

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

**Charakterisierung der monozytären Adhärenz bei myo-
kardialer Ischämie und Reperfusionsschaden**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Daltoè, Florian

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Seizer

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. R. Plentz

Tag der Disputation: 21.07.2017

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	9
1.1 Myokardinfarkt.....	10
1.1.1 Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts.....	10
1.1.2 Reperfusionstherapie und deren Komplikationen.....	10
1.1.3 Pathophysiologie der Postinfarkt-Phase.....	12
1.1.3.1 Entzündungsreaktion.....	12
1.1.3.2 Umstrukturierung des geschädigten Gewebes durch Matrix-Metalloproteinasen.....	13
1.1.4 Rolle der Monozyten in der Postinfarkt-Phase.....	14
1.1.4.1 Monozyten-Subgruppen.....	15
1.1.4.2 Adhäsion und Transmigration von Monozyten.....	15
1.1.4.3 Monozyteninvasion beim Herzinfarkt.....	16
1.1.4.4 Myokardiales Remodelling durch Monozyten.....	16
1.1.5 Phasen der Wundheilungsreaktion nach Myokardinfarkt.....	17
1.2 Cyclophilin A.....	19
1.2.1 Cyclophiline als Zielstruktur des Ciclosporin A.....	19
1.2.2 Struktur von Cyclophilin A.....	20
1.2.3 Funktion und Vorkommen <i>in vivo</i>	20
1.3 CD147 – Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN).....	21
1.3.1 Struktur von CD147.....	22
1.3.2 Funktion und Vorkommen <i>in vivo</i>	23
1.3.2.1 CD147 als Rezeptor der Cyclophiline.....	23
1.3.2.2 Assoziation von CD147 mit anderen Proteinen.....	24
1.3.2.3 Auswirkungen einer CD147-Defizienz.....	25
1.4 Rolle der Cyclophilin A-CD147-Interaktion.....	25
1.4.1 Leukozytenmigration.....	26
1.4.2 Wundheilung und Stimulation der Matrix-Metalloproteinase-Sekretion.....	26
1.4.3 Rolle von Cyclophilin A und CD147 beim Myokardinfarkt.....	27
1.4.4 Cyclophilin A und CD147 in der Pathophysiologie inflammatorischer, maligner und infektiöser Erkrankungen.....	28

1.4.5 Intrazelluläre Signalwege von Cyclophilin A / CD147.....	28
1.4.5.1 Der Phosphoinositid-3-Kinase-Akt-Signalweg.....	29
1.5 Neue Therapieansätze zur Beeinflussung der pathophysiologischen Vorgänge bei Myokardinfarkt.....	30
1.6 Fragestellung.....	31
2. Material und Methoden.....	34
2.1 Material.....	34
2.1.1 Geräte und Software.....	34
2.1.2 Maushaltung und Operation.....	35
2.1.3 Verbrauchsmaterial.....	36
2.1.4 Reagenzien und Lösungen.....	37
2.1.5 Färbelösungen.....	37
2.1.6 Zellkulturmedien.....	38
2.1.6.1 HUVEC-Medium.....	38
2.1.6.2 MonoMac6-Medium.....	38
2.2 Versuch am Tier.....	39
2.2.1 Operation.....	39
2.2.2 Postoperative Behandlung.....	41
2.2.3 Euthanasie und Färbung der Herzen.....	41
2.2.4 Konservieren der Herzen.....	42
2.3 Auswertung der Infarktgröße.....	42
2.4 Histologie.....	43
2.4.1 Herstellung der Objektträger.....	43
2.4.2 HE-Färbung.....	43
2.4.3 Kollagen-Färbung nach Masson-Goldner.....	44
2.4.4 Auswertung der Zelldichte im Infarktgebiet.....	45
2.4.5 Auswertung der myokardialen Fibrosefläche.....	45
2.5 Zellkultur.....	45
2.5.1 Kultur der monozytären Zelllinie MonoMac6.....	45
2.5.2 Kultur von Humanen Nabelvenen-Endothelzellen (HUVEC).....	47
2.6 Flusskammer.....	48
2.6.1 Vorbereitung der Deckgläschen.....	49

2.6.2 Inkubation und Aktivierung der Kulturzellen.....	49
2.6.2.1 Vorbereitung der Humanen Nabelvenen-Endothelzellen (HUVEC)....	50
2.6.2.2 Vorbereitung der MonoMac6-Zellen.....	50
2.6.3 Durchführung des Flusskammerversuchs.....	51
2.6.3.1 Aufbau, Anordnung.....	51
2.6.3.2 Ablauf der Versuchsreihe.....	52
2.6.3.3 Aufnahmemodus.....	53
2.6.4 Auswertung der Flusskammer mit MonoMac6.....	53
2.7 Statistik.....	54
3. Ergebnisse.....	55
3.1 <i>In-vivo</i> -Modell myokardialer Ischämie und Reperfusion.....	55
3.1.1 Infarktmorphologie von mit anti-CD147 behandelten Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion in einem therapeutischen Setting.....	55
3.1.1.1 Infarktgröße relativ zum Ischämiegebiet (Area at Risk).....	55
3.1.1.2 Zelldichte im Infarkt-Grenzgebiet.....	56
3.1.1.3 Fibrose im Infarkt-Grenzgebiet.....	59
3.1.2 Infarktmorphologie von mit anti-CD147 behandelten Mäusen 28 Tage nach Ischämie/Reperfusion in einem therapeutischen Setting.....	60
3.1.2.1 Infarktgröße relativ zum Ischämiegebiet (Area at Risk).....	60
3.1.2.2 Myokardiale Fibrosefläche relativ zur Gesamtfläche.....	61
3.2 Adhäsionsverhalten von MonoMac6-Zellen an stimulierten Endothelzellen unter Flussbedingungen <i>in vitro</i>	64
3.2.1 CyPA-induzierte Adhäsion.....	64
3.2.2 Einfluss des extrazellulären CyPA-Inhibitors MM284 auf die CyPA-indu- zierte Adhäsion.....	65
3.2.3 Einfluss einer Phosphoinositid-3-Kinase-Hemmung durch Ly294002 auf die CyPA-induzierte Adhäsion.....	67
3.2.4 Einfluss einer Phosphoinositid-3-Kinase-Hemmung durch Wortmannin auf die CyPA-induzierte Adhäsion.....	69
3.2.5 Vergleich der Inhibitoren MM284, Ly294002 und Wortmannin.....	71
4. Diskussion.....	75
4.1 Diskussion der angewandten Methoden.....	76

4.1.1 Tierversuche.....	76
4.1.1.1 Der Ischämie-Reperfusion-Versuch als <i>in-vivo</i> -Modell des Myokardinfarkts.....	76
4.1.1.2 Die Maus als Modelltier.....	77
4.1.1.3 Auswertung der Infarktgröße.....	78
4.1.1.4 Die HE-Färbung zur Bestimmung der Dichte einwandernder Zellen. .	78
4.1.1.5 Die Kollagen-Färbung nach Masson-Goldner zur Analyse der Fibrosefläche.....	79
4.1.2 <i>In-vitro</i> -Versuche an der Flusskammer.....	79
4.1.2.1 Humane Nabelvenen-Endothelzellen als Modell der arteriellen Gefäßwand.....	79
4.1.2.2 MonoMac6 als Modell der zirkulierenden Monozyten.....	80
4.1.2.3 Die Flusskammer als <i>in-vitro</i> -Modell der Monozyten-Endothel-Interaktion.....	81
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	82
4.2.1 Therapeutische CD147-Inhibition im Tiermodell des Herzinfarkts.....	82
4.2.1.1 Therapeutische CD147-Inhibition verringert die Infarktgröße nach Ischämie/Reperfusion.....	82
4.2.1.2 Therapeutische CD147-Inhibition vermindert die Zellinvasion 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion.....	83
4.2.2 Extrazelluläres Cyclophilin A induziert die endotheliale Adhäsion von monozytären Zellen.....	84
4.2.3 Die durch Cyclophilin A induzierte endotheliale Adhäsion von monozytären Zellen ist abhängig von der Phosphoinositid-3-Kinase.....	86
4.3 Limitationen der vorliegenden Studie.....	87
4.4 Schlussfolgerung.....	90
5.Zusammenfassung.....	93
6.Verzeichnisse.....	95
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	95
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	97
6.3 Literaturverzeichnis.....	98
7.Erklärung zum Eigenanteil.....	110

8.Danksagung.....	111
-------------------	-----

1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen sowohl wegen ihrer hohen Prävalenz als auch wegen der durch sie verursachten Gesundheitskosten weltweit eine bedeutende Herausforderung in der medizinischen Forschung und Versorgung dar.

Den Angaben des statistischen Bundesamtes zufolge war 2012 der akute Myokardinfarkt die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Er war für 6% der Todesfälle verantwortlich und wurde dabei nur von der chronisch-ischämischen Herzkrankheit (8%) übertroffen.¹ Zu dieser zählen laut ICD-10-GM u.a. der alte Myokardinfarkt und ätiologisch verwandte Krankheiten wie die atherosklerotische koronare Herzerkrankung.²

In Studien betrug die frühe Mortalität nach einem Herzinfarkt zwischen 6 und 14%, sodass dieser eine ernste Erkrankung darstellt.^{3,4} Darüber hinaus stehen bislang nur ungenügende Möglichkeiten zur Verfügung, um die chronischen Folgen zu verhindern. So kommt es infolge eines Myokardinfarktes häufig durch Umbauvorgänge (Remodelling) in der Extrazellulären Matrix zum Auftreten einer Herzinsuffizienz.^{5,6}

Bei einem Herzinfarkt kommt es zu einer Entzündungsreaktion des Myokards und zur Einwanderung von Immunzellen, welche den Umbauprozess stark beeinflussen. Eine wichtige Rolle scheinen hierbei das Zytokin Cyclophilin A (CyPA) und sein Rezeptor CD147 zu spielen. Untersuchungen der letzten Jahre geben Hinweise darauf, dass durch Eingriffe in deren Interaktion ein ungünstiges Remodelling verhindert und so die Herzfunktion nach einem Myokardinfarkt langfristig verbessert werden kann.⁷

Die vorliegende Arbeit soll darüber Aufschluss geben, ob ein solcher Eingriff in die CyPA-CD147-Interaktion auch dann erfolgreich sein kann, wenn er erst nach Beginn der Koronarokklusion durchgeführt wird. Da die monozytäre Reaktion für die Abheilung essentiell zu sein scheint,^{5,8} soll darüber hinaus insbesondere die Rolle von extrazellulärem CyPA bei der Invasion von Monozyten in das Infarktgewebe und die beteiligten intrazellulären Signalwege untersucht werden,

1.1 Myokardinfarkt

1.1.1 Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts

Ein akuter Myokardinfarkt liegt vor, wenn es durch den Verschluss von Koronararterien zur Nekrose von Herzmuskelzellen kommt.⁴ Dadurch kommt es zur insuffizienten Durchblutung des stromabwärts gelegenen Myokards.⁹ In der Folge gehen im betroffenen Gebiet minderversorgte Myokardzellen irreversibel unter.

Meistens ist die Ursache für einen Herzinfarkt ein plötzlicher Arterienverschluss durch Ruptur oder Erosion einer atherosklerotischen Plaque.^{5,9-11}

Beim akuten Herzinfarkt kommt es durch die Gewebeschädigung zum Funktionsausfall der betroffenen Kardiomyozyten. Dies kann Komplikationen wie kardiales Pumpversagen oder Herzrhythmusstörungen bis hin zum plötzlichen Herztod verursachen.^{4,12-14}

Andererseits kommt es zu einer Entzündungsreaktion mit einem Anstieg von Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , CRP) und Abwehrzellen (Neutrophile, Lymphozyten, Monozyten) im Blut.^{15,16} Diese Reaktion leitet die Wundheilung und den Ersatz des untergegangenen Gewebes ein.

Durch die ischämische Schädigung und die entzündliche Wundheilung entsteht eine veränderte Gewebestruktur. Diese ist gegenüber mechanischem Stress weniger belastbar, sodass es infolge eines Herzinfarkts subakut zur Ruptur der Ventrikelwand oder der Papillarmuskeln kommen kann.^{5,12,17-19}

1.1.2 Reperfusionstherapie und deren Komplikationen

Das Ziel in der aktuellen Therapie des akuten Herzinfarktes mit ST-Hebung (STEMI) stellt die frühestmögliche Reperfusion des verschlossenen Herzkranzgefäßes dar.⁴ Tatsächlich werden etwa zwei Drittel der Patienten mit STEMI einer primären Reperfusion zugeführt.³

Die frühe Reperfusion der okkludierten Arterie ist bei weitem die effektivste Methode, um die Infarktgröße zu reduzieren.²⁰⁻²³ Die Begrenzung der Infarktgröße ist maßgeblich, weil die Ausdehnung des Infarktes sowohl mit der Mortalität als auch mit der funktionellen Beeinträchtigung der Herzfunktion korreliert.²⁴⁻²⁶

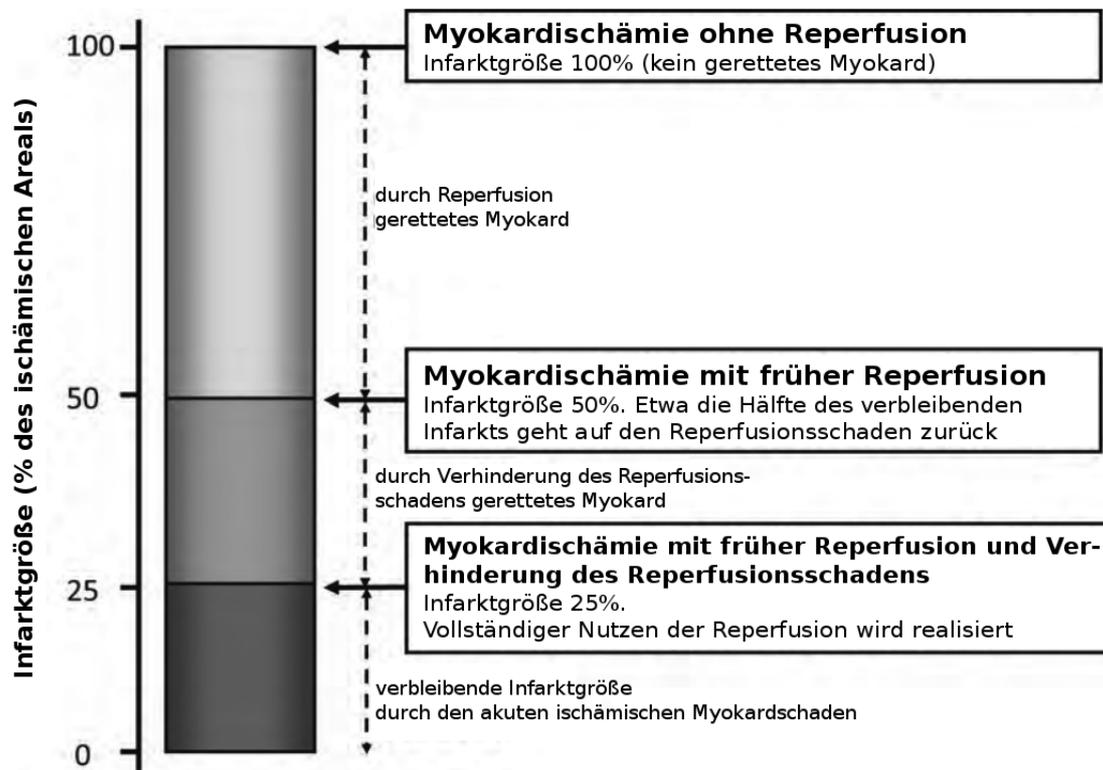


Abb. 1.1: Anteil des verhinderbaren Myokardschadens nach einem Herzinfarkt

Etwa die Hälfte der nach der Reperfusion verbleibenden Infarktgröße ist auf den Reperfusionsschaden zurückzuführen. Dieser Anteil wäre durch eine geeignete Therapie zur Verhinderung dieses Schadens vermutlich zu retten. Modifiziert nach Fröhlich et al.²⁷

Obwohl die Reperfusion die wichtigste Therapie eines Koronarverschlusses ist, kann durch die Wiedereröffnung des Gefäßes selbst ein Gewebeschaden (Reperfusionsschaden) verursacht werden. Es kann dabei u.a. zu Arrhythmien, transienter kontraktile Dysfunktion (myokardiales Stunning) oder zum Untergang von Myokardzellen kommen, welche die ischämische Phase vital überlebt haben.^{19,20,22,27-29} Paradoxe Weise ist es so möglich, dass die therapeutische Reperfusion zwar ischämisches Myokard rettet, jedoch gleichzeitig bei einem Teil des so geretteten Gewebes dessen Untergang induziert. Tierstudien deuten darauf hin, dass bis zu 50% der endgültigen Infarktgröße auf den Reperfusionsschaden zurückzuführen sind²⁰ (Abb. 1.1). Daher wurden Möglichkeiten gesucht, diesen zusätzlichen Schaden zu begrenzen. Einige Strategien wie die ischämische Postkonditionierung zeigen an Tieren einen deutlichen Nutzen. Dieser scheint durch die Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) vermittelt zu werden.³⁰ Die mPTP ist ein nicht-selektiver Kanal der inneren Mitochondrienmembran, der von Cyclophilin D reguliert wird. Dieser Kanal öffnet sich auf Reperfusion hin irreversibel, was zum

