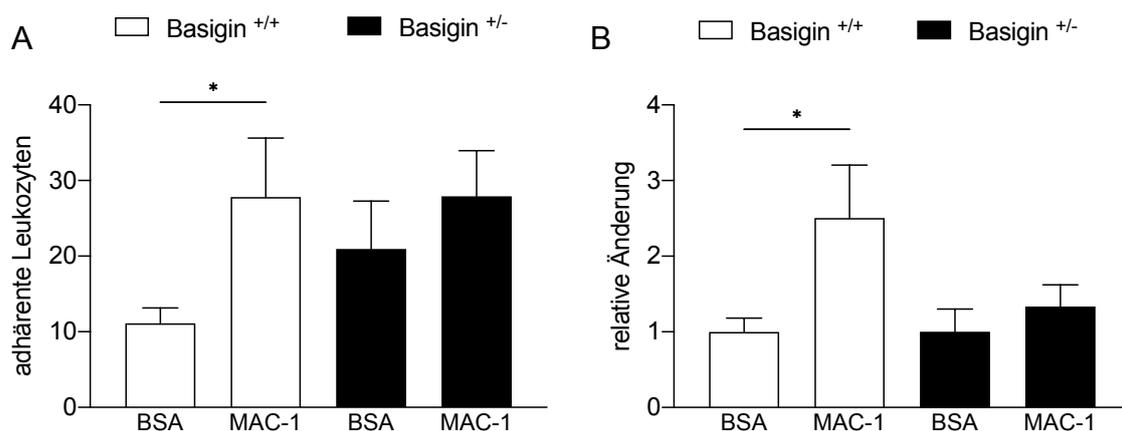


Abbildung 4.12: Verminderte Expression von CD147 führt zu einer geringeren Adhärenz von murinen Monozyten. Beide Abbildungen basieren auf den gleichen Daten. Die weißen Balken beschreiben in beiden Abbildungen die heterozygoten Knock-Out Mäuse, die schwarzen Balken die Wildtypen.

Abbildung **A** zeigt die absolute Anzahl muriner Monozyten, welche eine feste Bindung mit einer BSA- bzw. MAC-1 beschichteten Oberfläche eingehen. Es wird eine heterozygote Population (n=12, entsprechend der Anzahl der eingeschlossenen Versuchstiere) mit relativem CD147-Mangel und eine Wildtyp-Population (n=12) unterschieden. Hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg in der Anzahl adhärenter Leukozyten der Wildtyp-Population bei MAC-1 Beschichtung. In der heterozygoten Population kam es zu einer vermehrten Adhäsion bei beiden Beschichtungen, ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Beschichtungen konnte nicht beobachtet werden.

In Abbildung **B** ist die relative Änderung dargestellt, die Werte wurden auf die jeweilige BSA-Kontrollgruppe normiert. Die murinen Monozyten der Wildtyp-Population werden auf einer mit MAC-1 beschichteten Oberfläche signifikant häufiger adhären als auf einer mit BSA beschichteten Oberfläche. Dieser Effekt konnte in der Versuchsgruppe der heterozygoten Mauspopulation nicht beobachtet werden.

(* zeigt einen signifikanten Unterschied, hier $p < 0,05$).

modifiziert nach Heinzmann, Nöthel et al., 2020 (55)

4.6. Geringere CD147-Expression muriner Monozyten bewirkt keine signifikante Änderung der Adhäsionsfähigkeit unter Flussbedingungen

Nachfolgend wurde das Adhäsionsverhalten muriner Monozyten in Hinblick auf das Bindungsverhalten zwischen CD147 und MAC-1 unter Flussbedingungen untersucht. Hierzu wurden murine Monozyten aus einer heterozygoten Population mit relativem CD147-Mangel ($BSG^{+/-}$, dieselbe Population wie auch in 4.5) verwendet. Als Vergleichsgruppe diente wieder eine Wildtyp-Population ($BSG^{+/+}$). Der weitere Versuchsaufbau erfolgte mittels Flusskammermodell (wie in 3.2.4.1 beschrieben), die Deckgläser wurden entweder mit BSA oder rekombinantem MAC-1 beschichtet. Es erfolgte eine getrennte Auswertung der adhären und rollenden Monozyten.

Die Abbildung 4.13 zeigt die Anzahl der im Zeitfenster der Aufnahme adhären gewordenen Monozyten. Eine Beschichtung der Oberfläche mit MAC-1 resultierte erwartungsgemäß in einer höheren Adhäsionshäufigkeit.

Bei Betrachtung der Versuchsgruppen konnte zwischen $BSG^{+/+}$ auf MAC-1 und $BSG^{+/-}$ auf MAC-1 kein signifikanter Unterschied in der Adhäsionshäufigkeit nachgewiesen werden ($BSG^{+/+}$ über MAC-1 $4,1 \pm 0,8$ vs. $BSG^{+/-}$ über MAC-1: $3,8 \pm 0,7$). Auch in der Referenzgruppe mit BSA-Beschichtung bestanden zwischen $BSG^{+/+}$ und $BSG^{+/-}$ Monozyten keine signifikante Abweichung beider Gruppen ($BSG^{+/+}$ über BSA $2,3 \pm 0,6$ vs. $BSG^{+/-}$ über BSA $1,8 \pm 0,2$).

Des Weiteren erfolgte die Auswertung der stark verlangsamt fließenden Monozyten („rollend“, vgl. Abbildung 4.14). Auch hier zeigte sich insgesamt eine höhere Bindungsneigung bei MAC-1 Beschichtung als bei einer Beschichtung mit BSA. Trotzdem bestand kein signifikanter Unterschied zwischen $BSG^{+/+}$ Monozyten verglichen mit $BSG^{+/-}$ Monozyten auf mit MAC-1 beschichteten Oberfläche ($BSG^{+/+}$ über MAC-1 $36,6 \pm 3,1$ vs. $BSG^{+/-}$ über MAC-1: $44,4 \pm 7,9$).

In der Kontrollgruppe bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied (BSG^{+/+} über BSA $27,5 \pm 5,3$ vs. BSG^{+/-} über BSA: $32,9 \pm 4,6$).

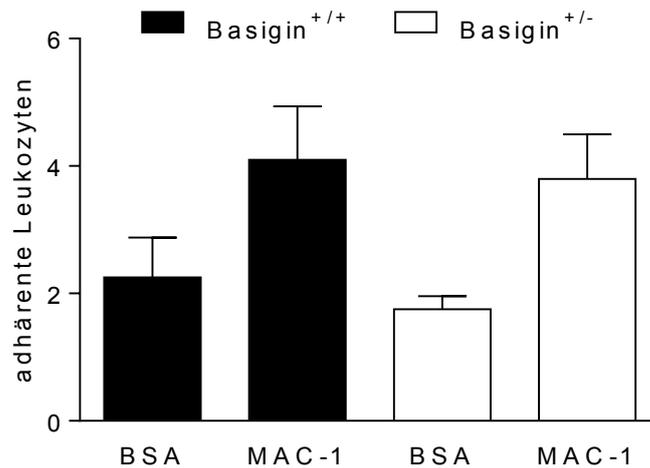


Abbildung 4.13: Eine verminderte CD147-Expression führt zu keiner Reduktion
adhärenter Monozyten. Die Abbildung zeigt die im Zeitraum der Aufnahme
adhärent gewordenen murinen Monozyten. Die schwarzen Balken
repräsentieren die WT-Population, die weißen Balken die heterozygote BSG^{+/-}
Mauspopulation.