Untergang der Zelle führt. Durch die ischämische Postkonditionierung wird verhindert, dass die mPTP sich öffnet.³⁰ Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die intrazelluläre Signalübertragung bei der Kardioprotektion über den Weg der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) stattfindet.³¹

Trotz der Erfolge bei Versuchen an Tieren, zeigen klinische Therapiestudien enttäuschende Ergebnisse. So steht heute keine effektive Therapie zur Verhinderung des Reperfusionsschadens bei Myokardinfarkt zur Verfügung.^{20,27}

1.1.3 Pathophysiologie der Postinfarkt-Phase

In den Tagen und Wochen nach einem akuten Herzinfarkt gehen die pathophysiologischen Veränderungen im Gewebe – im Gegensatz zur Akutphase – nicht mehr von den Myokardzellen aus. Vielmehr wird die Postinfarkt-Phase von einer Entzündungsreaktion dominiert, bei der eingewanderte Immunzellen einerseits erwünschte und notwendige, andererseits aber auch ungünstige Umbauvorgänge bewirken. Während dieser Zeit werden nekrotische Herzmuskelzellen resorbiert und die Wunde in eine mechanisch belastbare Narbe umgewandelt.³²

1.1.3.1 Entzündungsreaktion

Die Entzündung ist die nicht-spezifische Reaktion des Immunsystems auf eine Gewebeschädigung. Dabei kommt es zur Freisetzung von Zytokinen und der Einwanderung von Immunzellen in das geschädigte Gewebe.³³

Zu Beginn der Entzündungsreaktion bestehen die ins Infarktgewebe einwandernden Zellen vor allem aus Neutrophilen Granulozyten, die schon nach einem Tag ihre maximale Anzahl erreichen. Danach dominieren monozytäre Zellen das Infiltrat und erreichen um den siebenten Tag ihr Maximum.^{5,17,34,35} Neutrophile und Monozyten eliminieren zu Beginn die nekrotischen oder absterbenden Zellen und bereiten so den Weg für die Wundheilung.⁵ Da die Neutrophilen nur im entzündeten Gewebe zu finden sind, solange die Phagozytose der Zelltrümmer andauert, scheinen sie, anders als Monozyten, in der folgenden Infarktheilung keine Rolle zu spielen.³⁶

Parallel zur zellulären Entzündungsreaktion findet eine Freisetzung von Zytokinen und

Chemokinen wie Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-2, IL-10, Tumornekrosefaktor α (TNF- α) oder Transforming Growth Factor β (TGF- β) statt.^{6,33,37} Ihre Effekte können zueinander gleichgerichtet oder gegensätzlich sein. So wirken IL-1 oder TNF- α proinflammatorisch und stimuliert die Infiltration von Leukozyten. IL-10 und TGF- β hingegen bewirken eine Eindämmung des Entzündungsprozesses.^{6,38} Das Expressionsmuster der verschiedenen Zytokine verändert sich im Verlauf der Entzündungs- und Abheilungsreaktion nach Myokardinfarkt. So wird gerade dem wechselnden Zusammenspiel der unterschiedlichen Zytokine eine bedeutende Funktion in der Entzündungsregulation zugeschrieben.^{37,39}

Die zelluläre und die humorale Entzündungsantwort können jedoch nicht getrennt betrachtet werden. Sie bedingen und beeinflussen sich vielmehr gegenseitig: Zytokine wie IL-1 oder das in dieser Studie untersuchte CyPA bewirken die Infiltration und Aktivierung von Leukozyten.^{6,40,41} Makrophagen und andere Immunzellen produzieren wiederum ihrerseits Zytokine, die die Entzündung unterhalten oder inhibieren.^{6,10,39,42-44}

1.1.3.2 Umstrukturierung des geschädigten Gewebes durch Matrix-Metalloproteinasen

In den ersten zwei Wochen nach dem Myokardinfarkt findet im Infarktgebiet ein hoher Umsatz an Zellen und Extrazellulärer Matrix statt. Präexistierendes Kollagen wird aufgelöst, abgestorbene Zellen beseitigt, neue Matrix wird angelegt.^{5,32,45,46} Die treibende Kraft hinter diesem Umbauprozesses der myokardialen Matrix sind die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs).^{45,47}

MMPs stellen eine Gruppe von proteolytischen Enzymen dar, die in ihrem aktiven Zentrum ein Zn²⁺-Ion tragen und durch ihre Proteinase-Aktivität die Zell-Matrix-Zusammensetzung regulieren.⁴⁸

Bei einem akuten Myokardinfarkt werden u.a. Membrane-Type-1-MMP (MT1-MMP) und MMP-9 vermehrt exprimiert. Nach abgeschlossener Narbenbildung fallen beide wieder auf ihr normales Niveau ab.^{49,50}

Besonders MMP-2, MMP-9 und MT1-MMP haben für die Migration von Leukozyten, speziell von Makrophagen, eine wichtige Bedeutung. Werden diese Enzyme im Myo-

kard gehemmt, so ist die Einwanderung von Immunzellen in das ischämische Gewebe deutlich reduziert.^{17,50-52} Interessant ist, dass andere Metalloproteinasen wie MMP-3 und MMP-12 keinen Einfluss auf die Leukozyten-Migration haben.¹⁷

Außer bei der Leukozyteninvasion haben MMPs auch bei dem eigentlichen Remodelling nach einem Herzinfarkt eine zentrale Funktion: Die Inhibition von MMP-2, MMP-9 oder MT1-MMP resultiert in einem signifikanten Überlebensvorteil, einer kleineren Infarktausdehnung und weniger Ventrikelrupturen sowie in einer besseren Pumpfunktion.^{50,51,53,54} Hervorzuheben ist, dass die beobachteten positiven Effekte bei MT1-MMP-Deprivation nicht auf veränderte Immunzellen, sondern auf interstitielle Eigenschaften des Myokards zurückzuführen sind.⁵⁰ Dies zeigt, dass MMPs auch unabhängig von ihrer Rolle in der Leukozyten-Migration eine gewichtige Funktion im Remodelling-Prozess erfüllen.

Über die erwähnten MMPs hinaus existieren mit MMP-1 und MMP-7 auch Metalloproteinasen, die keinen negativen Einfluss auf das Remodelling haben.⁵⁵

Matrix-Metalloproteinasen bewirken zusammenfassend eine Umstrukturierung des geschädigten Gewebes, die mit der Umwandlung von funktionellem Myokard in eine fibrotische, nicht kontraktile Narbe einhergeht. Eine ausgeprägte Fibrose nach einem Myokardinfarkt ist jedoch mit einer erhöhten Gewebesteifigkeit und der Entwicklung einer Herzinsuffizienz assoziiert.^{46,55,56}

1.1.4 Rolle der Monozyten in der Postinfarkt-Phase

In der vorliegenden Arbeit soll besonders auf die Rolle der Monozyten beim Herzinfarkt eingegangen werden. Monozyten gehören zum mononukleären Phagozytensystem, welches aus verschiedenen Differenzierungsstadien besteht. Monozyten entstehen im Knochenmark und werden ins periphere Blut freigegeben, wo sie für einige Tage zirkulieren. Schließlich wandern sie ins Gewebe ein und entwickeln sich dort zu Makrophagen oder Dendritischen Zellen.^{5,57} Monozyten und Makrophagen übernehmen als Zellen des Immunsystems nicht nur Aufgaben in der Erregerabwehr, sondern wirken auch an der Wundheilung und der kindlichen Entwicklung mit. Sie sezernieren Entzündungsmediatoren und Proteasen, phagozytieren zugrunde gegangene Zellen, fördern Angioge-

nese, Kollagensynthese und die Bildung von Reparaturenzymen.⁵

1.1.4.1 Monozyten-Subgruppen

Es hat sich gezeigt, dass die Monozyten nicht einheitlich vorliegen, sondern v.a. aus zwei Subpopulationen mit unterschiedlichen Eigenschaften bestehen. Humane CD14⁺CD16⁻-Monozyten („klassische Monozyten“) machen etwa 90% der Monozytenpopulation aus. Sie entsprechen murinen Ly6^{high}-Monozyten und haben vorwiegend proinflammatorische, phagozytische und proteolytische Funktion. Dagegen steigt der andere Teil der Population von humanen CD14^{low}CD16⁺-Monozyten („nicht-klassische Monozyten“) in bestimmten inflammatorischen Situationen an. Sie sind primär reparativ, fördern Wundheilung und Angiogenese und entsprechen den Ly6C^{low}-Monozyten der Maus.^{5,10,58–61}

Ebenso können Makrophagen in proinflammatorische M1-Makrophagen und antiinflammatorische M2-Makrophagen unterschieden werden. Dabei scheinen inflammatorische CD16⁻-Monozyten Vorläufer der M1-Makrophagen zu sein. M2-Makrophagen scheinen aus CD16⁺-Monozyten hervorzugehen.^{38,58}

1.1.4.2 Adhäsion und Transmigration von Monozyten

Damit die im Blut zirkulierenden Monozyten, zusammen mit anderen Immunzellen, ins Infarktgewebe einwandern und dort akkumulieren können, müssen sie die Blutgefäße verlassen.

Dabei kommt es in mehreren Schritten zum Rollen am Endothel, zur Aktivierung der beteiligten Zellen, zur festen Adhäsion und schließlich zur Transmigration durch die Endothelschicht.⁶² Dazu findet eine Interaktion mit dem aktivierten Endothel des Infarktgebiets statt. Dieser Kontakt geschieht über Adhäsionsmoleküle wie v.a. Selektine, Integrine, Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) und Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1).^{6,38,62,63}

Im physiologischen Zustand erlaubt das Endothel keine Leukozytenadhäsion.³⁸ Bei einem Infarkt jedoch werden, u.a. durch die Zytokine TNF- α und IL-4 vermittelt, auf der Oberfläche von Endothelzellen Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 exprimiert, um die Leukozyteninvasion zu fördern.^{64,65}

Neben der Transmigration durch das Endothel ist es wichtig, dass Monozyten sich im

Gewebe an dem Ort der stärksten Schädigung ausrichten und dort akkumulieren. Diesem Zweck dienen Chemotaxine, an deren Konzentrationsgefälle sich die Monozyten orientieren. Bedeutende Vertreter sind das Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), C5a des Komplementsystems, Fibronectin und nicht zuletzt das hier untersuchte CyPA.^{38,66,67}

1.1.4.3 Monozyteninvasion beim Herzinfarkt

In vitro induziert Infarkt-Myokard die Migration von Makrophagen.⁵¹ Damit vereinbar ist die Beobachtung, dass *in vivo* Makrophagen im gesunden Gewebe nur in geringer Zahl vorkommen, diese jedoch bei einem Infarkt stark zunimmt. Ihr Maximum haben Makrophagen/Monozyten dabei am siebenten Tag und fallen danach wieder ab.^{8,34,51} Auch in dem nicht vom Infarkt betroffenen Myokard ist – in schwächerem Ausmaß – die Expression von MCP-1 und MMPs erhöht und eine Monozyteninvasion zu sehen.⁶⁸

1.1.4.4 Myokardiales Remodelling durch Monozyten

Monozyten sind in der Lage, auf bestimmte Reize hin Metalloproteinasen zu exprimieren.^{49,67,69} Erhöhte Spiegel dieser MMPs nach einem Myokardinfarkt sind assoziiert mit einem ungünstigen Gewebeumbau.^{56,70} Die gravierenden Folgen einer solchen übermäßigen MMP-Expression durch Monozyten verdeutlichen Studien, die einen Zusammenhang bemerkten zwischen einer erhöhten Monozytenzahl und einer schlechten Prognose in Bezug auf die Pumpfunktion, die Ausbildung von Aneurysmen sowie das Eintreten kardialer Ereignisse.^{5,36,71,72}

Neben diesen unerwünschten Auswirkungen lässt sich jedoch auch nachweisen, dass infolge eines Herzinfarktes die Sekretion von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und TGF- β durch Monozyten und Makrophagen deutlich ansteigt.^{8,42} Beide Zytokine fördern die Bildung von Granulationsgewebe und die Angiogenese.^{8,73,74}

Der Gipfel der VEGF-Produktion liegt um den 14. Tag nach Infarkt,⁴² sodass die monozytäre Zytokinproduktion in der Abheilungsphase von Bedeutung zu sein scheint. Vermutlich kommt den monozytären Zellen auf diese Weise eine Schlüsselrolle beim Übergang der Entzündungs- in die Reparaturphase zu.⁵³

Vereinbar mit einer solchen Regulatorfunktion konnte gezeigt werden, dass eine Deple-

tion der zirkulierenden Monozyten in der ersten Woche nach Infarkt ungünstige Auswirkungen auf die Heilung hat. Es wurden dabei nicht nur verminderte Spiegel von VEGF und TGF- β festgestellt, sondern auch eine geringere Neovaskularisation und weniger Granulationsgewebe. Schließlich resultierte eine Narbe mit niedrigerem Kollagen-Gehalt, eine stärkere Dilatation des linken Ventrikels und eine erhöhte Mortalität.⁸

Es existieren also gegensätzliche Studienergebnisse über den Zusammenhang von Monozytenzahl und Infarkt-Komplikationen. Nahrendorf et al. schlagen zur Erklärung dieser Diskrepanz einen parabelförmigen Zusammenhang zwischen der Zahl inflammatorischer Monozyten und der Qualität der Infarktheilung vor. Zu wenige Monozyten zeigen demzufolge durch zu wenig Remodelling ebenso eine insuffiziente Heilung wie zu viele Monozyten mit einer exzessiven Entzündungsreaktion.⁵

1.1.5 Phasen der Wundheilungsreaktion nach Myokardinfarkt

Obwohl jede Entzündung nach einem Infarkt potentiell schädlich ist, da sie weiteres Gewebe zerstören kann,^{5,6,10} ist eine adäquate Inflammation unabdingbare Voraussetzung für eine suffiziente Wundheilung.³⁴

Die Vorgänge im postischämischen Myokard lassen vermuten, dass mehrere Heilungsphasen existieren (Abb. 1.2). Initial dominiert demnach eine Entzündungsreaktion mit proinflammatorischen Zytokinen und Mechanismen zur Beseitigung toter Zellen. Daran schließt sich überlappend ein zweites Intervall an, in welchem Reparaturvorgänge und die Narbenbildung im Vordergrund stehen.^{75,76}

Hinweise auf die Existenz verschiedener Phasen ergeben sich auch, wenn man die Monozyten-Subpopulationen (vgl. Kapitel 1.1.4.1) im Verlauf der Postinfarkt-Periode betrachtet: In einer ersten Phase (Tag 1-4) kommt es zum Anstieg vornehmlich proinflammatorischer Monozyten (Ly-6C^{high} bzw. CD16⁻). Ab dem fünften Tag steigt dagegen die Zahl und Rekrutierung von reparativen Monozyten an (Ly-6C^{low} bzw. CD16⁺).^{34,60}

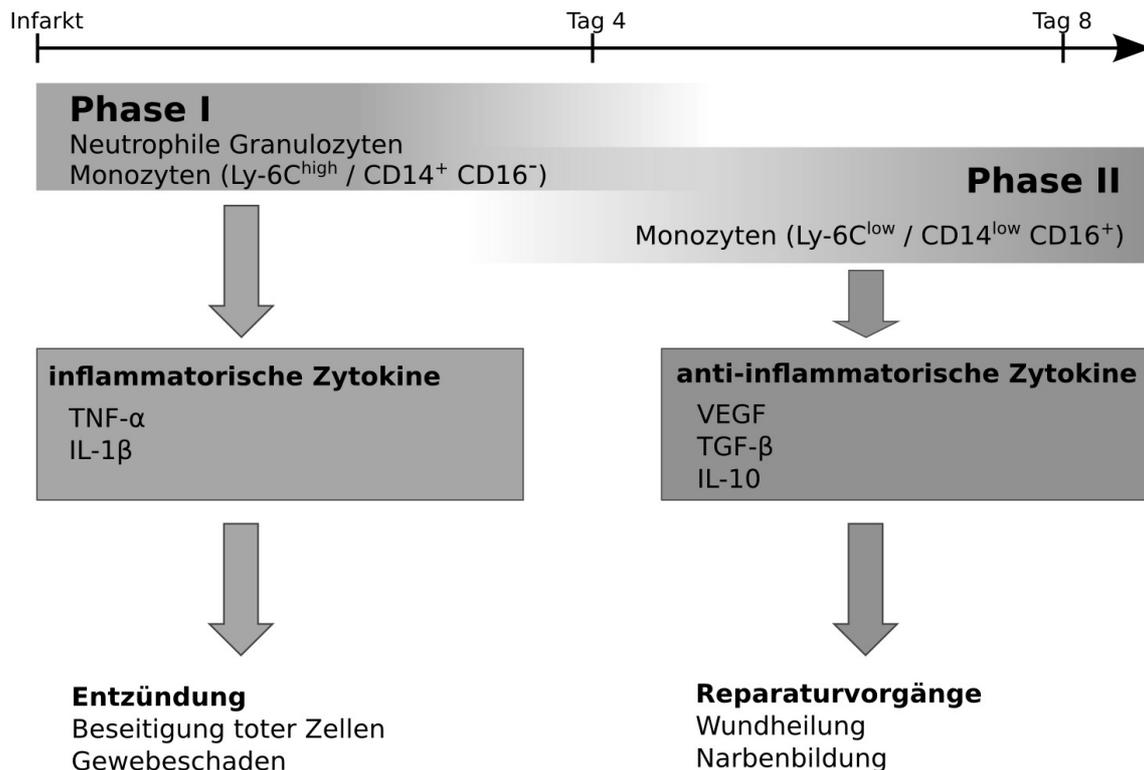


Abb. 1.2: Vereinfachte Darstellung der Phasen einer Wundheilungsreaktion

Mit dem Infarkt beginnt eine erste Phase, die von proinflammatorischen Immunzellen und Zytokinen dominiert wird und potentiell weiteren Gewebeschaden verursachen kann. Etwa ab dem vierten Tag nach dem Infarkt beginnt überlappend eine zweite Phase, bei welcher entzündungshemmende Monozyten und Zytokine im Vordergrund stehen. Dabei finden Reparaturvorgänge statt, die in eine Narbenbildung münden.