Es zeigte sich, dass bei Vorhandensein einer MAC-1 beschichteten Oberfläche die Monozyten der Wildtyp-Population (n=5, Anzahl der eingeschlossenen Versuchstiere) häufiger eine Bindung eingehen als bei BSA-Beschichtung. Es konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, dass ein relativer CD147-Mangel der heterozygoten BSG^{+/-} Mauspopulation (n=5) zu einer Reduktion dieser Adhäsionshäufigkeit führt.

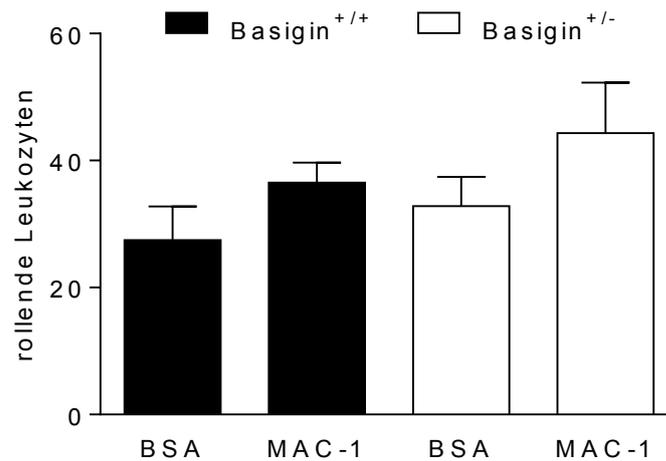


Abbildung 4.14. Eine verminderte CD147-Expression führt zu keiner Reduktion des Adhärenzverhaltens. Die Abbildung zeigt die Anzahl der gezählten Monozyten, welche im Beobachtungszeitraum ein deutlich verlangsamtes Flussverhalten („rollend“) aufgewiesen haben. Die schwarzen Balken repräsentieren die WT-Population, die weißen Balken die heterozygote BSG^{+/-} Mauspopulation.

Es zeigte sich, dass bei Vorhandensein einer MAC-1 beschichteten Oberfläche die Monozyten der Wildtyp-Population (n=5, Anzahl der eingeschlossenen Versuchstiere) sowie der BSG^{+/-} Mauspopulation (n=5) häufiger ein rollendes Flussverhalten aufweisen als bei BSA-Beschichtung. Unter Flussbedingungen konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mit MAC-1-Beschichtungen der verschiedenen Genotypen nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der Anzahl rollender Monozyten auf einer mit BSA beschichteten Oberfläche bestanden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Genotypen (beide n=5).

4.7. Reduktion adhärenter Thrombozyten unter Flussbedingungen nach Inhibition von MAC1 oder CD147

Um zu untersuchen, ob eine Inhibition von MAC-1 bzw. CD147 auch an der Oberfläche von Thrombozyten das Adhäsionsverhalten beeinflusst, wurde ein weiteres Flusskammermodell durchgeführt. Hierzu wurden Thrombozyten bei konstantem Fluss an einer mit MAC-1 bzw. BSA beschichteten Oberfläche vorbeigeführt. Es erfolgte im Vorfeld je nach Gruppen eine Inhibition mit Antikörpern entweder gegen MAC-1 bzw. CD147 oder IgG als Negativkontrolle. Die Positivkontrolle wurde nicht inhibiert. Im Rahmen der Auswertung erfolgte eine Unterteilung in rollende und adhärenthrombozyten.

In der Abbildung 4.15 sind ausschließlich die rollenden Thrombozyten aufgeführt. Insgesamt resultierte eine Oberflächenbeschichtung mit MAC-1 ohne eine pharmakologische Inhibition in einer Elevation der Anzahl rollender Thrombozyten verglichen mit einer BSA-Beschichtung.

Bei Betrachtung der über eine MAC-1-Beschichtung geleiteten Thrombozyten konnte in den Versuchsgruppen sowohl nach Inhibition von MAC-1 als auch nach CD147-Inhibition eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe mit IgG nachgewiesen werden (IgG $189,3 \pm 9,4$ vs. MAC-1 $87,0 \pm 6,5$ bzw. CD147 $101,4 \pm 12,9$). Ein Vergleich zwischen den nicht-inhibierten Thrombozyten auf der MAC-1-Beschichtung ($164,0 \pm 13,6$) und der IgG-Kontrolle zeigte erwartungsgemäß keine signifikante Abweichung.

Im Anschluss erfolgte die Betrachtung der Thrombozyten, welche im Beobachtungszeitraum adhärenthrombozyten wurden (vgl. Abbildung 4.16). Auch hier führte eine Beschichtung der Oberfläche mit MAC-1 ohne Inhibition von MAC-1 oder CD147 zu einer vermehrten Adhärenz im Vergleich zu einer BSA-Beschichtung. Bei Betrachtung der über die MAC-1 perfundierten Thrombozyten zeigte sich in den Ansätzen der inhibierten Thrombozyten eine deutlich reduzierte Adhäsionsneigung. So wurden nach Inhibition von MAC-1 bzw. CD147 signifikant weniger Thrombozyten adhärenthrombozyten als in der IgG-Kontrollgruppe (IgG $16,1 \pm 2,1$ vs.

MAC-1 $9,4 \pm 1,1$ bzw. CD147 $8,6 \pm 2,0$). Ein signifikanter Unterschied zwischen den uninhibierten Thrombozyten auf der MAC-1-Beschichtung ($15,2 \pm 2,2$) und der IgG-Kontrollgruppe bestand nicht.

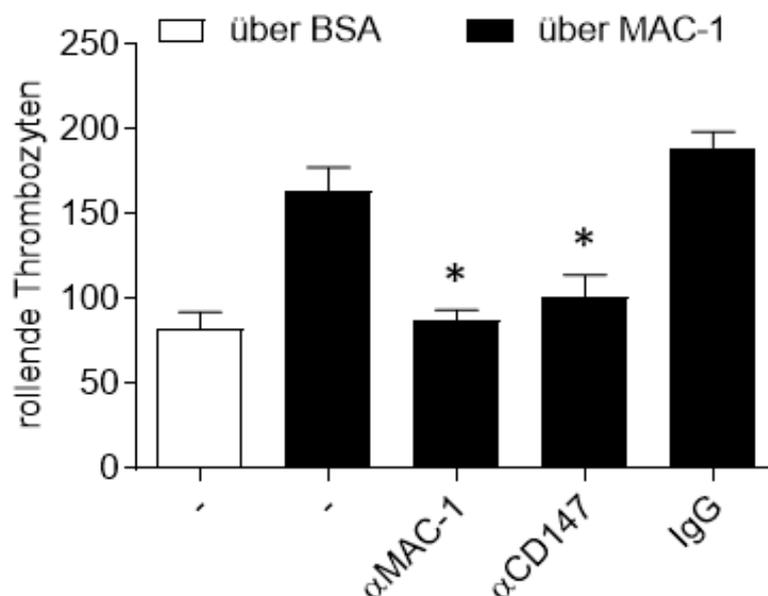


Abbildung 4.15: Inhibition von MAC-1/ CD147 auf Thrombozyten reduziert die Anzahl stark verlangsamter Thrombozyten signifikant. Die Abbildung zeigt die Anzahl der gezählten Thrombozyten, welche im Beobachtungszeitraum ein deutlich verlangsamtes Flussverhalten („rollend“) aufgewiesen haben. Der weiße Balken repräsentiert die Anzahl der Zellen, die auf einer BSA-Beschichtung einen rollenden Zustand aufwiesen. Die schwarzen Balken repräsentieren die Anzahl der Zellen, die auf einer MAC-1-beschichteten Oberfläche einen rollenden Zustand aufwiesen.

In den beiden Versuchsgruppen (n=7, entsprechend der Anzahl unabhängiger Versuche mit verschiedenen Probanden) mit entweder Inhibition von MAC-1 oder CD147 zeigte sich eine signifikante Reduktion der rollenden Thrombozyten verglichen mit der IgG-Kontrollgruppe auf einer MAC-1-beschichteten Oberfläche. Ein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-inhibierten Thrombozyten auf einer MAC-1-beschichteten Oberfläche und der IgG-Kontrollgruppe bestand nicht.