IL: Interleukin; TGF- β : Transforming Growth Factor β ; TNF- α : Tumornekrosefaktor α ; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

Die Spitzenspiegel der entzündungsfördernden CD16⁻-Monozyten korrelieren nach einem Myokardinfarkt mit einer langfristig schlechteren kardialen Pumpfunktion.⁶⁰ Dementsprechend wird die Infarktgröße deutlich reduziert, wenn im Mausmodell proinflammatorische Ly-6C^{high}-Monozyten an der Invasion gehindert werden.⁷⁷

Dies lässt vermuten, dass besonders die erste, entzündliche Phase schädlich und allein die reparative Phase günstig sei. Tatsächlich jedoch entwickelt sich in der zweiten Phase kein reguläres Granulationsgewebe, wenn die Monozyten in der ersten Phase depletiert werden.³⁴ Eine vollständige Unterdrückung der inflammatorischen Monozyten-Reaktion scheint daher einer optimalen Wundheilung abträglich zu sein.³⁴ Auf lange Sicht kann folglich sowohl eine ausgedehnte Entzündungsantwort als auch eine schlechte Wundheilung zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz mit schlechter Prognose führen.^{5,47}

Zusätzlich ist zu bedenken, dass ApoE^{-/-}-Mäuse, die als Atherosklerose-Modell dienen, eine Monozytose von Ly6C^{high}-Zellen aufweisen.⁵⁸ Nach einem Myokardinfarkt sind bei jenen Mäusen gerade diese proinflammatorischen Monozyten im Myokard vermehrt. Im Verlauf ist eine beeinträchtigte Narbenbildung und verschlechterte Herzfunktion zu beobachten. Dies ist vereinbar mit einer durch diese entzündungsfördernden Monozyten verstärkten Inflammationsphase.^{34,78}

Da beim Menschen akute Koronarverschlüsse in den meisten Fällen auf dem Boden einer Atherosklerose entstehen, erscheint es lohnenswert, gerade die monozytäre Invasion und deren Regulation in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen.

Die verschiedenen Heilungsphasen sind bei einer möglichen Therapie zu berücksichtigen. So kann der Erfolg bei der Beeinflussung des Gewebeumbaus davon abhängen, zu welchem Zeitpunkt die Behandlung ansetzt und welche Phasen erfasst, verhindert oder gefördert werden.^{75,79} Gestützt wird diese Vermutung dadurch, dass in Studien entzündungsfördernde Zytokine in der frühen Phase protektive Effekte zeigen, jedoch bei langfristiger Erhöhung verheerende Folgen haben.⁷⁶

Vor allem der Balance zwischen der Entzündungs- und Reparaturphase kommt so eine große Bedeutung für zukünftige Therapieansätze zu.³⁴

1.2 Cyclophilin A

Cyclophiline wurden 1984 als zytosolische Bindepartner des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA) entdeckt.⁸⁰ Es handelt sich dabei um ubiquitäre intrazelluläre Proteine der Immunophilin-Familie.⁸¹ Darüber hinaus gilt Cyclophilin inzwischen als extrazelluläres proinflammatorisches Zytokin.^{40,82}

Cyclophilin besitzt als Enzym eine Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase-Aktivität (PPIase) und fungiert so als Chaperon. Des Weiteren reguliert es die Faltung und den intrazellulären Transport von Proteinen.^{81,83,84}

1.2.1 Cyclophiline als Zielstruktur des Cyclosporin A

Nachdem Cyclophiline zuerst als Zielstruktur von CsA entdeckt wurden, ist inzwischen bekannt, dass CsA seine immunsuppressive Wirkung entfaltet, indem es einen Komplex

mit Cyclophilin bildet. Dabei wird dessen Signalübertragung und PPIase-Aktivität blockiert.^{80,85,86}

Wie in Kapitel 1.2.3 dargestellt wird, kommen Cyclophiline in einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen vor. Daher wurden für Forschung und Therapie verschiedene CsA-Derivate entwickelt. Das CsA-Derivat NIM811 bspw. bindet Cyclophilin, hat jedoch keine immunsuppressive Wirkung. So konnte gezeigt werden, dass einige Wirkungen von CsA nicht auf der dadurch ausgelösten Immunsuppression beruhen.⁸⁷

In der vorliegenden Arbeit wird MM284/6 verwendet, ein CsA-Derivat, welches nicht in die Zelle eindringen kann. Es stellt also einen ausschließlich extrazellulär wirksamen Inhibitor von CyPA ohne immunsuppressive Wirkung dar.^{88,89}

1.2.2 Struktur von Cyclophilin A

Die beiden meistbeachteten Unterformen sind Cyclophilin A (CyPA) und Cyclophilin B (CyPB). CyPA ist das häufigste menschliche Cyclophilin und befindet sich v.a. im Zytoplasma, teils assoziiert mit dem Golgi-Apparat. CyPB befindet sich im Endoplasmatischen Retikulum und ist physiologischerweise in geringer Konzentration im Serum und der Muttermilch vorhanden.^{84,90,91}

In dieser Arbeit soll CyPA näher betrachtet werden. Dieses ist bei gesunden Menschen im Blut nicht nachweisbar.⁹⁰ Es besitzt eine molekulare Masse von ca. 18 kDa⁸⁴ und besteht an seinem aktiven Zentrum aus einer hydrophoben Prolin-bindenden Tasche sowie einer polaren Tasche, die beide durch einen engen Kanal verbunden sind.⁹²

1.2.3 Funktion und Vorkommen *in vivo*

CyPA ist an zahlreichen pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Besonders bei entzündlichen Veränderungen scheint es eine wichtige Rolle zu spielen.

Die Vermutung liegt nahe, dass CyPA als intrazelluläres Protein bei Krankheitsprozessen durch absterbende Zellen freigesetzt wird. Tatsächlich aber zeigen Patienten mit Hämolyse keine erhöhte CyP-Konzentration. Inzwischen ist bekannt, dass CyPA über einen vesikulären Transportmechanismus aktiv sezerniert wird.^{90,93,94}

Die Sekretion von Cyclophilin aus Makrophagen wird u.a. durch das LPS gram-negati-

ver Bakterien stimuliert.⁴⁰ In Übereinstimmung dazu werden bei schwerer Sepsis erhöhte CyPA- und -B-Spiegel im Blut gemessen und sind mit hoher Mortalität verbunden. Schwerkranke Patienten ohne Sepsis zeigten dagegen keine erhöhte CyP-Aktivität.⁹⁰ Seine Eigenschaft als Entzündungsmarker wird dadurch verdeutlicht, dass die CyPA-Expression bei inflammatorischer Kardiomyopathie erhöht ist, bei nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie hingegen nicht.⁹⁵ Auch bei Rheumatoider Arthritis ist in der Synovialflüssigkeit eines betroffenen Gelenks der CyPA-Spiegel erhöht und korreliert sogar mit der Schwere der Erkrankung sowie der Zellzahl im zellulären Infiltrat.^{93,96,97} Bei dem lediglich degenerativen, nicht-entzündlichen Prozess der Arthrose hingegen ist CyPA nicht erhöht.⁹³ Auch bei entzündlichen Lungenerkrankungen findet ein Anstieg des extrazellulären Cyclophilins statt. Besonders CyPA zeigt dabei einen frühen Anstieg und kann dadurch zur initialen Rekrutierung von Leukozyten ins Entzündungsgewebe beitragen.^{39,43,98,99}

Weiterhin wird CyPA von glatten Gefäßmuskelzellen als Reaktion auf oxidativen Stress hin ausgeschüttet.¹⁰⁰ Gerade extrazelluläres CyPA kann jedoch in diesen Zellen auch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies induzieren.¹⁰¹ Andererseits ist von Neuronen bekannt, dass sie durch CyPA in Verbindung mit CD147 vor oxidativem Stress und Ischämie geschützt werden.⁹⁶ Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass die CyPA-Expression in der Haut mit dem Alter zunimmt.⁹¹

Da viele Effekte von CyPA auf der Interaktion mit dessen Rezeptor CD147 beruhen, werden weitere Eigenschaften und Funktionen wie die MMP-Induktion in Kapitel 1.4 (Rolle der Cyclophilin A-CD147-Interaktion) näher beschrieben.

1.3 CD147 – Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN)

CD147 ist ein Glykoprotein, welches zur Superfamilie der Immunglobuline gehört.^{102,103} Es wurde ursprünglich als ein von Krebszellen sezernierter Faktor entdeckt, der Fibroblasten zur Sekretion von MMPs anregt.¹⁰⁴ Daher wurde CD147 zuerst als Tumor Cell-derived Collagenase Stimulatory Factor bezeichnet, dann aber in Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) umbenannt.¹⁰⁵ Inzwischen ist bekannt, dass

CD147 nicht nur auf Tumorzellen vorkommt, sondern in viele weitere Vorgänge im Organismus involviert ist.⁹⁶ Eine bedeutende Funktion erfüllt es als Rezeptor für extrazelluläres CyPA.¹⁰⁶

CD147 ist in unterschiedlichen Spezies identifiziert worden und trägt dort teilweise eigene Namen: M6 (Mensch), Basigin oder gp42 (Maus), HT7 oder Neurothelin (Huhn), OX-47 oder CE9 (Ratte).^{102,107}

1.3.1 Struktur von CD147

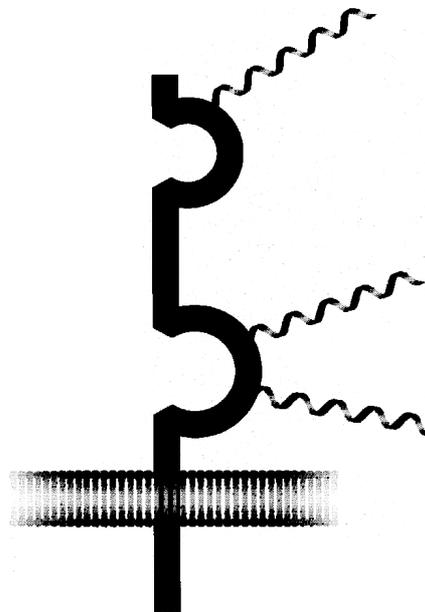


Abb. 1.3: Strukturmodell von CD147

Die Schleifen symbolisieren die Immunglobulin-ähnlichen Domänen, die Spiralen stellen gebundene Oligosaccharide dar. Abbildung aus Muramatsu und Miyauchi¹⁹⁸

EMMPRIN ist ein integrales Membranprotein.¹⁰² Seine extrazelluläre Region enthält je nach Isoform zwei oder – seltener – eine Immunglobulin-ähnliche Domäne^{102,105,108} (Abb. 1.3) und hat eine starke Homologie mit der Ig-V-Domäne des MHC-II-Antigens.¹⁰³

Humanes CD147 besteht aus 269 Aminosäuren(AS). Es setzt sich zusammen aus einer extrazellulären Domäne (185 AS), einer Transmembrandomäne (24 AS) und einer carboxy-terminalen zytoplasmatischen Domäne mit 39 AS.¹⁰⁵

Vergleicht man die AS-Sequenz der Spezieshomologa, zeigt sich ein hoch konservierter

Abschnitt, der fast die gesamte Transmembrandomäne einschließt. Dies lässt auf eine essentielle Bedeutung dieser Region für die Funktion von CD147 schließen.¹⁰²

Abhängig vom Grad seiner Glykosylierung hat CD147 eine Größe von 35-65kDa.¹⁰² Durch die Glykosylierung kann vermutlich die Funktion des Proteins reguliert werden,⁹⁶ da deglykosyliertes CD147 keine MMP-Sekretion induziert.¹⁰⁹

1.3.2 Funktion und Vorkommen *in vivo*

CD147 ist als Membranprotein auf der Oberfläche verschiedener Zellen lokalisiert. Bspw. tragen Leukozyten, Thrombozyten, Kardiomyozyten oder Fibroblasten EMMPRIN. Oft wird die Expression von CD147 durch Aktivierung, Stimulation oder Differenzierung der Zellen gesteigert.^{39,44,95,96,98,110-114} Auch EMMPRIN selbst steigert im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus seine eigene Expression.¹¹⁵

U.a. bei mehreren Krebsarten wurde beobachtet, dass CD147 nicht nur membrangebunden vorkommt, sondern auch in einer löslichen Form freigesetzt wird, sodass an entfernten Orten die MMP-Sekretion stimuliert werden kann.^{104,108,115}

1.3.2.1 CD147 als Rezeptor der Cyclophiline

EMMPRIN fungiert als Rezeptor für extrazelluläres CyPA und CyPB. Als solcher vermittelt CD147 u.a. Zellmigration und MMP-Induktion^{106,116,117} (siehe Kapitel 1.4, Rolle der Cyclophilin A-CD147-Interaktion). Bemerkenswert ist, dass in manchen Zellreihen CyPA die Expression seines Rezeptors CD147 stimuliert.⁶⁹

CD147 scheint jedoch nicht der einzige Rezeptor von Cyclophilinen zu sein, da manche CyP-induzierte Wirkungen durch eine Blockade von CD147 nicht gehemmt werden. Dies erscheint umso plausibler, als für andere Zytokine ebenfalls mehrere Rezeptoren bekannt sind.^{67,69,91} Umgekehrt werden auf manchen Zellen durch CyP typische Effekte wie Chemotaxis nicht induziert, obwohl CD147 als Rezeptor vorhanden ist.⁹⁸ Das weist darauf hin, dass die Interaktion von Cyclophilinen und CD147 nicht exklusiv ist und beide Moleküle jeweils noch andere Interaktionspartner haben (siehe Kapitel 1.3.2.2, Assoziation von CD147 mit anderen Proteinen).

Als spezifische Zielregion des CyP auf CD147 wurde das extrazelluläre Pro211 identifiziert, welches nahe der Transmembranregion liegt.^{108,118,119} Die Affinität von CyPA und

CD147 ist jedoch nur relativ schwach ausgeprägt.¹⁰⁸

Obwohl in vielen Fällen CD147 für die Signaltransduktion von CyPA und CyPB benötigt wird, ist die Signalweitergabe hierbei abhängig von Heparanen. Diese scheinen CyP spezifisch zu binden und dessen primäre Rezeptoren an der Zelloberfläche zu sein.^{81,96,117,120,121} Allerdings konnte gezeigt werden, dass bei einer hohen Konzentration von CyPA Heparane für die Signaltransduktion über CD147 nicht zwingend benötigt werden.¹⁰⁶ Es ist vorstellbar, dass die CyP-Heparan-Interaktion die nachfolgende Bindung von CyP an CD147 erleichtert, wie es in ähnlicher Form bei anderen Chemokinen vorkommt.^{116,122}

Da das aktive Zentrum von CyPA sich mit dessen Bindungsstelle für CD147 überschneidet, ist es schwierig, zu differenzieren, ob die enzymatische Aktivität von CyPA für die Signalübertragung via CD147 erforderlich ist. Hinweise deuten darauf hin, dass zumindest bestimmte Effekte von extrazellulärem CyPA wie bspw. die Leukozyten-Chemotaxis nicht dessen PPIase-Aktivität bedürfen.^{69,85}

1.3.2.2 Assoziation von CD147 mit anderen Proteinen

Neben seiner Funktion als CyP-Rezeptor ist EMMPRIN mit einer Reihe weiterer Proteine assoziiert.^{81,96} CD147 ist sowohl sein eigener Rezeptor als auch Rezeptor für Integrine oder Syndecan-1. Es existieren also zusätzlich zu den CyP-abhängigen Funktionen von CD147 solche, die unabhängig von Cyclophilinen sind.¹⁰⁸

CD147 kommt assoziiert mit den Monocarboxylat-Transportern MCT-1 und -4 vor, wobei diese Verbindung wichtig ist für den Transport beider Proteine an die Zelloberfläche.^{81,123} Von aggressiven Tumorzellen, ischämischen Zellen oder in der embryonalen Herzentwicklung wird die Expression von CD147 und MCT hochreguliert.^{96,124,125}

Eine weitere Assoziation von CD147 existiert mit Caveolin-1, welches an vielen zellulären Vorgängen beteiligt ist.^{96,126} Caveolin-1 wirkt dabei als negativer Regulator für das Clustering von CD147 an der Zelloberfläche und könnte so dessen Aktivität verringern.¹²⁷

Schließlich kann EMMPRIN gemeinsam mit den Integrinen $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$ vorkommen, welche mit den Lamininen der Extrazellulären Matrix interagieren.¹²⁸ Dadurch

können zelluläre Anhaftung, Chemotaxis, fetale Entwicklung und maligne Prozesse beeinflusst werden.^{96,129}

Darüber hinaus kommt es zu Interaktionen zwischen CD147-Molekülen selbst. Auf diese Weise werden bspw. Thrombozyten aktiviert und deren Degranulation bewirkt⁴⁴ oder die Produktion von MMPs induziert.¹⁰⁹

Außerdem wirkt EMMPRIN über homophile Interaktion und als Bindepartner für thrombozytäres Glykoprotein VI (GPVI) im Sinne eines Adhäsionsrezeptors. CD147 vermittelt so das Rollen von aktivierten Thrombozyten¹³⁰ und ist an der Thrombozyten-Monozyten-Adhäsion beteiligt.¹³¹ Als Adhäsionsmolekül auf Erythrozyten ist CD147 in der Milz maßgeblich für die Rezirkulation.^{132,133} Eine Interaktion von CD147 mit VCAM konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.¹⁰⁹

1.3.2.3 Auswirkungen einer CD147-Defizienz

Erfahrungen mit CD147-defizienten Mäusen zeigen, dass EMMPRIN an weiteren Stellen im Organismus elementare Aufgaben erfüllt. Ohne CD147 sind MCT-1, -3 und -4 im retinalen Pigmentepithel nicht vorhanden, was zur Degeneration von Photorezeptoren führt und die Blindheit solcher Versuchstiere erklären könnte.^{134,135} Auch die embryonale Implantation ins Endometrium und die Spermatogenese ist bei CD147-Defizienz stark beeinträchtigt.¹³⁶ CD147-defiziente Mäuse zeigen darüber hinaus neurologische Auffälligkeiten, die charakteristisch für Alzheimer sind.^{96,137}

EMMPRIN kommt also auch über seine Rolle in Entzündungsprozessen hinaus an zentralen Stellen im Organismus vor. Daher gilt es, vor einer möglichen klinischen Anwendung sorgfältig die potentiellen Nebenwirkungen einer CD147-Inhibition zu erforschen.

1.4 Rolle der Cyclophilin A-CD147-Interaktion

Es gibt sowohl CD147-Funktionen, die unabhängig von CyP sind, als auch umgekehrt CyP-Funktionen, die nicht auf CD147 angewiesen sind. Nachdem diese bereits in den vorigen Kapiteln in verschiedenen Kontexten erwähnt wurden, sollen im Folgenden besonders diejenigen Effekte beschrieben werden, die aus einem Zusammenspiel beider Proteine miteinander resultieren.

1.4.1 Leukozytenmigration

Zuerst ist die Induktion von leukozytärer Chemotaxis und Migration zu nennen. Cyclophilin wirkt auf Monozyten, Neutrophile, Eosinophile und aktivierte CD4⁺ T-Zellen chemotaktisch.^{40,99,117} Die Migration dieser Zellen auf CyP hin ist abhängig von EMMPRIN und wird durch Antikörper gegen CD147 gehemmt.^{39,97,98,106} Verantwortlich für die chemotaktische Wirkung ist extrazelluläres CyPA, dessen Effekt unabhängig von intrazellulärem CyPA ist.^{43,138}

Bei Pathologien wie der infektiösen Myokarditis oder dem Myokardinfarkt werden CyPA und CD147 vermehrt exprimiert und scheinen für eine effektive Rekrutierung von Immunzellen notwendig zu sein.^{66,96–98,138}

Mehrere Versuche haben gezeigt, dass die in dieser Arbeit untersuchte CyPA-induzierte Migration der Monozyten und Makrophagen von CD147 abhängig ist.^{66,67,112} Dabei wurde sowohl die Adhäsion an die Extrazelluläre Matrix¹¹² als auch das Rollen und die Adhäsion an Endothel⁶⁶ untersucht. Es ist hierbei hervorzuheben, dass CyPA über EMMPRIN *in vitro* v.a. Makrophagen und kaum Monozyten zur Migration stimuliert.¹¹² Analog dazu wird die Chemotaxis bei CD4⁺ T-Zellen besonders dann induziert, wenn diese aktiviert sind.⁹⁸ Eine Erklärung dafür kann die gesteigerte Expression von CD147 auf differenzierten bzw. aktivierten Zellen bieten (siehe Kapitel 1.3.2).

1.4.2 Wundheilung und Stimulation der Matrix-Metalloproteinase-Sekretion

Sind Leukozyten in entzündetes Gewebe eingewandert, spielt die CyP-CD147-Interaktion eine wichtige Rolle in dem durch die Immunzellen bewirkten Umbau der Extrazellulären Matrix. Deshalb wurde vorgeschlagen, CD147 als Zeichen für myokardiales Remodelling anzusehen.⁹⁵

Wie in Kapitel 1.1.3.2 dargestellt, sind für dieses Gewebe-Remodelling Metalloproteinasen essentiell. Es ist dabei von Bedeutung, dass die Produktion solcher MMPs wie MT1-MMP, MMP-2 oder MMP-9 von löslichem CD147 induziert wird. Die Produktion des MMP-Inhibitors TIMP hingegen wird von EMMPRIN nicht beeinflusst.^{49,81,104,109,111,115,139–142}

Es ist wahrscheinlich, dass CyPA und CD147 dabei auf verschiedenen Zelltypen und in

unterschiedlichen Milieus eine differenzierte MMP-Expression hervorrufen.^{67,69,101,138}

Charakteristisch für den allgemeinen Wundheilungsprozess ist außerdem die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Ein wesentlicher Induktor dieser Umwandlung ist das Zytokin TGF- β , dessen Effekt auf die Differenzierung durch CD147 vermittelt wird.^{110,111} Monozytäre Zellen exprimieren sowohl TGF- β als auch CD147.^{8,111} Dies macht erneut die regulatorische Funktion von Monozyten in der Infarktheilung deutlich.

1.4.3 Rolle von Cyclophilin A und CD147 beim Myokardinfarkt

Ein akuter Myokardinfarkt stellt eine Schädigung myokardialer Zellen dar. Als solche bewirkt er die Freisetzung von Zytokinen und die Auslösung einer Entzündungsreaktion, welche in eine Wundheilung übergeht. Bei all diesen Vorgängen sind Cyclophilin und CD147 beteiligt.

Beide Moleküle werden nach einem Infarkt im Myokard vermehrt exprimiert.^{66,143–145} CD147 ist dabei besonders auf Kardiomyozyten lokalisiert, CyPA findet sich v.a. an infiltrierenden Makrophagen und Neutrophilen.⁶⁶ Jedoch drückt dies nur eine quantitative Verteilung aus. In geringerem Ausmaß wird CyPA auch von Myokardzellen¹⁴³ und CD147 von zirkulierenden Monozyten exprimiert,⁴⁹ sodass sowohl CyPA als auch CD147 bei einem Herzinfarkt in mehreren Zellarten hochreguliert werden.

Vereinbar mit dem Anstieg von CyPA und CD147 und ihrer Fähigkeit zur MMP-Induktion wird beim Myokardinfarkt eine gesteigerte Aktivität von MT1-MMP und MMP-9 beobachtet.^{45,49,50,145} Entsprechend der chemotaktischen Wirkung von CyPA und CD147 sind bei einem Herzinfarkt ausgeprägte Infiltrate von Leukozyten vorhanden.^{5,17}

Experimentell konnte gezeigt werden, dass eine Unterbrechung der CyPA-CD147-Interaktion beim Herzinfarkt sowohl die Leukozyten-Infiltration als auch die Infarktgröße reduziert (vgl. Kapitel 1.5).

1.4.4 Cyclophilin A und CD147 in der Pathophysiologie inflammatorischer, maligner und infektiöser Erkrankungen

Zusätzlich zu den bereits erwähnten Funktionen kommt Cyclophilin und CD147 in zahlreichen weiteren Krankheitsprozessen eine Rolle zu.⁹⁶

Außer bei akuten ischämischen Ereignissen spielen CyPA und CD147 auch bei einer zugrundeliegenden chronisch-entzündlichen Atherosklerose eine elementare Rolle.^{7,82,114,142}

So wird die Expression beider Proteine in der Differenzierung von Schaumzellen deutlich gesteigert. Dadurch werden CD147-abhängig Metalloproteinasen induziert.¹⁴² Diese wiederum begünstigen die Erosion und die Ruptur einer atherosklerotischen Plaque,^{114,146} welche häufig Auslöser eines Myokardinfarktes ist.⁹

Nachdem EMMPRIN zuerst mithilfe von Krebszellen entdeckt wurde, ist inzwischen bekannt, dass viele Krebsarten eine Überexpression von CD147, aber auch von CyPA zeigen. Beide scheinen mit der Invasivität und Metastasierungsfähigkeit verbunden zu sein.^{91,96,111,141,147}

Darüber hinaus ist CyPA in den Lebenszyklus vieler Viren eingebunden und reguliert die Replikation von Influenza- und Hepatitis-C-Viren.^{148,149} Auch für die Integration von HIV-DNA ins Wirtsgenom scheint CyP eine Rolle zu spielen,¹⁵⁰ wobei eine Interaktion von CyPA und CD147 sowie Heparanen den Eintritt von HIV-1 in die Wirtszelle reguliert.^{116,120,148}

1.4.5 Intrazelluläre Signalwege von Cyclophilin A / CD147

Die von extrazellulärem CyPA und CD147 bewirkten Effekte in verschiedenen Zellarten werden nicht von CD147 direkt vermittelt, sondern über intrazelluläre Signalkaskaden fortgeleitet.

Das Signalling kann abhängig von der Zellart die Aktivierung von PI3K, MAP-Kinasen (ERK1/2, JNK, p38), IKK und NFκB bewirken.^{7,44,67,69,106,111,112,117,143} Verschiedene Zellreihen reagieren dabei über unterschiedliche, oft redundante Signalwege auf extrazelluläres CyPA: Die MMP-9-Induktion durch CD147 wurde in verschiedenen Studien als abhängig von der ERK- und JNK-Aktivierung beschrieben, sie schien jedoch unabhängig von p38 zu sein.^{67,112} An anderer Stelle aber zeigte sich die MMP-Induktion bei Fibroblasten zumindest teilweise über MAPK-p38-Signalwege reguliert.¹¹¹ In Monozy-

ten scheint der IKK-Pathway an der MMP-9-Expression beteiligt zu sein.⁴⁴

Trotz dieser Unterschiede in der intrazellulären Signalübertragung reagierten alle getesteten Zellen mit einer Aktivierung von NFκB,⁶⁹ sodass durch CyPA in jedem Fall ein breiter Entzündungsprozess angestoßen wird.⁴⁴

1.4.5.1 Der Phosphoinositid-3-Kinase-Akt-Signalweg

Um therapeutisch an der CyPA-CD147-Interaktion angreifen zu können, ist eine genauere Kenntnis der Signalwege notwendig. In der vorliegenden Studie soll insbesondere der bei der Ischämie und Reperfusion wichtige Phosphoinositid-3-Kinase(PI3K)-Akt-Signalweg¹⁵¹⁻¹⁵³ in Bezug auf die Monozytenadhäsion im Fokus stehen.

Die PI3K ist ein aus zwei Untereinheiten bestehendes Protein. Sie bewirkt über die Phosphorylierung von membranären Inositol-Lipiden und die nachfolgende Aktivierung des Akt-Signalwegs vielfältige Veränderungen von Metabolismus, Wachstum, Überleben und der Bewegung von Zellen.^{154,155} Es ist eine Unterteilung in mehrere Klassen möglich, deren Expression sich gegenseitig beeinflusst und ein komplexes Zusammenspiel untereinander vermuten lässt.¹⁵⁶

Generell wird der PI3K-Pathway als antiapoptotisch und entzündungsbegrenzend angesehen. Jedoch wurden die Subklassen PI3K-γ und -δ als proinflammatorisch charakterisiert.^{153,155} Von hämatopoetischen Zellen werden vorherrschend diese beiden Formen exprimiert. Aus Versuchen mit Knock-out-Mäusen ist bekannt, dass beide eine tragende Rolle in der Immunantwort auf Infekte spielen.¹⁵⁷

Bei reperfundierten Herzinfarkten lässt sich durch Inhibition von PI3K-γ und -δ die Infarktgröße vermindern und die Herzfunktion verbessern.¹⁵³ Auch die Inhibierung von PI3K-γ alleine führt zu einem günstigeren Remodelling.¹⁵¹

Allerdings bedarf die Rolle in der Leukozyten-Chemotaxis weiterer Beachtung: So hat die Hemmung von PI3K-γ und -δ keinen Einfluss auf die inflammatorischen Infiltrate, wenn die Inhibitoren erst nach der Reperfusion verabreicht werden.¹⁵³ PI3K-γ-defiziente Mäuse hingegen zeigen eine stark beeinträchtigte Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten auf verschiedene Chemokine hin.¹⁵⁸ Auch die unselektive Inhibition aller PI3K-Isoformen vermindert die Adhäsion von Neutrophilen an aktiviertem Endothel und reduziert die Invasion in postischämisches Myokard.¹⁵² Dem Einfluss der PI3K auf

die Leukozytenmigration scheint daher ein komplexes zeitliches Zusammenspiel der verschiedenen PI3K-Subklassen zugrunde zu liegen.

Es ist bekannt, dass die CD147-induzierte VEGF-Produktion von der Aktivierung der PI3K abhängt.¹⁵⁹ In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass ebenso die CyPA-induzierte Migration von Monozyten über den PI3K-Akt-Signalweg vermittelt wird.⁶⁶

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Inhibition der PI3K Wortmannin und Ly294002 verwendet. Wortmannin ist als irreversible Inhibitor aller PI3K-Isoformen charakterisiert, wohingegen Ly294002 lediglich PI3K- β und - δ reversibel hemmt.¹⁵³ Beide Inhibitoren reduzieren die Phosphorylierung von Akt.¹⁶⁰

1.5 Neue Therapieansätze zur Beeinflussung der pathophysiologischen Vorgänge bei Myokardinfarkt

Inzwischen ist die koronare Reperfusion als wichtigste therapeutische Maßnahme bei einem Myokardinfarkt etabliert. Allerdings besteht die Bestrebung, das Ausmaß des geschädigten Myokards weiter zu verringern.

Da das biologische Verständnis von Entzündungen erahnen lässt, dass die inflammatorische Reaktion weiteres Gewebe schädigen kann,⁶ wurde bereits vor 30 Jahren versucht, durch Kortikosteroide den Krankheitsverlauf günstig zu beeinflussen. Nachdem bei Hunden positive Effekte zu beobachten waren,¹⁶¹ zeigten jedoch klinische Versuche mit Prednisolon ernüchternde Ergebnisse. Einige der Patienten entwickelten unter dieser Therapie Aneurysmen und Rupturen der Ventrikelwand, sodass man die Notwendigkeit einer adäquaten Inflammation im Sinne einer Reparaturantwort erkannte.^{6,162} Es wird daher das Ziel verfolgt, differenzierter in den entzündlichen Gewebeumbau nach einem Herzinfarkt einzugreifen.

Ein Ansatzpunkt ist hierbei die Verwendung von CsA als Komplexbildner für CyPA. Bei Schweinen¹⁶³ und in einer Pilotstudie an Patienten¹⁶⁴ kann dabei eine Verringerung von Infarktgröße und Infarktkomplikationen festgestellt werden. Dennoch ist CsA *in vivo* kein idealer Kandidat für eine CyPA-Inhibition, da die begleitende Immunsuppression

schwere Folgen haben kann.⁷ Bei Mäusen zeigt auch das nicht-immunsuppressive CsA-Derivat NIM811 eine hemmende Wirkung auf die Infiltration von Makrophagen und T-Zellen.¹³⁸

Für eine gezieltere Therapie gilt es außerdem aufzuklären, über welchen Mechanismus CsA seine positive Wirkung beim Herzinfarkt entfaltet. Piot et al. gehen in ihrer klinischen Studie davon aus, dass die Interaktion von CsA mit Cyclophilin D eine Reduktion des Reperfusionsschadens bewirkt, indem die Öffnung der mPTP gehemmt wird.¹⁶⁴

Allerdings bewirkt auch die Hemmung von MMPs ein geringere Infarktgröße sowie eine bessere Herzfunktion^{50,51,53,54} (vgl. Kapitel 1.1.3.2, Umstrukturierung des geschädigten Gewebes durch Matrix-Metalloproteinasen). Somit ist auch vorstellbar, dass die Blockade von CyPA nicht nur durch Hemmung der mPTP-Öffnung, sondern auch durch eine Abschwächung der Leukozyteninvasion und der MMP-Expression zu dem beobachteten Effekt der CsA-Therapie beiträgt.