(* zeigt einen signifikanten Unterschied, hier $p < 0,0001$ verglichen mit der IgG-Kontrollgruppe)

modifiziert nach Heinzmann, Nöthel et al., 2020 (55)

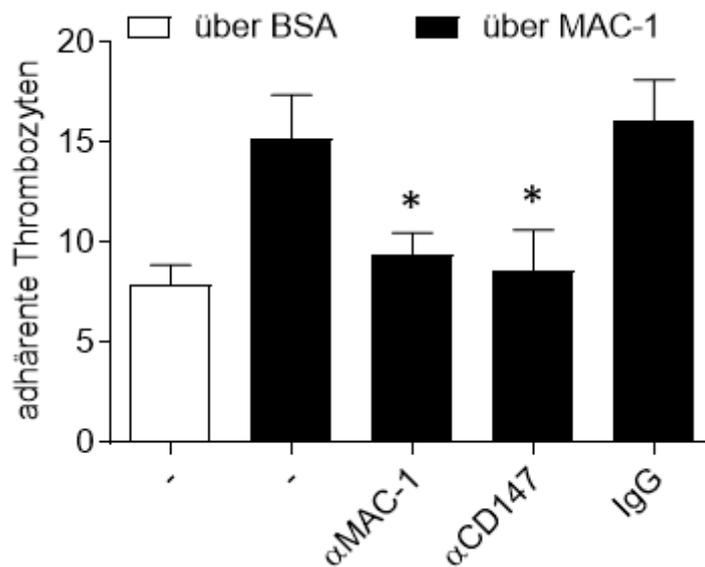


Abbildung 4.16: Die Inhibition von MAC-1/CD147 auf Thrombozyten reduzierte die Anzahl an adhärenen Thrombozyten signifikant. Die Abbildung zeigt die Anzahl der gezählten Thrombozyten, welche im Beobachtungszeitraum adhären wurden. Der weiße Balken repräsentiert die Thrombozyten, die auf einer BSA-Beschichtung adhären wurden. Die schwarzen Balken repräsentieren die Anzahl der Thrombozyten, die auf einer MAC-1-beschichteten Oberfläche adhären wurden.

In den beiden Versuchsgruppen (n=7, entsprechend der Anzahl unabhängiger Versuche mit verschiedenen Probanden) mit entweder Inhibition von MAC-1 oder CD147 zeigte sich eine signifikante Reduktion der adhärenen Thrombozyten verglichen mit der IgG-Kontrollgruppe auf einer MAC-1-beschichteten Oberfläche. Ein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-inhibierten Thrombozyten auf einer MAC-1-beschichteten Oberfläche und der IgG-Kontrollgruppe bestand nicht.

(* zeigt einen signifikanten Unterschied, hier $p < 0,05$ verglichen mit der IgG-Kontrollgruppe)

modifiziert nach Heinzmann, Nöthel et al., 2020 (55)

4.8 MAC-1 induziert keine signifikante Sekretion von Matrix-Metalloprotease-9 aus Monozyten.

Im Rahmen dieses Versuches wurde untersucht, ob eine Stimulation von Monozyten mit MAC-1 zu einer gesteigerten Freisetzung von MMPs führt, ähnlich wie bereits für CD147 beschrieben (35). Neben der MAC-1 Stimulation wurden weitere Gruppen mit CD147 und LPS stimuliert, eine Kontrollgruppe verblieb unstimuliert. Um eine quantitative Einschätzung der freigesetzten Proteine zu ermöglichen, erfolgte nach der Stimulation die Durchführung eines Zymogramms unter Betrachtung der für MMP-2 und MMP-9 bekannten Banden (siehe Abbildung 4.17). Nach Abschluss der Laufzeit wurden die Banden mit AxioVision anhand ihrer optischen Dichte als Surrogatparameter für die Menge der freigesetzten MMPs vergleichend ausgewertet.

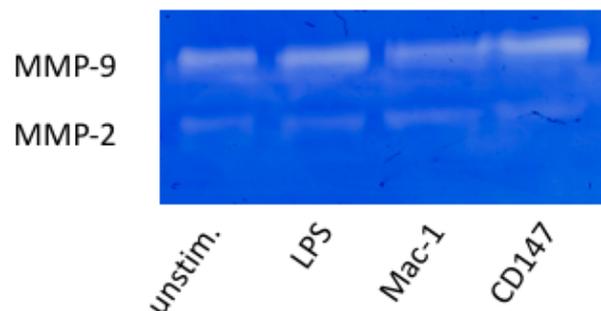


Abbildung 4.17: MAC-1 induziert keine signifikante Sekretion von MMP-9 aus Monozyten. Das repräsentative Zymogramm ($n \geq 3$, Anzahl der angefertigten Replikate) zeigt die Freisetzung von MMP-9 (und MMP-2) aus Monozyten nach Stimulation mit MAC-1 oder CD147 im Vergleich zu unstimulierten-/ LPS-stimulierten-Monozyten. Nach mindestens 12-stündiger Inkubation wurden die Überstände zymographisch ausgewertet. Die obere Bande bei 85-92 kDa entspricht MMP-9, die untere Bande bei 65 kDa entspricht MMP-2. Ein signifikanter Anstieg konnte nicht nachgewiesen werden.

In der Abbildung 4.18 sind die durch den Marker als MMP-2 identifizierten Banden mit der entsprechenden optischen Dichte aufgeführt. Hier zeigte sich in der CD147-Fraktion die höchste optische Dichte, gefolgt von den MAC-1- und LPS-Gruppen, ein signifikanter Unterschied zur unstimulierten Kontrolle bestand nach keiner der Stimulationen. Die unstimulierten Monozyten zeigten die geringste Sekretion von MMP-2 (unstimuliert: 4130 ± 378 vs. LPS: 4921 ± 1681 ; MAC-1: 5058 ± 960 ; CD147: 6578 ± 1975).

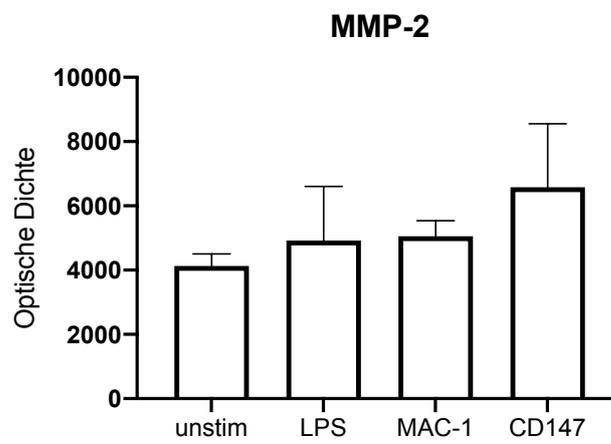


Abbildung 4.18: Freisetzung von MMP-2 aus Monozyten nach Stimulation mit MAC-1 bzw. CD147. Die Abbildung zeigt die gemessenen optischen Dichten der als MMP-2 identifizierten Banden nach Stimulation mit LPS, MAC-1 oder CD147 bzw. unstimuliert ($n \geq 3$, entsprechend der Anzahl der angefertigten Replikate). Es bestand eine höhere optische Dichte vor allem bei den CD147-stimulierten Monozyten im Vergleich zu der unstimulierten-/ LPS-stimulierten Monozyten. Ein signifikanter Unterschied bestand nicht.