Aus dieser Überlegung heraus wurde die Rolle von CyPA und seinem Rezeptor EMM-PRIN am murinen Herzinfarkt-Modell untersucht. Die Blockade der CyPA-CD147-Interaktion minderte dabei nicht nur die Infiltration von monozytären Zellen und Neutrophilen, sondern auch die Infarktgröße. Zudem verbesserte sich die Herzfunktion nach einem Myokardinfarkt. Der Effekt einer CyPA-Defizienz und der Behandlung mit anti-CD147-Antikörper war dabei etwa gleich groß.⁶⁶ Wird kombiniert an CyPA und CD147 angegriffen, fällt der hemmende Effekt auf die Leukozytenmigration kaum stärker aus als bei alleiniger Blockade eines der Partner. Daher wirken CyP und CD147 bei Entzündungsprozessen vermutlich über denselben Signalweg.^{39,66} CD147 scheint dabei als Adhäsionsmolekül also kaum eine Rolle zu spielen.⁸¹

Inwiefern durch pharmakologische Beeinflussung von extrazellulärem CyPA die Entstehung eines Ischämie-/Reperfusionsschadens beeinflusst werden kann, soll daher in dieser Arbeit untersucht werden.

1.6 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, zu beleuchten, welche Mechanismen bei der CyPA-CD147-Interaktion tragen. Insbesondere soll hierbei der Fokus auf die Rolle der Monozyten gelegt werden. Es soll untersucht werden, ob eine pharmakologische Unterbrechung der CyPA-CD147-Interaktion therapeutisch genutzt werden kann, um Ausmaß

und Komplikationen von Myokardinfarkten zu begrenzen.

Hierzu waren in unserer Arbeitsgruppe bereits vielversprechende Versuche an Mäusen durchgeführt worden, welche CyPA- oder CD147-Defizienzen aufwiesen. Auch vorab mit Anti-CD147-Antikörper behandelte Tiere zeigten positive Ergebnisse.⁶⁶

In dieser Studie soll nun *in vivo* untersucht werden, ob die beobachteten günstigen Effekte auch dann erzielt werden, wenn die Applikation des Anti-CD147-Antikörpers erst nach dem Verschluss des Koronargefäßes erfolgt. Dieses Szenario entspricht einer späteren klinischen Anwendung, bei der Patienten erst einer Therapie zugänglich sind, nachdem der Infarkt bereits eingetreten ist.

Dazu wurde nach 24 Stunden die Zahl infiltrierender Zellen bestimmt. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ochmann wurde außerdem die Infarktgröße nach einem und 28 Tagen ermittelt. Darüber hinaus wurde die entstandene myokardiale Fibrosefläche beurteilt.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit besagt, dass eine Inhibition des CyPA-CD147-Systems günstige Effekte auf das Remodelling nach myokardialer Ischämie/Reperfusion hat, die durch eine Hemmung der Monozyteninvasion mitbedingt sind (Abb. 1.4). Schlüsselmechanismen für die myokardiale Monozytenrekrutierung sind dabei die Adhäsion, die Extravasation und die Migration. Daher wurde *in vitro* insbesondere die Bedeutung von extrazellulärem CyPA für die Adhäsion strömender monozytärer Zellen untersucht. Zusätzlich wurden die beteiligten intrazellulären Signalwege näher beleuchtet.

Die so gewonnenen Erkenntnisse können zu einem besseren Verständnis der postischämischen Myokardinflammation beitragen. Über eine genauere Kenntnis der pathophysiologischen Vorgänge kann es möglich werden, gezielte und effektivere Therapien des Myokardinfarkts zu entwickeln. Möglicherweise kann dadurch zukünftig die myokardiale Schädigung durch einen Herzinfarkt stärker verringert werden als dies heute möglich ist.

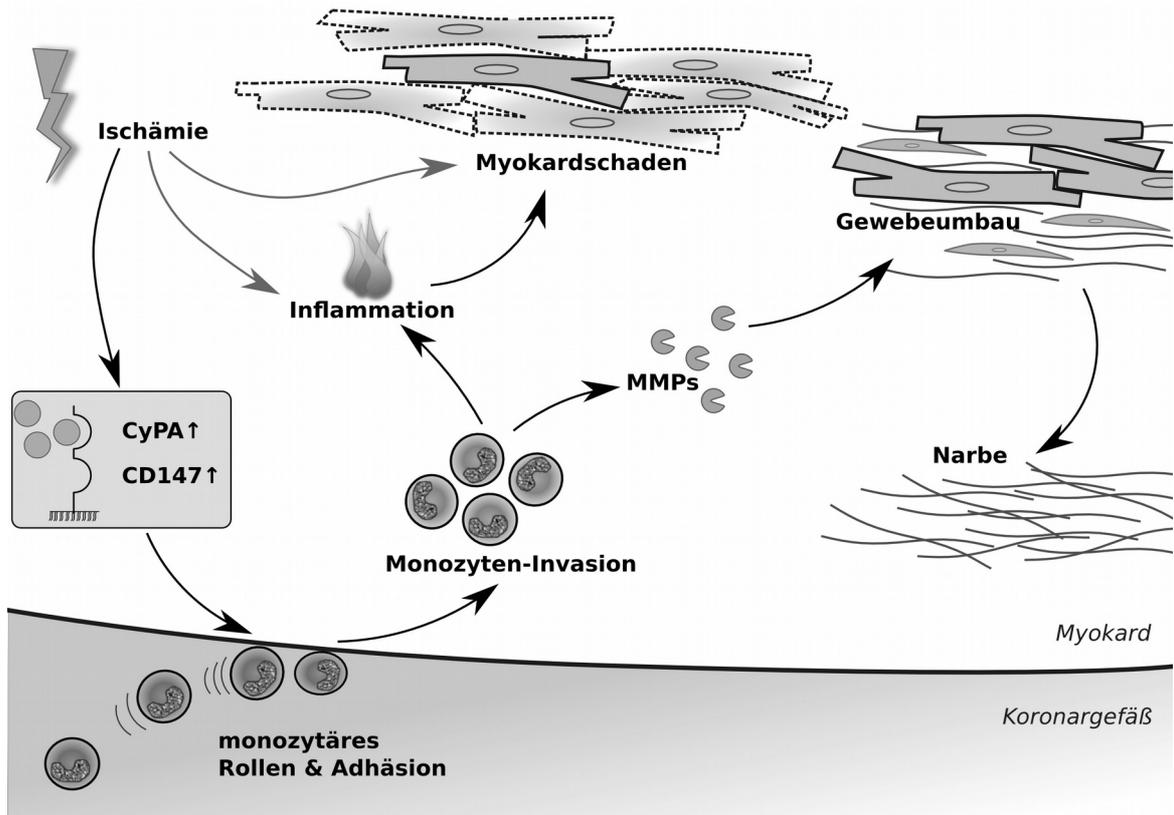


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Hypothese dieser Studie

Durch eine Myokardischämie wird der Anstieg von CyPA und CD147 ausgelöst, welcher zum Rollen und zur Adhäsion von Monozyten am Endothel führt. Nachdem die Monozyten in das geschädigte Myokard eingewandert sind, unterhalten sie dort die Entzündungsreaktion. Darüber hinaus wird durch die Expression von MMPs ein Gewebeumbau bewirkt, der zur Narbenbildung führt.

CyPA: Cyclophilin A; MMPs: Matrix-Metalloproteinasen

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Software

Brutschrank	CO ₂ Incubator MC0-18AIC, Sanyo Electric Co. Ltd. Moriguchi, Japan
Digitalkamera	Sony Cybershot DSC-W40
Flusskammer	FCS 1C, Provitro GmbH, Berlin
Histologie-Software	NIS-Elements Basic Reasearch 2.10 (Build 217), Nikon GmbH, Deutschland
Mikroskop (Flusskammer)	Axiovert 200, Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop (Histologie)	Optiphot-2, Nikon GmbH, Deutschland
Mikrotom	2045 Multicut, Leica, Wetzlar
Perfusor	Perfusor fm, Braun, Melsungen
Pipetten (0,5-10µl; 10-100µl; 100-1000µl)	Eppendorf research, Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	accu-jet pro, Brand, Wertheim
Statistik-Software	SPSS Statistics Premium 21, IBM, Ehningen
Sterilbank, Klasse II	Herasafe 18, HS 18, Thermo Electron Corporation, Langensebold
Video-DVD-Recorder	VDR-3000, Datavideo Technologies, Utrecht, NL
Videokamera	FK-6990-IQ-S, Pieper, Schwerte
VLC media player	VLC 2.0, www.videolan.org
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3S+, Thermo Scientific, Osterode
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 1S, Thermo Scientific, Osterode

Bei allen Versuchen war der Brutschrank auf 37°C mit angefeuchteter Luft und 5% CO₂ eingestellt.

2.1.2 Maushaltung und Operation

2,3,5-Triphenyltetrazolium-Cholrid-Lösung (TTC), 1%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Atipamezol	Antisedan, Pfizer GmbH, Karlsruhe
Augensalbe	Bepanthen, Bayer Vital, Leverkusen
Buprenorphin	Temgesic, ESSEX PHARMA GmbH, München
Einstreu, Espenholz, entkeimt und entstaubt	ABEDD – LAB & VET Service GmbH, Wien, Österreich
Evans Blue, 0,5%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Faden	6-0, 7-0 Prolene, Ethicon, Norderstedt
Faden	6-0 Perma Hand Seide, schwarz, Ethicon, Norderstedt
Faden	8-0, 6-0 Vicryl, Ethicon, Norderstedt
Fentanyl	Curamed pharma GmbH, Karlsruhe
Flumazenil	Flumazenil Kabi, Fresenius Kabi Dtsch GmbH, Bad Homburg
Formaldehyd, 4%	Fischar, Saarbrücken
Futter	Provimi Kliba, Kaiseraugst, Schweiz
Isofluran	Isoflo, Albrecht GmbH, Aulendorf
Medetomidin	Domitor, Pfizer, Karlsruhe
Midazolam	Midazolam, Ratiopharm, Ulm
Minivent Kolbenhubpumpe	MINIVENT Mouse Ventilator Typ 845, Hugo Sachs, March-Hugstetten
NaCl-Lösung, 0,9%	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Polyethylenschlauch	Außendurchmesser 0,61mm, Innendurchmesser 0,28mm, Polyethylene Tubing, SIMS trademarks, UK
Povidon-Jod-Lösung	Braunol, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Rippenspreizer	fine science tools GmbH, Heidelberg
Saugtupfer	Ethikeil, Ethicon, Norderstedt

Stereomikroskop	Zeiss, Deutschland
Temperaturregler	FHC Bowdoinham, ME 04008, USA
Tissue Tec	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwonde, NL
Trachealtubus (Metall)	Außendurchmesser 1,3mm, Länge 3,2cm, Hugo Sachs, March-Hugstetten
Wärmematte	5x12,5cm , FHC Bowdoinham, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Dreiwegehahn	Discofix c, Braun, Melsungen
6-Well-Platte	Falcon Multiwell 6 Well, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Deckgläschen, rechteckig	24x60mm, R. Langenbrinck, Emmendingen
Deckgläschen, rund	Assistent No.1, Ø25mm, Glaswarenfabrik Hecht, Sondheim/Röhn
Eppendorf-Cup (0,5ml; 1,5ml)	Eppendorf Tubes, Eppendorf AG, Hamburg
Falcon (15ml; 50ml)	Cellstar Tubes, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kulturflasche (175cm ² , 75cm ²)	Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Neubauer-Einmalzählkammer	Digital Bio C-Chip NI DHC-N01, PE- QLAB, Erlangen
Objektträger	SuperFrost Plus Objektträger, R. Langenbrinck, Emmendingen
Perfusorspritze, 50ml	Original-Perfusor Syringe 50ml, Braun, Melsungen
Pipettenspitze 10µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Ol- dendorf
Pipettenspitze 200-1000µl	ratiolab GmbH, Dreieich
Pipettenspitze 200µl	Sarstedt AG & Co., Numbrecht

Stangenpipette (50ml; 25ml; 10ml; 5ml; costar, corning Incorporated, Amsterdam, 2ml)	NL
--	----

2.1.4 Reagenzien und Lösungen

Aqua dest.	Millipore Corporation, Billerica, USA
Cyclophilin A, human, rekombinant	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Eisessig	Merck KG, Darmstadt
Ethanol (99%)	SAV-Liquid Production GmbH, Flintsbach
Gelatine, steril, 2% in H ₂ O	Sigma-Aldrich, Steinheim
Interferon- γ , human (IFN- γ)	PeptoTech, Inc., Rocky Hill, USA
Ly294002	Calbiochem, Millipore Corporation, Billerica, USA
MM284/6	nicht immunsuppressives CsA-Derivat, freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Fischer, Max-Planck-Gesellschaft, Halle
Dublecco's PBS, 1x, steril	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Roti-Histol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti Histokitt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tumor-Nekrose-Faktor α , human (TNF- α)	PeptoTech EC, London, UK
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Wortmannin	Calbiochem, Millipore Corporation, Billerica, USA

2.1.5 Färbelösungen

Biebrich Scharlachrot	Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung, Sigma-Aldrich, Steinheim
Eisenhämatoxylin nach Weigert	Hämatoxylinlösung A + B nach Weigert,

	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Eosin G (1%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hämalaun, sauer, nach Mayer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Lichtgrün	5g Lichtgrün, Sigma-Aldrich, Steinheim 250ml Aqua dest. 2ml Eisessig
Phosphormolybdänsäure	10g Molybdätophosphorsäure Hydrat, Sigma-Aldrich, Steinheim 200ml Aqua dest.
Trypanblau, 0,4%	GIBCO, Invitrogen AG, Carlsbad, USA

2.1.6 Zellkulturmedien

2.1.6.1 HUVEC-Medium

EndoPrime Base Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Supplements	EndoPrime Kit Supplements, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
25ml EndoPrime FBS	
5ml Supplements for Primary Endothelial Cells	
1ml EndoPrime EGF	
1ml EndoPrime VEGF	

2.1.6.2 MonoMac6-Medium

Fetal Bovine Serum (FBS)	FBS Gold, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
L-Glutamin 200nM (100x)	GIBCO invitrogen
Na-Pyruvat 100nM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

	reich
Non-Essential Amino Acids (NEAA)	GIBCO MEN NEAA, Invitrogen AG, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

2.2 Versuch am Tier

Die Operation und Versorgung der Tiere wurde von Tierärztinnen unseres Labors durchgeführt.

Die Versuchstiere waren männliche Mäuse der Linie C57BL/6J, die von der Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Sie wogen ca. 25g und waren am Tag der ersten Operation zwischen 7 und 12 Wochen alt.

Die Genehmigung dieser tierexperimentellen Studie erfolgte durch das Regierungspräsidium Tübingen mit der Genehmigungsnummer M7/09.

2.2.1 Operation

Die Operation wurde wie bei Ochmann¹⁶⁵ und Zach¹⁶⁶ beschrieben durchgeführt. Im Folgenden wird das dort erläuterte Vorgehen zusammenfassend dargestellt.

Die Mäuse erhielten eine intraperitoneal injizierte Kombinationsnarkose. Bestandteile waren Medetomidin, ein α -2-Adrenorezeptorantagonist, in der Dosierung 0,5mg/kg KG sowie das Benzodiazepin Midazolam in einer Dosierung von 5mg/kg KG und das Opioid Fentanyl in der Dosierung 0,05mg/kg KG.

Für die Operation wurde die ventrale Hals- und rechte Thoraxseite enthaart, gereinigt und mit Povidon-Jod-Lösung desinfiziert. Bis zur Tracheotomie erhielt die Maus durch eine Atemmaske Sauerstoff. Über eine Rektalsonde und eine Wärmematte wurde die

Körpertemperatur konstant bei $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ gehalten.

Die Operation erfolgte bei zwölfacher Vergrößerung unter einem Stereomikroskop.

Zur Tracheotomie wurde die Haut auf Höhe des Larynx inzidiert, die Trachea eröffnet und der Tubus eingeführt.

Die Beatmung erfolgte mit einem Sauerstofffluss von 0,8l/min. Zur Aufrechterhaltung der Narkose waren 0,7-1,5 Volumenprozent Isofluran zugesetzt.

Als Zugangsweg für die Ligatur der LAD musste eine Thorakotomie durchgeführt werden. Dies geschah, nachdem die Maus in Rechtsseitenlage fixiert worden war. Der Hautschnitt wurde links thorakal, etwa im vierten Interkostalraum gesetzt. Die Muskeln der Thoraxwand und der Interkostalräume wurden durchtrennt, die Pleura durchschnitten und ein Rippenspreizer eingesetzt. Das Perikard wurde anschließend so gefenstert, dass ein offener Zugang zur linken Herzhälfte bestand.

Die LAD wurde an der Facies auricularis mit einem Faden unterstochen, aus dem eine Schlaufe gebildet wurde. Diese wurde festgezogen und die Arterie so abgebunden.

Dass die Arterie erfolgreich verschlossen war, war daran zu erkennen, dass die LAD distal der Ligatur nicht mehr zu sehen war. Als weitere Zeichen für eine effektive Okklusion waren gelegentlich ischämiebedingte Tachykardien oder Arrhythmien bis zum Kammerflimmern sichtbar.

Die Ligatur erfolgte für 30min. In dieser Zeit wurde der Rippenspreizer geschlossen, um Austrocknung zu vermeiden. Alle fünf Minuten wurde die Wunde gespreizt und der korrekte Sitz der Ligatur kontrolliert.