Im Anschluss erfolgte, wie in Abbildung 4.19 gezeigt, die Auswertung der Banden welche durch den Marker als MMP-9 identifiziert wurden. Es zeigte sich, vor allem in der mit CD147 stimulierten Reihen, eine erhöhte optische Dichte verglichen mit einer unstimulierten Kontrollgruppe, wobei diese Unterschiede jedoch nicht signifikant waren (CD147: 27963 ± 4329 vs. unstimuliert: 20049 ± 1508). Die Stimulation mit MAC-1 führte zu keiner signifikanten Elevation der optischen

Dichte im Vergleich zur Kontrollgruppe (MAC-1: 24911 ± 3785). Nach Stimulation mit LPS zeigte sich ebenfalls keine signifikante Änderung (LPS: 23273 ± 3163). Zusammenfassend konnte nach Stimulation von Monozyten mit MAC-1 kein signifikanter Anstieg von MMP-9 beobachtet werden.

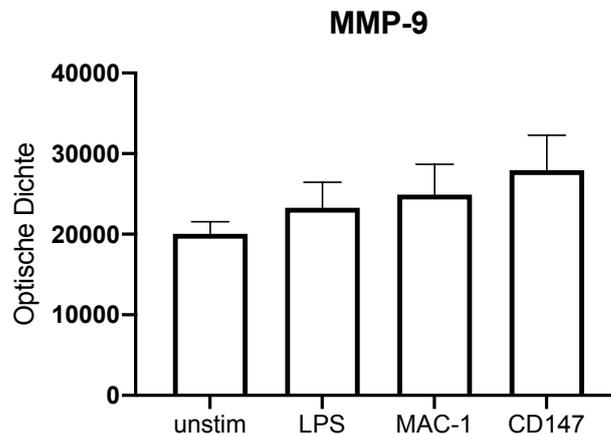


Abbildung 4.19: Freisetzung von MMP-9 aus Monozyten nach Stimulation mit MAC-1 bzw. CD147. Die Abbildung zeigt die Banden für MMP-9 gemäß ihrer optischen Dichte nach Stimulation mit LPS, MAC-1 oder CD147 bzw. unstimuliert ($n \geq 3$, Anzahl der angefertigten Replikate). Es bestand tendenziell eine höhere optische Dichte nach CD147-Stimulation als nach LPS-Stimulation bzw. ohne Stimulation. Ein signifikanter Unterschied bestand jedoch nicht. Die Stimulation mit MAC-1 erbrachte ebenfalls keinen signifikanten Anstieg.

5. Diskussion

Das Glykoprotein CD147 ist von herausragender Bedeutung für die Freisetzung von Matrix Metalloproteasen. In Sturhan et al. konnte eine deutliche gesteigerte CD147 Freisetzung bei Patienten mit instabiler KHK beschrieben werden, eine wichtige Rolle wurde in der CD147-CD147- bzw. CD147-GPVI-Interaktion vermutet (25). Vermittelt durch homotypische Bindung mit einem weiteren CD147-Protein an der ECI-Domäne kommt es zu einer Induktion der MMP-Sekretion (45, 47).

MMPs wiederum sind eine der wichtigsten Ursachen für die zunehmende Instabilität von atherosklerotischen Plaques durch Umbau und Degradierung im Übergangsbereich zwischen Gefäßwand und Plaque (8, 10). Bereits durch Hojo et al. konnte eine Steigerung der MMP-1 Konzentration durch Interaktion zwischen Monozyten und Endothelzellen gezeigt werden, wodurch letztlich bei ausbleibendem Anstieg inhibierender Faktoren (u.a. TIMPs) die Ausdünnung von Plaques im Bereich der Schulter geschlussfolgert wurde (56).

Es wurde bereits in diversen Studien gezeigt, dass durch Inhibition der HMG-CoA-Reduktase oder auch durch ACE-Hemmer (im Rahmen der HOPE-Studie) eine Stabilisierung der Plaques erreicht werden konnte (57, 58). So beschreibt Rival et al. eine Reduktion der MMP-9 Sekretion als Effekt des ACAT-Inhibitors Avasimibe, des HMG-CoA-Reduktasehemmers Fluvastatin und des PPAR-Agonisten (*peroxisome proliferator-activated receptor*) Rosiglitazone (59).

Einen Ansatz, der spezifisch auf die Reduktion von aktivierten Matrix-Metalloproteasen abzielt, gibt es bisher jedoch nicht.

Ich konnten in dieser Arbeit zeigen, dass eine Interaktion und ein hieraus resultierendes Bindungsverhalten zwischen MAC-1 und CD147 besteht. Es zeigte sich eine ganze Reihe neuer, durch MAC-1 vermittelte Prozesse. Dies ist von relevanter Bedeutung für die Adhäsion von Thrombozyten und Monozyten

an die Gefäßwand als ein früher atherosklerotischer Prozess, betrifft jedoch nicht die Freisetzung von MMPs wie dies von EMMPRIN bekannt ist.

5.1 MAC-1 ist ein neuer Bindungspartner für CD147

In der bisherigen Literatur sind diverse Bindungspartner für CD147 beschrieben, so wird bereits 1997 in Berditchevski et al. ein Bindungsverhalten zwischen $\alpha_3\beta_1$ aufgeführt (49).

Als weiteren, wichtigen Bindungspartner beschreibt Seizer et al. zudem erstmalig GPVI als Rezeptor für CD147, sodass eine Interaktion zwischen Thrombozyten und CD147-exprimierenden Oberflächen erklärt werden kann (60). Darüber hinaus sind als weitere Bindungspartner Cyclophiline (CyPA und CyPB), S100A9, sowie weitere Integrine wie beispielsweise $\alpha_6\beta_1$ bekannt (49, 60-63). Bei genauerer Betrachtung des Bindungsverhaltens zwischen CD147 und Integrinen konnte die β_1 -Untereinheit als primärer Bindungspartner identifiziert werden (49).

In der vorliegenden Arbeit konnte MAC-1 als neuen Bindungspartner für CD147 identifiziert werden. Dies ist deswegen hervorzuheben, da MAC-1 über keine β_1 -Untereinheit verfügt (MAC-1 verfügt über eine β_2 -Untereinheit). In der bisherigen Literatur ist bisher keine Interaktion zwischen CD147 und MAC-1 beschrieben.

Um das postulierte Bindungsverhalten nachzuweisen und weiterführend zu untersuchen, wurde ein Bindungs-ELISA durchgeführt. Hier konnte nachgewiesen werden, dass zwischen MAC-1 und CD147 eine stabile Bindung *in vitro* möglich ist. Diese konnte bereits bei geringer Konzentration beider Proteine etabliert werden, daher scheint diese Bindung hoch spezifisch zu sein. Der Nachweis gelang sowohl bei Beschichtung mit MAC-1 wie auch mit CD147. Um den Effekt eines unspezifischen Bindungsverhalten auszuschließen, erfolgte eine ergänzende Beschichtung mit BSA als Kontrollgruppe. Aufgrund der

signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe konnte eine unspezifische Bindung ausgeschlossen werden.

Zudem wurde die Expression auf der Oberflächenmembran von Monozyten mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Hier zeigte sich eine nahezu deckungsgleiche Anreicherung der verwendeten Antikörper für beide Proteine. Somit konnte eine deutliche Kolo-kalisation nachgewiesen werden. Da es sich um eine mit einem konfokalen Mikroskop angefertigten Aufnahme handelt, besteht eine hohe Spezifität auch in der Z-Achse. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Expression von MAC-1 und CD147 in der gleichen Ebene liegt.

Es lässt sich vermuten, dass diese Kolo-kalisation auch für das Bindungsverhalten zwischen MAC-1 und EMMPRIN eine wichtige Rolle spielt. Die Ergebnisse des ELISA bekräftigen diese Hypothese ebenfalls, da hier eine stabile Bindung zwischen MAC-1 und CD147 aufgezeigt werden konnte.