10min bevor die Schlaufe gelöst wurde, erhielten die Mäuse eine intraperitoneale Injektion mit $1\mu\text{g/g KG}$ des anti-CD147-Antikörper bzw. der unspezifischen IgG-Antikörper (Kontrollgruppe). Nach genau 30min wurde der Faden gelöst, sodass die Reperfusion des Gefäßes distal der Ligatur deutlich zu sehen war.

Der Faden verblieb im Herzgewebe. So war es möglich, vor der Euthanasie den Gefäßverschluss an exakt derselben Stelle erneut zu erzeugen, um das Gebiet zu markieren, welches von der Minderversorgung betroffen gewesen war.

Beim Verschließen des Operationsgebiets wurde die Inzision zwischen den Rippen mit Einzelheften vernäht. Für Muskelschichten und die Faszie wurde eine fortlaufende Naht verwendet und die Haut mit Einzelknopfnähten verschlossen.

Wenige Minuten vor der Extubation wurde zur Narkoseausleitung der Isoflurangehalt der Ventilationsluft gesenkt und schließlich abgesetzt, nachdem die Haut der Thoraxwunde geschlossen war. Die Sauerstoffzufuhr wurde dann erhöht.

Der Trachealtubus wurde entfernt und über die Atemmaske Sauerstoff verabreicht, bis das Tier völlig aus der Narkose erwacht war. Bei Spontanatmung wurde die Tracheotomiewunde verschlossen und die Narkose antagonisiert. Dazu wurden Atipamezol in einer Dosierung von 2,5mg/kg KG und 0,5mg/kg KG Flumazenil verwendet. Buprenorphin zur postoperativen Schmerzstillung war bereits 30min vor Operationsende verabreicht worden. Es wurden 0,1mg/kg KG subkutan appliziert.

2.2.2 Postoperative Behandlung

Nach dem vollständigen Erwachen aus der Narkose wurde die Maus einzeln in einen Käfig gesetzt. Mit einer Rotlichtlampe wurde das Tier postoperativ vor einer Auskühlung bewahrt.

Sechs und 18 Stunden nach der Operation erfolgten eine zweite und dritte intraperitoneale Injektion des anti-CD147-Antikörpers bzw. der IgG-Isotypkontrolle, jeweils in der Dosierung 1µg/g KG.

Acht Stunden nach der Operation erhielt das Tier erneut subkutan Buprenorphin in der Dosierung 0,1mg/kg KG.

Die Versuchstiere, bei denen die Euthanasie nach 28 Tagen erfolgte, bekamen postoperativ eine Woche lang täglich eine weitere Injektion des Antikörpers bzw. der Isotypkontrolle.

2.2.3 Euthanasie und Färbung der Herzen

Nach 24 Stunden bzw. 28 Tagen wurde die Maus wieder wie oben beschrieben anästhesiert, intubiert und beatmet. Die Isofluranzufuhr betrug 2,5 Volumenprozent.

Kaudal des Proceccus xiphoideus wurde die Haut auf der gesamten Körperbreite quer zur Körperachse inzidiert. Das Peritoneum wurde großflächig eröffnet und das Zwerch-

fell perforiert. Zudem wurden in einer Hemithorakotomie die mukuloskelettalen Strukturen durchtrennt.

Mit den noch in situ verbliebenen Ligaturfäden wurde die Okklusion erneut gesetzt und 0,5ml Evans Blue in den schlagenden linken Ventrikel gespritzt. Durch den Farbstoff wird das vom Blut perfundierte Gewebe blau angefärbt.

Schließlich wurde durch eine Injektion von 0,3ml 1M Kaliumchlorid-Lösung in den linken Ventrikel ein Herzstillstand erreicht.

Das Herz wurde entnommen, mit NaCl-Lösung gereinigt, trocken getupft und mit Tissue Tec bedeckt. Das Herz wurde so für 30min bei -20°C tiefgefroren, um es präzise schneiden zu können. Das Herz wurde dann mit einem Einmalskalpell senkrecht zur Längsachse in fünf ca. 1mm breite Querscheiben geteilt.

Mit einer NaCl-Spülung wurde das Tissue Tec entfernt und die Herzscheiben anschließend unter Lichtabschluss für zehn Minuten in 1% 2,3,5-Triphenyltetrazolium-Chlorid-Lösung (TTC) bei 37°C gefärbt. TTC wird in vitalem Gewebe in einen roten Farbstoff umgewandelt, sodass eine rote Farbe lebende Zellen anzeigt.

Vor der Weiterverarbeitung wurden die Herzscheiben neben einer Millimeterskala von beiden Seiten mit einer Digitalkamera fotografiert.

2.2.4 Konservieren der Herzen

Das explantierte, geschnittene und mit Evans Blue sowie TTC gefärbte Herz wurde in 4% Formaldehydlösung fixiert. Für die Herstellung von histologischen Schnitten wurden die Herzen in Paraffin eingebettet.

2.3 Auswertung der Infarktgröße

Die Auswertung der Infarktgröße erfolgte an den fotografierten Herzscheiben mit der Software NIS Elements. Es wurden diejenigen Bilder verwendet, welche die distal der LAD-Ligatur gelegenen Bereiche des linken Ventrikels zeigten. Darauf stellte sich das von der Minderperfusion betroffene Myokard dar. Auf den Fotografien wurden folgende Gebiete ausgemessen:

1. Area not at Risk: blau gefärbtes Gewebe, das während der Ligatur keiner Minderperfusion ausgesetzt war. Es konnte folglich eine Blaufärbung durch Evans Blue erfolgen.

2. Area at Risk (Ischämiegebiet): rot gefärbtes, reversibel geschädigtes Gewebe, das während der Ligatur nicht perfundiert wurde. Eine Blaufärbung blieb aus. Trotz Ischämie finden sich hier vitale Zellen, die TTC in den roten Farbstoff umwandeln konnten.
3. Infarktareal: weißes, irreversibel geschädigtes Herzmuskelgewebe. Von der Minderperfusion betroffenes Gebiet, in dem die abgestorbenen Zellen TTC nicht umwandeln konnten.

Aus den gemessenen Werten wurde für jedes Foto die relative Infarktfläche, bezogen

auf die Area at Risk, bestimmt: $\text{relative Infarktfläche} = \frac{\text{Infarktareal}}{\text{Area at Risk}}$

2.4 Histologie

2.4.1 Herstellung der Objektträger

Mit dem Mikrotom wurden 4µm dicke Schnitte von denjenigen Paraffinblöcken angefertigt, welche Herzteile mit Gebieten der Area at Risk enthielten.

Um bessere Schnittbedingungen zu erhalten, wurden die Paraffinblöcke vor dem Schneiden sowie zwischendurch auf -20°C gekühlt. Je drei aufeinanderfolgende Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgenommen.

Die Objektträger wurden anschließend in ein erwärmtes Wasserbad getaucht, um die dünnen Paraffinscheiben faltenfrei an den Objektträger zu binden. Danach wurden die Präparate für mindestens 24h bei Raumtemperatur getrocknet.

2.4.2 HE-Färbung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung als Übersichtsfärbung verwendet und um für die Zellzählung alle Zellkerne deutlich anzufärben.

Hämalaun färbt selektiv die basophilen Zellkerne blau; Eosin färbt Zytoplasma und Kollagen rot.

Vor der eigentlichen Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert, indem die Objektträger zweimal für 10min in Roti-Histol getaucht wurden. Um das Präparat den Färbelö-

sungen zugänglich zu machen, wurde es dann in einer absteigenden Alkoholreihe bis 70% Ethanol und anschließend in Wasser überführt.

Zum Färben wurden die Objektträger 5min in Hämalaunlösung nach Mayer inkubiert und danach 15min in lauwarmem, fließendem Wasser gebläut.

Es erfolgte dann für 1min die Gegenfärbung in 1% Eosin, welches zuvor mit einem Tropfen Eisessig versetzt wurde. Nach Waschen in Aqua dest. wurden die Objektträger über eine aufsteigende Alkoholreihe bis 100% Ethanol in Roti-Histol überführt.

Anschließend wurden die Präparate mit Histokitt und einem Deckgläschen eingedeckelt.

2.4.3 Kollagen-Färbung nach Masson-Goldner

Die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung dient dem Anfärben von Bindegewebe, insbesondere Kollagen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Trichrom-Färbung verwendet, um fibrotisches Narbengewebe abzugrenzen und um frisches Infarktgewebe von Bindegewebe zu unterscheiden.

Bei dieser Färbung werden Zellkerne schwarz, Muskeln und Zytoplasma rot, Bindegewebe grün gefärbt.

Die Objektträger wurden zunächst wie unter 2.4.2 für die HE-Färbung beschrieben bis 70% Ethanol entparaffiniert.

Nachdem die Schnitte zur Färbung der Zellkerne für 5min in Hämatoxylin nach Weigert gefärbt und 1min in Aqua dest. gespült worden waren, wurden sie für 5min in lauwarmem, fließendem Wasser gebläut.

Anschließend erfolgte ein Färbeschritt für 10min in Bieberich-Scharlachrot, wonach 1min in Aqua dest. gespült wurde. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger für 10min in Phosphormolybdänsäure inkubiert und 1min in Aqua dest. gespült. Die letzte Färbung wurde für 1-2min in Lichtgrün durchgeführt. Danach wurde 1min in Aqua dest. gespült und für 1min in 1% Essigsäure ausgewaschen.

Über eine aufsteigende Alkoholreihe bis 100% Ethanol wurden die Präparate in Roti-Histol überführt. Die Schnitte wurden mit Histokitt und Deckgläschen konserviert.

2.4.4 Auswertung der Zelldichte im Infarktgebiet

Betrachtet wurden in der HE-Färbung die Randgebiete des Infarktgewebes 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion. In den untersuchten Arealen finden sich die Immunzellen, die aus dem Blutkreislauf ins Entzündungsgebiet migrieren.

Es wurden alle HE-gefärbten Schnitte begutachtet und diejenigen zur Auswertung ausgewählt, auf denen im Randgebiet des Infarkts eine deutlich höhere Zelldichte vorhanden war als im umgebenden gesunden Myokard. Auf diese Weise wurden die Objektträger ausgewählt, auf denen entzündliches Infiltrat vorhanden war.

Wurde auf den Schnitten eines Herzstücks kein Infarktgebiet gefunden, so wurden nochmals weitere Schnitte aus diesem Paraffinblock angefertigt und gefärbt, um ggf. tiefer liegende Infarktareale zu sehen.

Am Mikroskop wurden auf den ausgewählten Schnitten digitale Aufnahmen von den Grenzgebieten mit Infiltrat erstellt. Am PC wurden darauf Flächen von ca. 27.000 μm^2 markiert und die darin enthaltene Anzahl von Zellen gezählt.

2.4.5 Auswertung der myokardialen Fibrosefläche

Untersucht wurden die Herzen der 28 Tage nach Ischämie/Reperfusion getöteten Mäuse. Es wurden in HE-gefärbten Schnitten zunächst die größte Ausdehnung der myokardialen Fibrose im jeweiligen Herzstück gesucht. Anschließend wurde eine Masson-Goldner-Trichromfärbung von Schnitten dieser Stelle angefertigt, um so das fibrotisch umgewandelte Areal deutlich vom Myokard abgrenzen zu können.

Auf diese Weise wurde die Fläche der kollagenreichen Fibrose bestimmt. Zur Auswertung wurde diese Fibrosefläche in Relation zur Gesamtfläche des jeweiligen Schnittes gesetzt.

2.5 Zellkultur

2.5.1 Kultur der monozytären Zelllinie MonoMac6

Um eine Beeinträchtigung durch den aufwändigen Isolations- und Verarbeitungsprozess von Spender-Monozyten zu vermeiden, wurde in den vorliegenden Versuchen auf die MonoMac6-Zelllinie als Monozyten-Modell zurückgegriffen.

Diese Zelllinie wurde 1985 von Ziegler-Heitbrock et al. aus dem Blut eines Patienten mit Monoblasten-Leukämie isoliert. Die Zellen zeigen eine typische monozytäre Morphologie und bereits ohne induzierte Differenzierung phagozytische Aktivität gegen antikörperbesetzte Erythrozyten. Sie exprimieren Oberflächenmarker, die nur für reife Monozyten charakteristisch sind. Dies macht sie anderen monozytären Zelllinien wie THP-1 oder U937 überlegen, die unreifere Monozyten zu sein scheinen¹⁶⁷.

Für die Kultur von MonoMac6-Zellen wurde ein Medium hergestellt, das sich zusammensetzt aus

- 500ml RPMI 1640 Medium
- 50ml FCS
- 9ml NEAA
- 5ml Penicillin/Streptomycin
- 5ml L-Glutamin
- 5ml Natrium-Pyruvat.

Die Zellen wurden in Konzentrationen von 0,3-1,0 Mio/ml in Kulturflaschen ausgesät. Sie verhalten sich semiadhärent und haften dem Boden der Kulturflasche lose an.¹⁶⁸ Abhängig von der Konzentration wurden die Zellen alle 2-4 Tage gesplittet, wenn am Boden der Kulturflasche ein dichter Zellrasen und im Überstand eine größere Anzahl von frei schwimmenden Zellen zu sehen war.

Zum Passagieren wurde die Kultur zuerst unter dem Mikroskop begutachtet und auf Zellkonglomerate hin untersucht, welche Hinweis auf eine Aktivierung der MonoMac6-Zellen oder eine LPS-Kontamination sein können.

Sodann wurden die Zellen mit einer 20ml-Stangenpipette aus der Kulturflasche entnommen und in 50ml-Falcons überführt. Die Kulturflasche wurde mindestens zweimal mit je 10ml PBS gespült und die adhärennten Zellen dabei sanft vom Flaschenboden abgelöst, sodass nur noch wenige stark adhärennte Zellen zurückblieben.

Bei Raumtemperatur wurden die Falcons für 5min bei 1.200rpm mit Bremse zentrifugiert.

Die dabei entstandenen Überstände wurden abgesaugt und die Pellets in ca. 10ml Medi-

um mit einer 20ml-Stangenpipette vorsichtig resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 10µl entnommen, die dann mit 10µl Trypanblau gemischt wurden. Trypanblau dringt durch die Membran abgestorbener Zellen ein und färbt diese blau, wodurch es möglich wird, vitale von avitalen Zellen zu unterscheiden.

In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Konzentration der vitalen MonoMac6-Zellen in der Suspension bestimmt.

Die Zellsuspension wurde nun so auf neue Kulturflaschen aufgeteilt und mit Medium aufgefüllt, dass eine Konzentration von 0,3-1,0 Mio/ml entstand. Die angesetzte Konzentration richtete sich v.a. nach dem beabsichtigten Verwendungszeitpunkt. Richtwert war dabei das Verhältnis von 8 Mio MonoMac6-Zellen in 27ml Medium bei Verwendung am übernächsten Tag.

Gelagert wurden die Kulturflaschen liegend im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

2.5.2 Kultur von Humanen Nabelvenen-Endothelzellen (HUVEC)

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) sind primäre Zellen, die sich unter Kulturbedingungen teilen, kryokonserviert werden können und ihre endothelialen Eigenschaften über mehrere Passagen behalten.

Für die Kultur von HUVEC wurde ein Medium zusammengestellt, das sich zusammensetzt aus

500ml EndoPrime Base Medium
EndoPrime Supplement Kit
5ml Penicillin/Streptomycin

Die Zellen wachsen adhärent auf dem Boden einer mit Gelatine beschichteten Kulturflasche. Sie wurden regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert und passagiert, wenn die Zellen konfluent waren. Zeigte das Medium bereits vorher einen deutlichen Umschlag ins Gelbe, wurde neues Medium zugegeben bis die Zellen konfluent waren.

Für den Flusskammerversuch wurden HUVEC der Passagen 5-7 verwendet, da die Zellen in höheren Passagen ihre endothelialen Eigenschaften einbüßen.

Zur Passagierung wurde aus den Kulturflaschen mit den am Boden konfluenten HUVEC mit einer Stangenpipette das verbrauchte Medium entnommen. Es wurden 10ml PBS über den Rand der Flasche zugegeben und durch leichtes Schwenken zum Waschen über die Zellen gespült. Anschließend wurde das PBS abpipettiert.

Um die HUVEC vom Boden abzulösen, wurden 4ml Trypsin gleichmäßig über den Zellrasen verteilt. Um das Temperaturoptimum des Enzyms und dadurch ein besseres Ergebnis zu erreichen, wurde der Ansatz für 2min im Brutschrank inkubiert. Damit eine Schädigung der Zellen durch eine zu lange Einwirkzeit der Protease Trypsin vermieden wird, wurden nach max. 2min die noch adhärenen Zellen unter mikroskopischer Kontrolle durch Klopfen vom Boden abgelöst.

Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von 5ml HUVEC-Medium gestoppt. Mit einer Stangenpipette wurde die Suspension abgelöster Zellen in ein 50ml-Falcon transferiert und die Kulturflasche mit PBS nachgespült, um verbliebene HUVEC zu sammeln.

Die Suspension wurde bei Raumtemperatur mit Bremse für 5min bei 1200rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das entstandene Zellpellet in ca. 3ml Medium mit einer 10ml-Stangenpipette resuspendiert.

Von dieser Suspension wurde, mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer die Zellkonzentration bestimmt.

Es wurden je ca. 3 Mio HUVEC in eine vorbereitete große Kulturflasche verbracht und 27ml Medium zugegeben.

Die Kulturflaschen waren zuvor mit Gelatine beschichtet worden, indem 6ml 0,2% Gelatine deckend auf den Boden von großen Kulturflaschen aufgetragen worden waren. Nach mind. 10min im Brutschrank war dann mit einer Stangenpipette die flüssige Gelatine entfernt worden.

2.6 Flusskammer

Im Flusskammerversuch werden arterielle Strömungsbedingungen *in vitro* nachgestellt, um die Interaktionen von Blutzellen mit dem Endothel untersuchen zu können.

Dafür wird eine Suspension mit definierter Zellkonzentration über ein mit HUVEC be-

schichtetes Deckglas gepumpt, sodass Scherraten entstehen, die den Bedingungen in Arterien entsprechen. Dieser simulierte Blutfluss wird durch ein Mikroskop beobachtet und mittels einer Kamera zur späteren Analyse aufgezeichnet.

Alle Schritte in der Vorbereitung wurden an einer Sterilbank Klasse 2 durchgeführt. Sofern Mikroskop, Zentrifuge oder Brutschrank verwendet wurden, befanden sich die bearbeiteten Objekte und Zellen dabei in einem abgeschlossenen Gefäß.

2.6.1 Vorbereitung der Deckgläschen

Für den Flusskammerversuch wurden runde Deckgläschen einlagig mit HUVEC beschichtet, um im Versuch das Endothel einer arteriellen Gefäßwand darzustellen.

Bevor die unsterilen Deckgläschen mit HUVEC beschichtet werden konnten, wurden jene zur Desinfektion für mind. 1h mit 70% Ethanol bedeckt.

Danach wurde unter der Sterilbank je ein Deckglas in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte gelegt und mit 1ml 0,2% Gelatine bedeckt. Nach mind. 10min im Brutschrank wurde die flüssige Gelatine abpipettiert und verworfen.

Für das Beschichten der Deckgläschen mit Endothelzellen wurden, wie unter 2.5.2 (Kultur von Humanen Nabelvenen-Endothelzellen (HUVEC)) beschrieben, HUVEC mit PBS gewaschen, mit Trypsin aus der Kulturflasche gelöst, zentrifugiert, resuspendiert und gezählt.

Sollten die Deckgläschen am nächsten Tag verwendet werden, so wurden 0,5 Mio HUVEC auf jedes Deckglas pipettiert und das Well anschließend mit Medium auf 2ml aufgefüllt. Wurde der Versuch erst am übernächsten Tag durchgeführt, so wurden 0,25 Mio HUVEC pro Deckgläschen verwendet und das Well mit Medium auf 2ml aufgefüllt.

Die beschichteten Deckgläser wurden bis zum Versuchstag bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.6.2 Inkubation und Aktivierung der Kulturzellen

2.6.2.1 Vorbereitung der Humanen Nabelvenen-Endothelzellen (HUVEC)

Die HUVEC wurden mit IFN- γ und TNF- α stimuliert, um das aktivierte Endothel eines entzündlich veränderten Gewebes zu simulieren, an dem die Monozyten bzw. MonoMac6-Zellen rollen und adhäreren.

Die mit HUVEC beschichteten Deckgläschen wurden unter dem Mikroskop begutachtet und nur Deckgläser mit konfluentem, gleichmäßigem Zellrasen verwendet.

Zu den 2ml Medium, die jedes Well enthielt, wurden IFN- γ und TNF- α zugegeben, sodass Konzentrationen von 20ng/ml IFN- γ und 50ng/ml TNF- α entstanden.

Die HUVEC wurden für 4-6h im Brutschrank mit IFN- γ und TNF- α inkubiert, bis sie für den Flusskammerversuch verwendet wurden.

2.6.2.2 Vorbereitung der MonoMac6-Zellen

Am Versuchstag wurden die MonoMac6-Zellen aus den Kulturflaschen gelöst und in Perfusorspritzen aufgeteilt. In den Spritzen wurden sie je nach Versuchsansatz mit dem Stimulans bzw. Inhibitor versetzt und im Brutschrank inkubiert.

Bei der Vorbereitung wurde besondere Sorgfalt darauf verwendet, die Zellen keinen starken Scherkräften beim Pipettieren und Resuspendieren auszusetzen, um sie dadurch nicht mechanisch zu stimulieren.

Wie unter 2.5.1 (Kultur der monozytären Zelllinie MonoMac6) beschrieben, wurden in einem ersten Schritt die MonoMac6-Zellen durch sanftes, mehrmaliges Spülen mit PBS und mikroskopischer Kontrolle der verbliebenen adhärenen Zellen aus der Kulturflasche in 50ml-Falcons überführt und zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden in MonoMac6-Medium mit einer 20ml-Stangenpipette vorsichtig resuspendiert und zusammengeführt. Wie beschrieben wurden 10 μ l der Suspension mit Trypanblau vermischt und gezählt, sodass die Konzentration der Suspension errechnet werden konnte.

Für alle Ansätze wurde je eine 50ml-Perfusorspritze beschriftet und mit einem Dreiweghahn blockiert.

Für jeden Ansatz wurde anschließend die vorgesehene Anzahl an MonoMac6-Zellen in die Spritze pipettiert und mit Medium auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Den An-

sätzen der Inhibitor-Versuche wurde der jeweilige Inhibitor zugegeben, sodass die vorgegebene Inhibitor-Konzentration erreicht wurde. Die mit Stempel und Dreiwegehahn verschlossenen Spritzen wurden zum Mischen geschwenkt und dann zur Inkubation für 15-20min in den Brutschrank gelegt.

Schließlich wurde CyPA den Inhibitor-Ansätzen sowie dem Ansatz der Positivkontrolle zugesetzt, sodass eine CyPA-Konzentration von 100nM entstand.

Alle Ansätze wurden mit Stempel und Dreiwegehahn verschlossen zur Inkubation für 2h in den Brutschrank gelegt.

Nach 2h wurden die Spritzen geöffnet und die passende Menge angewärmten Mediums zu jedem Ansatz gegeben, sodass anschließend eine MonoMac6-Konzentration von 200.000/ml vorlag. Anschließend wurde jeder Ansatz nochmals leicht mit einer 20ml-Stangenpipette resuspendiert, um die Zellen abzulösen, die während der Inkubationszeit am Rand der Spritze adhärent geworden waren.

Mit Stempel und Dreiwegehahn verschlossen wurden die Spritzen zum Ruhen für ca. 10min zurück in den Brutschrank gelegt, während die Flusskammer eingerichtet wurde. Während der Versuche wurden etwa alle 20min sämtliche Spritzen gedreht und bewegt, um ein Sedimentieren und Adhärenzen der Zellen an der Wand der Spritzen zu vermeiden.

2.6.3 Durchführung des Flusskammerversuchs

2.6.3.1 Aufbau, Anordnung

Der zentrale Bestandteil des Flusskammer-Versuchsaufbaus ist eine kreisrunde, flache Plattform aus Glas. Mittels einer speziellen Gummiauflage wird auf dieser Plattform eine Flusstraße gebahnt: Die Gummiauflage ist so ausgeschnitten, dass die durch eine Einlassöffnung auf die Plattform strömende Zellsuspension in einer geraden Flussbahn zur Auslassöffnung am anderen Ende der Plattform fließt (Abb. 2.1). Auf die Gummiauflage wurde das runde, mit HUVEC-Zellen beschichtete Deckgläschen gelegt, sodass die Endothelzellen Kontakt zur Flusstraße haben und diese begrenzen. Das Deckglas wird mit einem Metallrahmen fixiert, der mit Krallen am Sockel der Glasplattform befestigt wird.

Mit einem Perfusor wurde die Suspension mit MonoMac6-Zellen gleichförmig durch die Flusskammer gepumpt. Die Fließgeschwindigkeit wurde auf 15 ml/h eingestellt, so dass arterielle Flussverhältnisse simuliert wurden.

Nachdem die Zellsuspension durch die Flusskammer geflossen war, wurde sie in einer Petrischale gesammelt und ordnungsgemäß entsorgt.

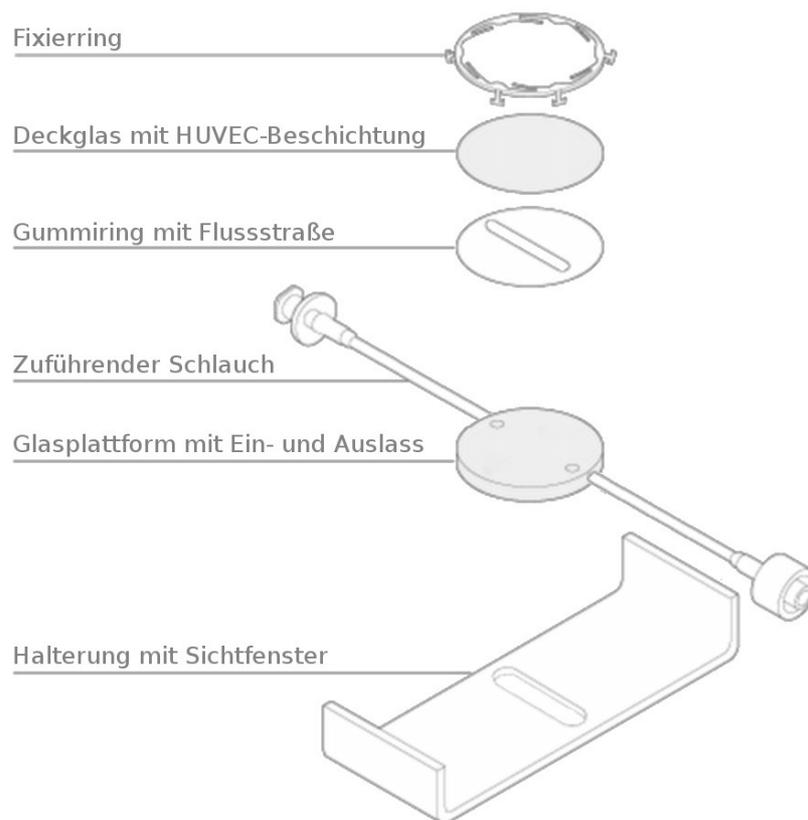


Abb. 2.1: Versuchsaufbau der Flusskammer.
Modifiziert nach provitro.de

2.6.3.2 Ablauf der Versuchsreihe

Jede Perfusorspritze eines Ansatzes mit monozytären Zellen war ausreichend für mehrere Versuchsdurchläufe.

Vor jedem Durchlauf wurde ein neues HUVEC-beschichtetes Deckglaschen in die Flusskammer eingespannt. Es wurde dann mind. 1ml der MonoMac6-Suspension als Bolus durch das System gepumpt, um Luftblasen aus Schläuchen und Flusskammer zu beseitigen.

Die einzelnen Ansätze wurden abwechselnd verwendet, um Effekte durch unterschiedlich lange Inkubations- oder Ruhezeiten zu minimieren.

2.6.3.3 Aufnahmemodus

Für den Versuch wurde die Flussstraße unter einem Mikroskop bei 20x-Vergrößerung betrachtet und mit einer Schwarz-Weiß-Kamera gefilmt. Es wurde auf die Ebene der Endothelzellen fokussiert, um am Endothel rollende oder adhärierende Zellen deutlich sehen zu können. Flusskammer und Kamera wurden so ausgerichtet, dass sich die Zellen horizontal durch das Bild bewegten. Die Videos wurden zur Auswertung im VCD-Format auf einen CD-Rohling gespeichert.

Von jedem Durchlauf, d.h. von jedem HUVEC-beschichteten Deckgläschen, wurde nach dem Entlüften eine Vorlaufzeit von 10min bei konstantem Fluss mit einer Videoaufnahme dokumentiert.

Anschließend wurden mind. vier Aufnahmen von je 42s Länge an verschiedenen Stellen der Flusskammer angefertigt. Diese Stellen mussten repräsentativ für den gesamten Versuchsdurchlauf sein. Es wurde darauf geachtet, dass die aufgenommenen Areale möglichst zentral in der Längsachse der Flussstraße lagen und so genügend Abstand von den Ein- und Ausflussstellen bestand, um turbulente Strömungsbedingungen zu vermeiden. Aus gleichem Grund wurden kleine Luftblasen, die in der Vorlaufzeit teilweise entstanden waren, weiträumig ausgespart.

2.6.4 Auswertung der Flusskammer mit MonoMac6

Zur Auswertung der Flusskammerversuche wurden die Videoaufnahmen von 42s Länge verwendet. Jede Aufnahme zeigte eine Fläche von 0,288 mm².

Als „rollende Zellen“ wurden diejenigen Zellen definiert, die deutlich langsamer als die anderen Zellen flossen und nahe der Fokusebene der HUVEC lagen. Unschärf dargestellt Zellen konnten nicht wie gefordert am Endothel rollen.

Als „adhärierende Zellen“ wurden diejenigen Zellen definiert, die während der 42s einer Aufnahme zu irgendeinem Zeitpunkt stationär an der Endothelwand hafteten. Wurde eine rollende Zelle adhärent, so wurde sie nur als adhärierende Zelle gezählt.

Die Aufnahmen wurden verblindet ausgezählt, sodass beim Zählen nicht bekannt war, zu welchen Versuchsansatz die Aufnahme gehört.

Zur statistischen Auswertung wurden alle Durchläufe eingeschlossen, bei denen ein homogenes Adhäsions- und Rollverhalten am Endothelrasen zu beobachten war.

Es wurden jeweils fünf chronologisch aufeinanderfolgende Deckgläser einer Versuchsgruppe zusammengefasst.

Aus den so erhaltenen Werten wurden die Mittelwerte der Ansätze berechnet.

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS Statistics Premium 21.

Zum Vergleich der Gruppen wurde der arithmetische Mittelwert sowie der Standardfehler (standard error of the mean) ermittelt.

Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mit dem t-Test für Mittelwerte unabhängiger Stichproben getestet. Als signifikant wurden Ergebnisse angesehen, bei denen die Irrtumswahrscheinlichkeit p geringer als 0,05 war. Ergebnisse mit signifikantem Unterschied sind in den Graphiken mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 *In-vivo-Modell myokardialer Ischämie und Reperfusion*

3.1.1 **Infarktmorphologie von mit anti-CD147 behandelten Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion in einem therapeutischen Setting**

Bei Mäusen wurde durch die Ligatur des Ramus interventricularis anterior (left anterior descending, LAD) eine kardiale Ischämie erzeugt und nach 30min wieder reperfundiert. Zehn Minuten vor Reperfusion sowie sechs und 18 Stunden danach wurde Mäusen der Versuchsgruppe anti-CD147-Antikörper injiziert. Die Mäuse der Negativkontrolle erhielten nach demselben Schema unspezifischen IgG-Antikörper (Isotyp). Nach 24 Stunden wurden die Mäuse getötet, die Herzen in Scheiben geteilt und fotografiert. Anschließend wurden von den Herzscheiben histologische Schnitte angefertigt.

3.1.1.1 *Infarktgröße relativ zum Ischämiegebiet (Area at Risk)*

Die Schnittflächen der distal der LAD-Ligatur gelegenen Herzscheiben wurden fotografiert. In unserer Arbeitsgruppe wurde auf diesen Fotografien das zugrunde gegangene Myokard (Infarktareal) sowie das von der Minderperfusion betroffene Gewebe (Area at Risk, Ischämiegebiet) ausgemessen. Die relative Infarktgröße gibt das Verhältnis von Infarktareal zur Area at Risk wieder:

$$\text{relative Infarktgröße} = \frac{\text{Infarktareal}}{\text{Area at Risk}}$$

Der statistische Vergleich der relativen Infarktgrößen beider Versuchsgruppen ergibt:

Isotyp-Antikörper: 55,8% ± 5,7 %

anti-CD147: 34,4% ± 8,6 %

Der Unterschied ist signifikant (p=0,012).

Die relative Infarktgröße 24h nach Ischämie/Reperfusion konnte durch die therapeutische Behandlung mit anti-CD147 in der Versuchsgruppe signifikant um gut ein Drittel

gesenkt werden (Abb. 3.1).