Um auszuschließen, dass eine unspezifische Bindung detektiert wird, erfolgte auch in dieser Versuchsanordnung eine Negativkontrolle mit IgG. Da in keiner der angefertigten Aufnahmen eine Emission detektiert wurde, konnte eine unspezifische Rezeptorbindung ausgeschlossen werden.

Weiterhin beschreibt Khunkaewla et al. ein Bindungsverhalten zwischen LFA-1 (lymphocyte-function associated antigen 1; Synonym auch $\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18) und CD43. CD43 konnte ebenfalls als Bindungspartner für CD147 identifiziert werden. Eine direkte Bindung zwischen CD147 und LFA-1 konnte in dieser Arbeit jedoch widerlegt werden, vielmehr wurde postuliert, dass die Interaktion zwischen CD147 und LFA-1 u.a. durch CD43 vermittelt wird (64). Hieraus wurde von Ungern-Sternberg et al. geschlossen, dass eine Bindung zwischen der CD18-Untereinheit und CD147 unwahrscheinlich sei (65).

Um die in den durchgeführten Versuchen beobachtete Interaktion zwischen CD147 und MAC-1 besser zu verstehen, ist es wichtig, zuerst die Unterschiede zwischen MAC-1 und LFA-1 zu betrachten. Bei LFA-1 bindet α_L (CD11a) an CD18, im Gegensatz hierzu ist bei MAC-1 α_M (CD11b) an CD18 gebunden. Somit

unterscheiden sich LFA-1 und MAC-1 in dem an CD18 gebundenen Integrin. Folglich erscheint eine direkte Bindung zwischen MAC-1 und CD147 über CD11b möglich.

Zusammenfassend konnte ich erstmalig MAC-1 als neuen Bindungspartner für CD147 nachweisen. Wie bereits beschrieben ist es gut möglich, dass diese Bindung über das Integrin α_M (CD11b) vermittelt wird. Alternativ ist eine indirekte Bindung ebenfalls möglich, dies sollte aber im Rahmen des o.g. Versuchsaufbaus weitestgehend ausgeschlossen gewesen sein.

5.2. Die Interaktion von CD147 und MAC-1 ist ein weiterer Ansatzpunkt für die Adhäsion von Thrombozyten und Monozyten

Bereits in vielen vorhergehenden Studien wurde die Rekrutierung von Leukozyten (insbesondere Monozyten) an die Gefäßwand untersucht. Hervorzuheben ist die Bedeutung des Integrins MAC-1 ($\alpha_M\beta_2$) in diesem mehrstufigen Prozess, um eine feste Bindung mit der Gefäßwand über endotheliale Liganden (z.B. ICAM-1) zu etablieren (41).

In Übereinstimmung mit den bisher bekannten Eigenschaften von MAC-1 konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Inhibition von MAC-1 auf der Zellmembran von Monozyten unter Flussbedingungen zu einer Abnahme ihrer Bindungseigenschaften führt. So konnten signifikant weniger Monozyten in einem stark verlangsamten Zustand („rollend“) beobachtet werden. Die Anzahl von vollständig adhärenen Monozyten wurde ebenfalls signifikant reduziert. Hier konnte somit das bereits in früheren Studien beobachtete Bindungsverhalten bestätigt werden (41, 42).

Bisher noch nicht beschrieben wurde die Rolle von CD147 bezogen auf das Bindungsverhalten an die Zellwand sowie ein Zusammenspiel mit CD147.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Inhibition von monozytärem CD147 zu einer Absenkung der Anzahl rollender und auch adhärenter Zellen führt, ähnlich der Inhibition von MAC-1. In den beiden Flusskammermodellen mit humanen Monozyten zeigte sich insgesamt eine sehr niedrige Anzahl an Zellen, die im Beobachtungszeitraum adhärent wurden. Dies ist damit zu erklären, dass in einigen Sequenzen keine dauerhafte Adhäsion beobachtet werden konnte und alle Monozyten in dem als „rollend“ beschriebenen Zustand verblieben. Trotzdem ist davon auszugehen, dass dies eine biologische Relevanz hat, da dies auf eine unterschiedlich hohe Wahrscheinlichkeit einer Adhäsion schließen lässt.

Letztendlich konnte belegt werden, dass die Bindung von CD147 und MAC-1 durch eine Blockierung eines der beiden Rezeptoren signifikant reduziert werden kann.

Des Weiteren erfolgte die Anlage eines statischen Adhäsionsassays mit Monozyten von MAC-1-defizienten Mäusen. Hier konnte nachgewiesen werden, dass bei MAC-1 Mangel die Adhäsionsfähigkeit auf CD147 deutlich abnimmt und auf das Niveau der mit bovinem Serumalbumin stimulierten Kontrollgruppe abfällt.

Diese Ergebnisse konnten auch in entgegengesetzte Richtung bestätigt werden. So zeigten Monozyten von heterozygoten CD147-Mäusen eine deutliche Reduktion der Bindungshäufigkeit an MAC-1. Jedoch bestand im Rahmen dieses Adhäsionsassays bereits in der heterozygoten Population eine vermehrte Adhäsion bei BSA-Beschichtung. Die Adhäsion von Monozyten an das Endothel ist ein multifaktorieller Prozess und wird unter anderem durch verschiedene Adhäsionsmoleküle (z.B. VCAM-1), Chemokine (z.B. MCP-1), Integrine (z.B. MAC-1, LFA-1) sowie inflammatorische Prozesse reguliert (66, 67). Bei den heterozygoten CD147-Mäusen wird von einer verminderten CD147-Expression ausgegangen, sodass eine kompensatorisch gesteigerte Expression weiterer, für die Adhäsion erforderlicher Faktoren eine mögliche Erklärung für die vermehrte Adhäsion an die BSA-beschichtete Oberfläche darstellen könnte.

In einem angeschlossenen Versuch wurde untersucht, ob das veränderte Bindungsverhalten der CD147-defizienten murinen Monozyten sich auch unter Flussbedingungen beobachten lässt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Bindungshäufigkeit verglichen mit einer Wildtyp-Population. Dieser Widerspruch lässt sich am ehesten durch den angefertigten MAC-1/CD147-Bindungs-ELISA erklären. Es wurde bereits bei der niedrigsten Konzentration von sowohl MAC-1 als auch CD147 ein rascher Anstieg der Bindungskurve beobachtet. Somit lässt sich schließen, dass die Menge an CD147 auf den Monozyten der heterozygoten Population bereits für das typische Bindungsverhalten ausreicht. Dies ist am ehesten durch eine hohe Affinität der Bindung zu erklären. Aus vorausgehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass die CD147-Expression bei ca. 50% liegt. Dies wurde in Splenozyten mittels Western Blot sowie in immunhistochemischen Färbungen von Hepatozyten und Splenozyten bestimmt (68, 69). Eine homozygote Zucht von CD147^{-/-} Mäusen ist aufgrund der Belastung der Tiere (u.a. Infektionsanfälligkeit, perinatale Letalität) nur sehr schwer möglich (70).

In vorausgehenden Untersuchungen wurde zudem die Rolle von CD147 für die Adhäsion zwischen Thrombozyten und Monozyten beschrieben (71).

Daher wurde die Übertragbarkeit der Ergebnisse mit Monozyten auch für Thrombozyten überprüft. Auch hier zeigte sich unter Flussbedingungen eine deutliche Reduktion an adhären und rollenden Zellen bei Inhibition von entweder MAC-1 oder CD147 sowohl auf MAC-1- wie auch auf einer CD147-beschichteten Oberfläche.

Hieraus lässt sich schließen, dass das Adhäsionsverhalten von Monozyten und Thrombozyten in besonderem Maße von diesen beiden Oberflächenproteinen abhängig ist. Besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle das heterotypische Bindungsverhalten zwischen MAC-1 und CD147. Bedingt hierdurch ist eine Interaktion mit der Gefäßwand durch MAC-1 bei blockiertem CD147 (bzw. durch CD147 bei blockiertem MAC-1) insuffizient.

5.3. MAC-1 induziert keine Freisetzung von Matrix-Metalloproteasen

Wie in diversen Studien bereits beschrieben ist die Funktion von CD147, Matrix Metalloproteasen freizusetzen, unumstritten. Dies wurde bereits 1997 in Guo et al. aufgezeigt (72).

Bisher jedoch kaum beschrieben ist die Rolle, die MAC-1 in diesem Regulationsmechanismus zukommt.

Ich konnte zeigen, dass es zu keiner vermehrten Sekretion von MMP-2 und MMP-9 nach Stimulation mit MAC-1 kam.

Es lässt sich hieraus schließen, dass trotz der homotypischen Bindungen mit CD147 und der von uns ebenfalls dokumentierten räumlichen Kollokalisierung MAC-1 keine Rolle in der Induktion von MMPs zukommt. Es lässt sich annehmen, dass die mechanistische Funktion von MAC-1 auf das reine Adhäsionsverhalten beschränkt ist. Wie bereits in 5.1. erwähnt, kann anhand vorheriger Studien sowie der hier erhobenen Daten vermutet werden, dass CD11b für die Interaktion zwischen MAC-1 und CD147 eine entscheidende Rolle spielt und somit ein potenzielles Ziel für weitere Untersuchungen darstellt.

An dieser Stelle ist jedoch anzumerken, dass auch in der CD147-stimulierten Gruppe keine signifikante Steigerung von MMPs beobachtet werden konnte. Zwar zeigte sich eine deutliche Tendenz in der CD147-stimulierten Gruppe, aber ein Signifikanzniveau wurde nicht erreicht. Dies kann darauf hindeuten, dass der Versuch nicht funktioniert hat (z.B. aufgrund zu niedrig konzentrierter Stimuli). Aufgrund der klaren Tendenz (die höchste Expression von MMP-2 und MMP-9 konnte in der CD147-Gruppe gemessen werden) gehe ich jedoch davon aus, dass der Versuch prinzipiell funktioniert hat. Letztlich gilt, dass eine Induktion von MMP-2 und MMP-9 durch MAC-1 hier nicht beobachtet werden konnte, sich jedoch nicht mit absoluter Sicherheit ausschließen lässt.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Interaktion zwischen CD147 und MAC-1 eine bedeutende Rolle für die Adhäsion von Monozyten und Thrombozyten *in vitro* einnimmt und somit einen potentiell wichtigen Beitrag bei der Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen leisten könnte.

Es konnte nachgewiesen werden, dass MAC-1 und CD147 in der Lage sind eine stabile Bindung einzugehen. Zudem konnte eine deutliche Kollokalisierung beider Proteine auf der Zellmembran von Monozyten nachgewiesen werden. Interessanterweise führt eine Stimulation mit MAC-1 jedoch nicht zu einer Induktion der Proteinbiosynthese von MMPs.

Außerdem konnte festgestellt werden, dass sowohl CD147 als auch MAC-1 unter simulierten Flussbedingungen und auch unter statischen Verhältnissen wichtig für die Adhäsion sind. Konsekutiv wird die Migration von Monozyten und Thrombozyten in vaskulären Strukturen erheblich gefördert. Auch ist das Zusammenspiel beider Proteine wichtig, da die Blockade eines der Bindungspartner zu einer Reduktion der etablierten Bindungen des jeweils anderen Oberflächenproteins führt, was nachfolgend zu einer Abnahme der zellulären Adhärenz führt.

Es lässt sich also postulieren, dass die Adhäsion von Monozyten und Thrombozyten an die Gefäßwand in relevantem Ausmaß durch eine Interaktion von CD147 und MAC-1 gefördert wird. Anders als CD147 bewirkt jedoch MAC-1 keine vermehrte Induktion von MMPs. Dies lässt vermuten, dass die mechanistische Funktion von MAC-1 in diesem Kontext primär in einer Adhäsionsvermittlung liegt und hierbei eine synergistische Rolle zu CD147 einnimmt.

Dabei sollten jedoch auch weitere Funktionen von MAC-1 (bzw. der Gruppe der Integrine) auf Monozyten und Makrophagen, wie beispielsweise für die Migration und Phagozytose im Rahmen des angeborenen Immunsystems, nicht außer Acht gelassen werden. Dies sollte in zukünftigen Studien ebenfalls berücksichtigt

werden, auch im Hinblick auf mögliche Limitationen für eine klinische Anwendung.

Perspektivisch ist dies ein sinnvoller Ansatzpunkt, um die Entwicklung einer relevanten Atherosklerose durch eine selektive Inhibition der Monozytenadhäsion und ohne Einfluss auf den Stoffwechsel von MMPs, bereits zu einem frühen Zeitpunkt maßgeblich zu modifizieren.

7. Literaturverzeichnis

1. Destatis. Todesursachen in Deutschland 2019 [Internet]. Statistisches Bundesamt 2020 [cited 02.02.2021].
2. Destatis. Krankheitskosten 2015 [Internet]. Statistisches Bundesamt. 2021 [cited 02.02.2021].
3. Laslett LJ, Alagona P, Jr., Clark BA, 3rd, Drozda JP, Jr., Saldivar F, Wilson SR, et al. The worldwide environment of cardiovascular disease: prevalence, diagnosis, therapy, and policy issues: a report from the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60(25 Suppl):S1-49.
4. Vedanthan R, Seligman B, Fuster V. Global perspective on acute coronary syndrome: a burden on the young and poor. *Circ Res.* 2014;114(12):1959-75.
5. Schulz C, von Bruhl ML, Barocke V, Cullen P, Mayer K, Okrojek R, et al. EMMPRIN (CD147/basigin) mediates platelet-monocyte interactions in vivo and augments monocyte recruitment to the vascular wall. *J Thromb Haemost.* 2011;9(5):1007-19.
6. Pennings GJ, Kritharides L. CD147 in cardiovascular disease and thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2014;40(7):747-55.
7. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407(6801):233-41.
8. Hansson GK. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine.* 2005;352(16):1685-95.
9. Skåln K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature.* 2002;417:750.
10. Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine.* 1999;340(2):115-26.
11. Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology.* 2003;14(5):421-30.
12. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Current Opinion in Immunology.* 2002;14(1):123-8.
13. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1995;92(5):1355-74.
14. Groenendyk JW, Mehta NN. Applying the ordinal model of atherosclerosis to imaging science: a brief review. *Open Heart.* 2018;5(2).
15. Steinberg D. Hypercholesterolemia and inflammation in atherogenesis: two sides of the same coin. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49(11):995-8.
16. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420(6917):868-74.