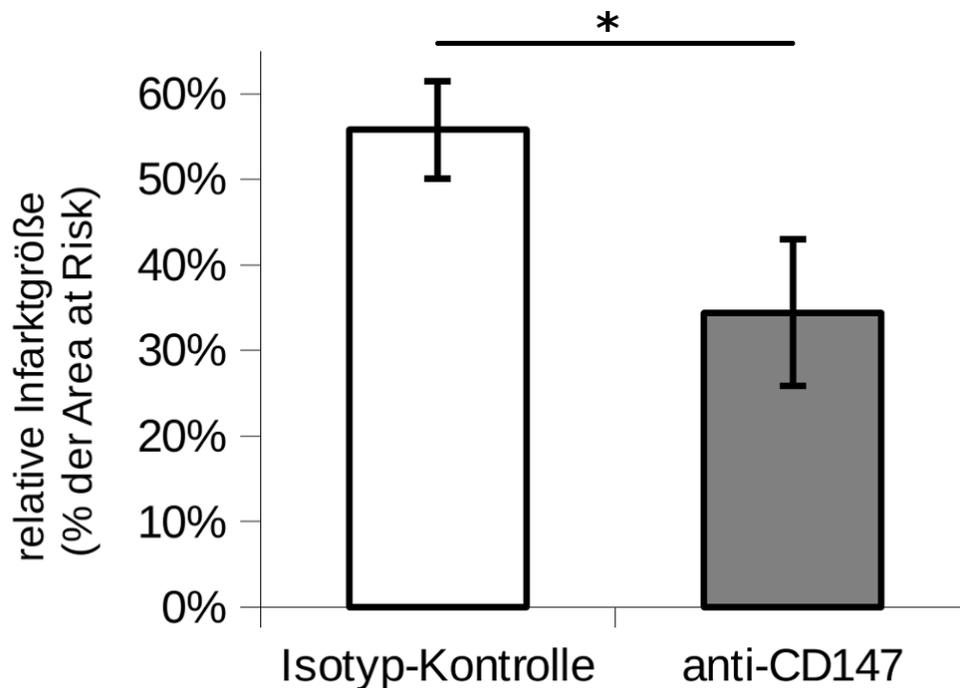


Abb. 3.1: Durch Behandlung mit anti-CD147 wird die relative Infarktgröße 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion deutlich verkleinert.

Bei Mäusen wurde durch Ligatur der LAD eine vorübergehende Ischämie erzeugt. Zehn Minuten vor sowie sechs und 18 Stunden nach Reperfusion wurde anti-CD147-AK oder unspezifischer Isotyp-AK verabreicht. Nach 24 Stunden wurde mittels Evans-Blue-Färbung das Ischämiegebiet abgegrenzt und die Euthanasie durchgeführt. Auf Schnitten des Herzens wurde die Infarktfläche in Relation zum Ischämiegebiet bestimmt. Die mit anti-CD147 behandelte Gruppe zeigt eine deutlich geringere Infarktgröße als die Kontrollgruppe (n=7). In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ochmann. Publiziert in ⁶⁶

AK: Antikörper; LAD: left anterior descending; *: $p < 0,05$.

3.1.1.2 Zelldichte im Infarkt-Grenzgebiet

Mit einer HE-Färbung wurden die Zellkerne so angefärbt, dass es möglich war, die Anzahl der Zellen zu bestimmen.

Im Randgebiet des Infarktes wurden repräsentative Flächen ausgewählt, in denen eine hohe Zelldichte anzeigte, dass hier Immunzellen in das Infarktgebiet migrieren. In den ausgewählten Arealen wurden alle enthaltenen Zellen gezählt.

Um die Zelldichte zu ermitteln, wurde die Anzahl der gezählten Zellen in einer markierten Fläche durch die Größe der Fläche geteilt:

$$\text{Zelldichte} = \frac{\text{Anzahl Zellen}}{\text{enthaltende Fläche}}$$

Aus den einzelnen Ergebnissen wurden die Mittelwerte der Mäuse berechnet, sodass der Vergleich der Mäuse beider Versuchsgruppen folgendes Resultat zeigt:

Isotyp-Antikörper: 6588,4 ± 827,4 Zellen/mm²

anti-CD147: 3271,0 ± 223,9 Zellen/mm²

Der Unterschied ist signifikant (p=0,002).

In der mit anti-CD147 behandelten Gruppe ist 24h nach Ischämie/Reperfusion die Zelldichte im Gebiet der einwandernden Immunzellen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant auf etwa die Hälfte verringert (Abb. 3.2).

Um sicherzustellen, dass der beobachtete Unterschied in der Zelldichte nicht darauf zurückzuführen ist, dass in den beiden Versuchsgruppen unterschiedlich große Areale zur Auswertung gewählt wurden, wurden die ausgewerteten Flächen beider Versuchsgruppen verglichen.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass in beiden Gruppen annähernd gleich große Flächen zur Bestimmung der Zelldichte ausgewählt wurden. Der geringe Unterschied ist nicht signifikant.

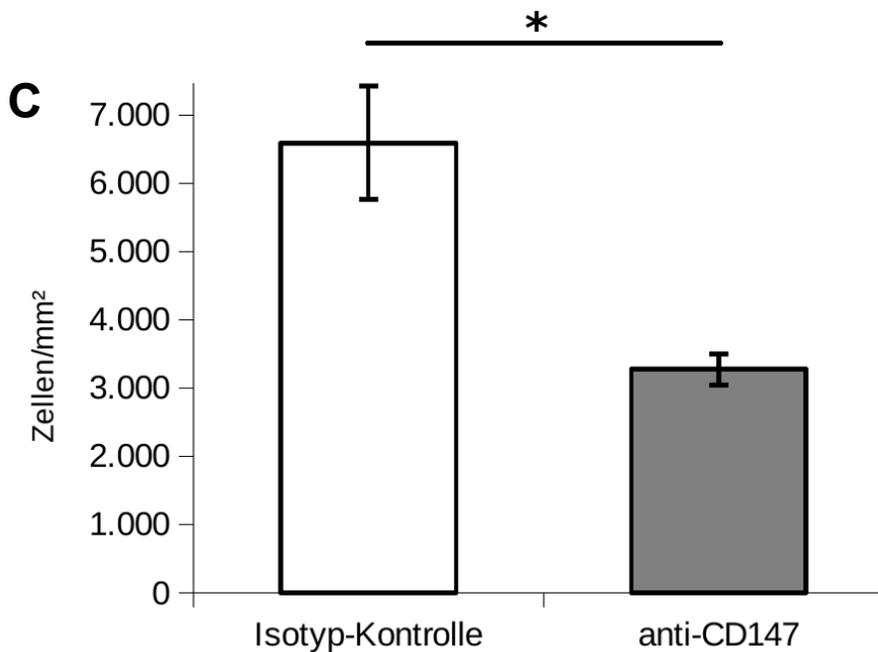
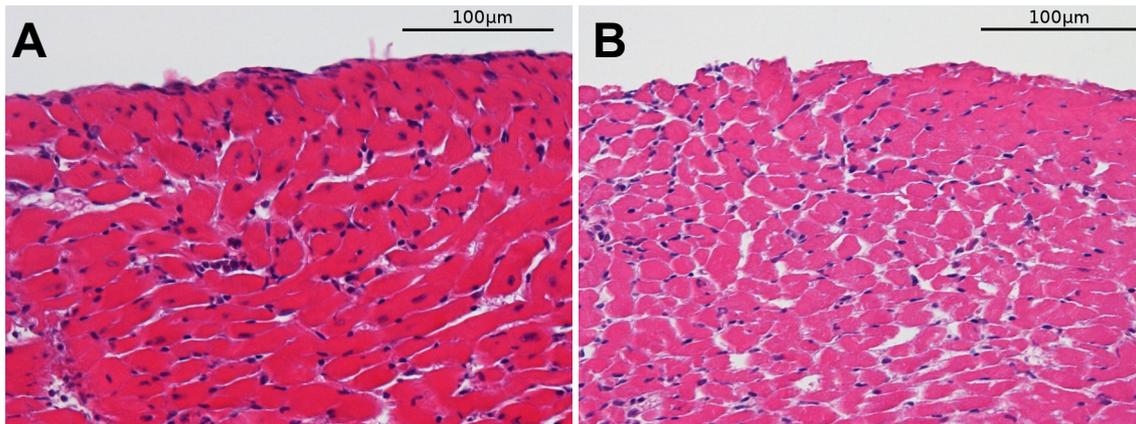


Abb. 3.2: Die therapeutische Behandlung mit anti-CD147 verringert die Zelldichte im Infarkt-Grenzgebiet 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion.

Bei Mäusen wurde durch LAD-Ligatur eine zeitweise kardiale Ischämie erzeugt und therapeutisch anti-CD147-AK bzw. unspezifischer Isotyp-AK injiziert. Im Grenzgebiet des Infarktes, in dem sich einwandernde Immunzellen befinden, wurde auf HE-gefärbten histologischen Schnitten die Zelldichte bestimmt.

A: HE-Färbung einer mit Isotyp-AK behandelten Maus mit hoher Zelldichte im Randbereich des Infarktes.

B: HE-Färbung einer mit anti-CD147-AK behandelten Maus im Infarkt-Randbereich; besonders basal zeigt sich eine verringerte Zelldichte im Vergleich zur Kontrollgruppe.

C: In der quantitativen Auswertung zeigt sich bei der anti-CD147-behandelten Versuchsgruppe eine signifikant geringere Zelldichte (n=7).

LAD: left anterior descending; mm: Millimeter; AK: Antikörper; *:p<0,05.

3.1.1.3 Fibrose im Infarkt-Grenzgebiet

An histologischen Schnitten aus der Umgebung der oben ausgewerteten Schnitte der Mäuseherzen wurde eine Masson-Goldner-Trichromfärbung durchgeführt. Diese färbt Kollagenfasern deutlich grün an. So können ältere Narben oder Herzklappen sicher von dem in dieser Färbung rot gefärbten Infarkt- und gesunden Herzgewebe unterschieden werden.

Abb. 3.3 zeigt exemplarisch Infarkt-Randgebiete, die repräsentativ für die ausgewerteten Areale sind. Das Infarktgebiet stellt sich in blassem Rot dar.

24 Stunden nach Ischämie und Reperfusion ist in beiden Versuchsgruppen im Bereich des Infarkts keine Fibrose nachweisbar.

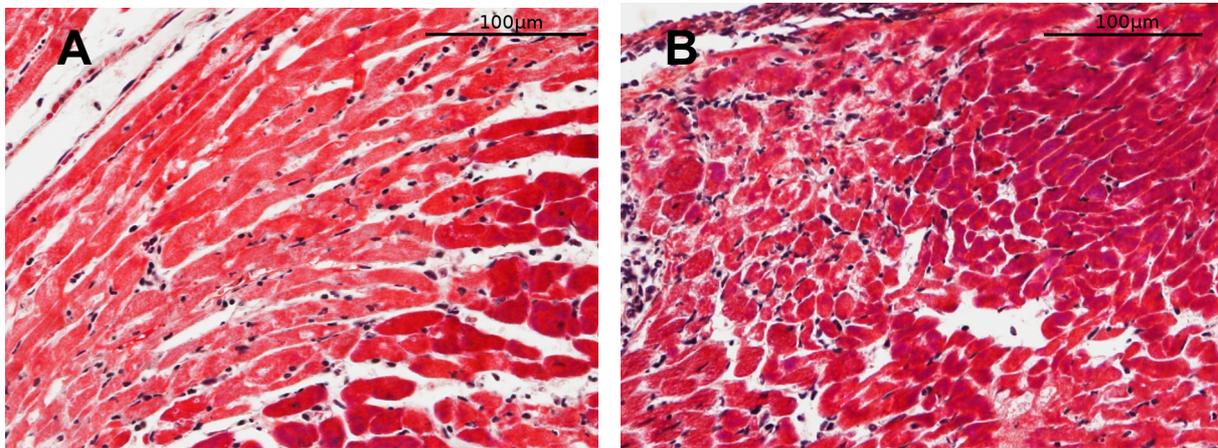


Abb. 3.3: Die Infarkt-Randgebiete zeigen 24 Stunden nach Ischämie und Reperfusion keine Fibrose.

Bei Mäusen wurde eine temporäre kardiale Ischämie erzeugt. Wie oben beschrieben wurde vor und nach der Reperfusion anti-CD147-AK bzw. unspezifischer Isotyp-AK appliziert. 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion wurden die Mäuse getötet und die Herzen histologisch aufbereitet.

In der dargestellten Masson-Goldner-Trichromfärbung aus dem Grenzbereich der Infarkte zeigt sich der Infarkt charakteristisch in blassem Rot. Eine grüne Färbung, die Kollagen anzeigt, ist nicht zu erkennen.

A: Mit Isotyp-AK behandelte Maus. **B:** Mit anti-CD147 behandelte Maus

AK: Antikörper.

3.1.2 Infarktmorphologie von mit anti-CD147 behandelten Mäusen 28 Tage nach Ischämie/Reperfusion in einem therapeutischen Setting

Bei Mäusen wurde durch 30-minütige Ligatur der LAD gezielt eine Ischämie des Herzmuskels erzeugt. Die Mäuse der Versuchsgruppe erhielten zehn Minuten vor der Reperfusion sowie 6 und 18h danach anti-CD147-Antikörper injiziert. In der folgenden Woche wurde der Antikörper einmal täglich verabreicht. Die Kontrollgruppe bildeten Mäuse, denen nach demselben Schema unspezifische Isotyp-Antikörper appliziert wurden. 28 Tage nach Ischämie/Reperfusion wurden die Mäuse euthanasiert, das Herz in Scheiben geteilt und fotografiert.

3.1.2.1 Infarktgröße relativ zum Ischämiegebiet (Area at Risk)

Die Schnittflächen der distal der Ligatur gelegenen Herzscheiben wurden fotografiert. So wurde in Versuchen unserer Arbeitsgruppe, analog zu Kapitel 3.1.1.1, das abgestorbene Myokard (Infarktareal) sowie das von der Ischämie betroffene Gewebe (Area at Risk) ausgemessen und daraus die relative Infarktgröße bestimmt.

Der statistische Vergleich der Infarktgröße beider Versuchsgruppen ergibt:

Isotyp-Antikörper: 65,1% ± 4,2 %

anti-CD147: 42,8% ± 3,9 %

Der Unterschied ist signifikant (p=0,001).

Die relative Infarktgröße 28 Tage nach Ischämie/Reperfusion konnte durch die therapeutische Behandlung mit anti-CD147 signifikant gesenkt werden (Abb. 3.4). Das Ausmaß des Effekts entspricht etwa der bereits in der Frühphase 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion beobachteten Reduktion der Infarktgröße um ein Drittel (siehe Kapitel 3.1.1.1)..

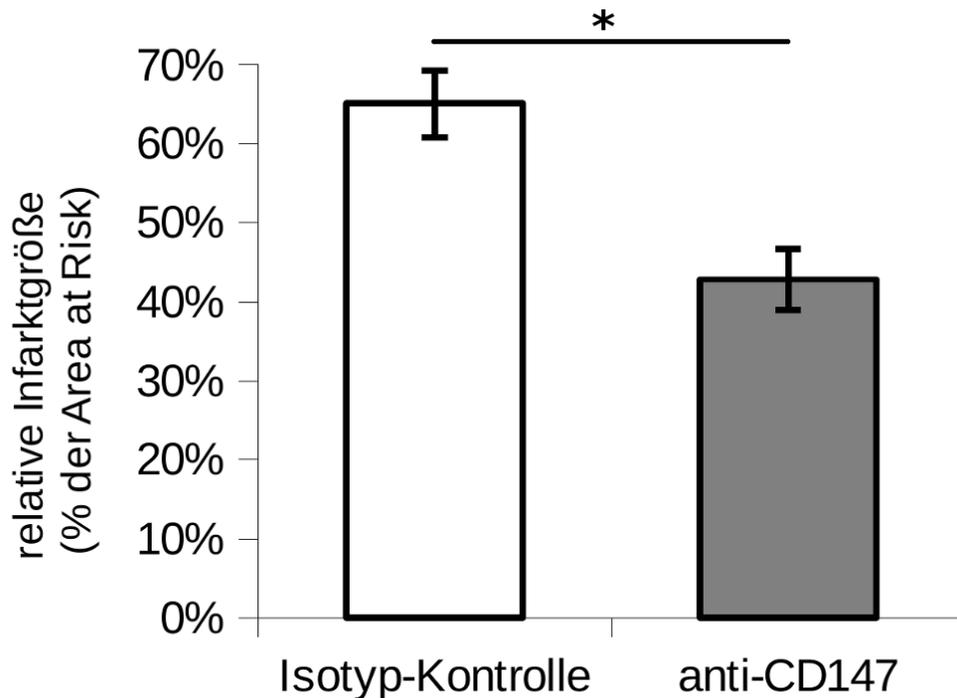


Abb. 3.4: Durch Behandlung mit anti-CD147 wird die relative Infarktgröße 28 Tage nach Ischämie/Reperfusion vermindert

Bei Mäusen wurde durch Ligatur der LAD eine Ischämie erzeugt und vor der Reperfusion anti-CD147-AK bzw. unspezifischer Isotyp-AK injiziert. Nach 28 Tagen wurde mittels Evans-Blue-Färbung das Ischämiegebiet abgegrenzt und die Euthanasie durchgeführt. An Schnitten der Herzen wurde die Infarktgröße in Relation zum Ischämieareal bestimmt. Bei der mit anti-CD147 behandelten Gruppe zeigt sich eine deutliche Abnahme der Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=5). In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ochmann. Publiziert in ⁶⁶
 AK: Antikörper; LAD: left anterior descending; *: p<0,05.

3.1.2.2 Myokardiale Fibrosefläche relativ zur Gesamtfläche

Um zu prüfen, ob ein Unterschied in der Größe der myokardialen Fibrosefläche zwischen der mit anti-CD147 behandelten Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe besteht, wurde an histologischen Schnitten nach einer Masson-Goldner-Trichromfärbung die Fibrosefläche verglichen.

Hierzu wurde die Ausdehnung der myokardialen Fibrose relativ zur Gesamtfläche des jeweiligen Schnittes betrachtet:

$$\text{Anteil der Fibrosefläche} = \frac{\text{absolute Fibrosefläche}}{\text