17. Sugiyama T, Yamamoto E, Bryniarski K, et al. Nonculprit plaque characteristics in patients with acute coronary syndrome caused by plaque erosion vs plaque rupture: A 3-vessel optical coherence tomography study. *JAMA Cardiology*. 2018;3(3):207-14.
18. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang Y-h, Smialek J, Virmani R. Coronary Risk Factors and Plaque Morphology in Men with Coronary Disease Who Died Suddenly. *New England Journal of Medicine*. 1997;336(18):1276-82.
19. Chung SL, Joseph S, Manjit SG, Amanda CS, Alun HD. Matrix Metalloproteinases in Vascular Disease - A Potential Therapeutic Target? *Current Vascular Pharmacology*. 2010;8(1):75-85.
20. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 3. ed: Georg Thieme Verlag KG; 2009. 268-71 p.
21. Löffler GH, Peter; Petrides, Petro. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 8. ed: Springer, Berlin, Heidelberg; 2007. 976-88 p.
22. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha5beta3 integrin, and GPIIb/IIIa. *The Journal of experimental medicine*. 1998;187(3):329-39.
23. Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(7):887-96.
24. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(12):3378-84.
25. Sturhan H, Ungern-Sternberg SN, Langer H, Gawaz M, Geisler T, May AE, et al. Regulation of EMMPRIN (CD147) on monocyte subsets in patients with symptomatic coronary artery disease. *Thromb Res*. 2015;135(6):1160-4.
26. Joghetai N, Stein A, Byrne RA, Schulz C, King L, May AE, et al. The Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN, CD147) - a potential novel target in atherothrombosis prevention? *Thromb Res*. 2013;131(6):474-80.
27. Löffler GH, Peter; Petrides, Petro. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 8. ed: Springer, Berlin, Heidelberg; 2007. 736-7 p.
28. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*. 2005;85(1):1-31.
29. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation*. 1994;94(6):2493-503.
30. Yoon YW, Kwon HM, Hwang KC, Choi EY, Hong BK, Kim D, et al. Upstream regulation of matrix metalloproteinase by EMMPRIN; extracellular matrix metalloproteinase inducer in advanced atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis*. 2005;180(1):37-44.
31. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res*. 1997;81(3):448-54.

32. Galt SW, Lindemann S, Medd D, Allen LL, Kraiss LW, Harris ES, et al. Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 by monocytes adherent to collagen and platelets. *Circ Res*. 2001;89(6):509-16.
33. Sawicki G, Salas E, Murat J, Miszta-Lane H, Radomski MW. Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature*. 1997;386(6625):616-9.
34. 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(5):836-9.
35. Schmidt R, Bultmann A, Ungerer M, Joghetaei N, Bulbul O, Thieme S, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction. *Circulation*. 2006;113(6):834-41.
36. Lim J, Hotchin NA. Signalling mechanisms of the leukocyte integrin alphaMbeta2: current and future perspectives. *Biol Cell*. 2012;104(11):631-40.
37. Patel PC, Harrison RE. Membrane ruffles capture C3bi-opsonized particles in activated macrophages. *Molecular biology of the cell*. 2008;19(11):4628-39.
38. Tao L, Zhang Y, Xi X, Kieffer N. Recent advances in the understanding of the molecular mechanisms regulating platelet integrin alphaIIb beta3 activation. *Protein & cell*. 2010;1(7):627-37.
39. Calderwood DA, Zent R, Grant R, Rees DJG, Hynes RO, Ginsberg MH. The Talin Head Domain Binds to Integrin beta Subunit Cytoplasmic Tails and Regulates Integrin Activation. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(40):28071-4.
40. Rougerie P, Miskolci V, Cox D. Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton. *Immunological reviews*. 2013;256(1):222-39.
41. Simon DI. Inflammation and Vascular Injury. *Circulation Journal*. 2012;76(8):1811-8.
42. Lee SJ, Choi EK, Seo KW, Bae JU, Park SY, Kim CD. TLR4-mediated expression of Mac-1 in monocytes plays a pivotal role in monocyte adhesion to vascular endothelium. *PLoS One*. 2014;9(8):e104588.
43. Rogers C, Edelman ER, Simon DI. A mAb to the beta2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(17):10134-9.
44. Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, et al. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res*. 1995;55(2):434-9.
45. Agrawal SM, Yong VW. The many faces of EMMPRIN - roles in neuroinflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(2):213-9.
46. Bai Y, Huang W, Ma LT, Jiang JL, Chen ZN. Importance of N-glycosylation on CD147 for its biological functions. *Int J Mol Sci*. 2014;15(4):6356-77.
47. Yan L, Zucker S, Toole BP. Roles of the multifunctional glycoprotein, Emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. *Thrombosis and Haemostasis*. 2005;93(2):199-204.

48. Pennings GJ, Yong AS, Kritharides L. Expression of EMMPRIN (CD147) on circulating platelets in vivo. *J Thromb Haemost.* 2010;8(3):472-81.
49. 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(46):29174-80.
50. Tang W, Hemler ME. Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering. *J Biol Chem.* 2004;279(12):11112-8.
51. Knutti N, Kuepper M, Friedrich K. Soluble extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN, EMN) regulates cancer-related cellular functions by homotypic interactions with surface CD147. *The FEBS Journal.* 2015;282(21):4187-200.
52. Ellis SM, Nabeshima K, Biswas C. Monoclonal Antibody Preparation and Purification of a Tumor Cell Collagenase-stimulatory Factor. *Cancer Research.* 1989;49(12):3385.
53. Sidhu SS, Mengistab AT, Tauscher AN, LaVail J, Basbaum C. The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions. *Oncogene.* 2004;23(4):956-63.
54. Langer HF, Stellos K, Steingen C, Frohofer A, Schönberger T, Krämer B, et al. Platelet derived bFGF mediates vascular integrative mechanisms of mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2009;47(2):315-25.
55. Heinzmann D, Noethel M, von Ungern-Sternberg S, Mitroulis I, Gawaz M, Chavakis T, et al. CD147 is a Novel Interaction Partner of Integrin α M β 2 Mediating Leukocyte and Platelet Adhesion. *Biomolecules.* 2020;10(4).
56. Hojo Y, Ikeda U, Takahashi M, Sakata Y, Takizawa T, Okada K, et al. Matrix metalloproteinase-1 expression by interaction between monocytes and vascular endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32(8):1459-68.
57. Dave T, Ezhilan J, Vasnawala H, Somani V. Plaque regression and plaque stabilisation in cardiovascular diseases. *Indian journal of endocrinology and metabolism.* 2013;17(6):983-9.
58. Effects of an Angiotensin-Converting–Enzyme Inhibitor, Ramipril, on Cardiovascular Events in High-Risk Patients. *New England Journal of Medicine.* 2000;342(3):145-53.
59. Rival Y, Benéteau N, Chapuis V, Taillandier T, Lestienne F, Dupont-Passelaigue E, et al. Cardiovascular Drugs Inhibit MMP-9 Activity from Human THP-1 Macrophages. *DNA and Cell Biology.* 2004;23(5):283-92.
60. Seizer P, Borst O, Langer HF, Bültmann A, Münch G, Herouy Y, et al. EMMPRIN (CD147) is a novel receptor for platelet GPVI and mediates platelet rolling via GPVI-EMMPRIN interaction. *Thrombosis and Haemostasis.* 2009;101(4):682-6.
61. Yurchenko V, Zybarth G, O'Connor M, Dai WW, Franchin G, Hao T, et al. Active Site Residues of Cyclophilin A Are Crucial for Its Signaling Activity via CD147. *Journal of Biological Chemistry.* 2002;277(25):22959-65.
62. Yurchenko V, O'Connor M, Dai WW, Guo H, Toole B, Sherry B, et al. CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;288(4):786-8.
63. Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S, Yamamoto M, Motoyama A, Hosoi J, et al. S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cancer Res.* 2013;73(1):172-83.

64. Khunkaewla P, Schiller HB, Paster W, Leksa V, Čermák L, Anděra L, et al. LFA-1-mediated leukocyte adhesion regulated by interaction of CD43 with LFA-1 and CD147. *Molecular Immunology*. 2008;45(6):1703-11.
65. von Ungern-Sternberg SNI, Zerneck A, Seizer P. Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer EMMPRIN (CD147) in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2).
66. Schittenhelm L, Hilkens CM, Morrison VL. $\beta(2)$ Integrins As Regulators of Dendritic Cell, Monocyte, and Macrophage Function. *Front Immunol*. 2017;8:1866.
67. Gimbrone Michael A, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation Research*. 2016;118(4):620-36.
68. Seizer P, Ochmann C, Schönberger T, Zach S, Rose M, Borst O, et al. Disrupting the EMMPRIN (CD147)-cyclophilin A interaction reduces infarct size and preserves systolic function after myocardial ischemia and reperfusion. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(6):1377-86.
69. Ochmann C. CD147 (EMMPRIN) und dessen Ligand Cyclophilin A bestimmen das Ausmaß des myokardialen Schadens nach Ischämie/Reperfusion im Mausmodell.: Ludwig-Maximilians-Universität München, Tierärztlichen Fakultät; 2010: 57-60.
70. Igakura T, Kadomatsu K, Kaname T, Muramatsu H, Fan QW, Miyauchi T, et al. A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis. *Developmental biology*. 1998;194(2):152-65.
71. Seizer P, Borst O, Langer HF, Bultmann A, Munch G, Herouy Y, et al. EMMPRIN (CD147) is a novel receptor for platelet GPVI and mediates platelet rolling via GPVI-EMMPRIN interaction. *Thromb Haemost*. 2009;101(4):682-6.
72. 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. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(1):24-7.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1:

Aufbau einer Flusskammeruntersuchung: **A** Fotografie der verwendeten Flusskammer. **B** Schematische Zeichnung des Flusskammermodells. - 19 -

Abbildung 4.1:

MAC-1/BSA-CD147-Bindungs-ELISA..... - 26 -

Abbildung 4.2:

CD147/BSA-MAC-1-Bindungs-ELISA..... - 27 -

Abbildung 4.3:

Lokalisation von MAC-1 auf der Zellmembran von Monozyten..... - 29 -

Abbildung 4.4:

Lokalisation von CD147 auf der Zellmembran von Monozyten..... - 30 -

Abbildung 4.5:

Kokalisation von MAC-1 und CD147 auf der Zellmembran von Monozyten
..... - 31 -

Abbildung 4.6:

IgG Kontrollgruppe: A - Overlay; B - IgG CD147 (Spezie IgG); C - IgG
MAC-1 (Spezie IgG)..... - 32 -

Abbildung 4.7:

Inhibition von MAC-1 oder CD147 auf LPS-stimulierten Monozyten
reduziert das Adhärenzverhalten - 34 -

Abbildung 4.8:

Inhibition von MAC-1 oder CD147 auf LPS-stimulierten Monozyten
reduziert die Anzahl adhärenter Monozyten - 35 -

Abbildung 4.9:

Inhibition von MAC-1 oder CD147 auf LPS-stimulierten Monozyten
reduziert das Adhärenzverhalten - 37 -

Abbildung 4.10:

Inhibition von MAC-1 oder CD147 reduziert die Anzahl adhärenter
Monozyten..... - 38 -

Abbildung 4.11:	
Fehlende Expression von MAC-1 führt zu einer geringeren Adhärenz von murinen Monozyten.....	- 40 -
Abbildung 4.12:	
Verminderte Expression von CD147 führt zu einer geringeren Adhärenz von murinen Monozyten: A absolute Anzahl muriner Monozyten. B relative Änderung der Adhäsion	- 42 -
Abbildung 4.13:	
Eine verminderte CD147-Expression führt zu keiner Reduktion adhärenter Monozyten.....	- 44 -
Abbildung 4.14.	
Eine verminderte CD147-Expression führt zu keiner Reduktion des Adhärenzverhaltens	- 45 -
Abbildung 4.15:	
Inhibition von MAC-1/ CD147 auf Thrombozyten reduziert die Anzahl stark verlangsamter Thrombozyten signifikant	- 47 -
Abbildung 4.16:	
Die Inhibition von MAC-1/CD147 auf Thrombozyten reduzierte die Anzahl an adhärenenten Thrombozyten signifikant	- 48 -
Abbildung 4.17:	
MAC-1 induziert keine signifikante Sekretion von MMP-9 aus Monozyten	- 49 -
Abbildung 4.18:	
Freisetzung von MMP-2 aus Monozyten nach Stimulation mit MAC-1 bzw. CD147	- 50 -
Abbildung 4.19:	
Freisetzung von MMP-9 aus Monozyten nach Stimulation mit MAC-1 bzw. CD147	- 51 -

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin III - Kardiologie und Kreislauferkrankungen unter Betreuung von Prof. Dr. med Peter Seizer durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Peter Seizer und Dr. med. David Heinzmann.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Saskia von Ungern-Sternberg und Klaudia Povasec (MTA) von mir eigenständig durchgeführt und durch Dr. med. D. Heinzmann sowie Prof. Dr. med. P. Seizer betreut.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Dr. rer. nat. Saskia von Ungern-Sternberg.

Das Verfassen der Publikation Heinzmann et al., 2020 erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. David Heinzmann auf Grundlage der von mir erhobenen Daten. Die detaillierte Aufteilung hierbei war wie folgt: Die Konzeptualisierung der Publikation erfolgte durch Prof. Dr. med. P. Seizer, Prof. Dr. med. Andreas May, Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz, Dr. med. D. Heinzmann, Dr. Ioannis Mitroulis und Prof. Dr. med. Triantafyllos Chavakis. Die notwendige Methodik wurde durch Prof. Dr. med. P. Seizer, Prof. Dr. med. M Gawaz, Dr. med. D. Heinzmann, Dr. I Mitroulis, Dr. rer nat. S. von Ungern-Sternberg und mich eingebracht. Die Durchführung der Versuche erfolgte dabei, wie oben beschrieben, durch mich. Die erste Rohfassung der Publikation wurde durch Prof. Dr. med. P. Seizer und Dr. med. D. Heinzmann erstellt, im weiteren Bearbeitungsprozess waren zusätzlich Dr. rer nat. S. von Ungern-Sternberg, Dr. I Mitroulis, Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz, Prof. Dr. med. A. May, Prof. Dr. med. T. Chavakis und ich beteiligt. Die Visualisierung erfolgte durch Dr. med. D. Heinzmann, Dr. rer nat. S. von Ungern-Sternberg und mich. Die Finanzierung

erfolgte aus Mitteln von Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz, Prof. Dr. med. P. Seizer und Dr. med. D. Heinzmann.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

10. Publikationsliste

Veröffentlichungen in Fachjournalen:

Heinzmann D*, **Noethel M*** , et al. CD147 is a Novel Interaction Partner of Integrin α M β 2 Mediating Leukocyte and Platelet Adhesion. *Biomolecules*. 2020;10(4):E541. Published 2020 Apr 2. (*shared first)

11. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Peter Seizer bedanken, Chefarzt der Medizinische Klinik II - Kardiologie und Angiologie des Ostalb-Klinikums Aalen. Herr Prof. Dr. med. Peter Seizer überließ mir dankenswerterweise das spannende Thema der vorliegenden Dissertation und unterstützte mich in allen Phasen der Dissertation stets mit hilfreichen Ratschlägen.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz, dem ärztlichen Direktor der Inneren Medizin III - Kardiologie und Kreislaufkrankungen des Universitätsklinikums Tübingen, für die freundlicherweise bereitgestellten Forschungseinrichtungen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Saskia von Ungern-Sternberg für die exzellente Einarbeitung in die unterschiedlichen Versuchs- und Auswertungsmethoden sowie die zahlreichen Ratschläge und Anregungen in allen Abschnitten dieser Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. David Heinzmann für die freundliche und konstruktive Zusammenarbeit sowie die Hilfsbereitschaft bei Rückfragen.

Abschließend möchte ich mich noch bei Frau Klaudia Posavec für die ausgezeichnete Einarbeitung, die tolle Unterstützung sowie die sehr gute Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken.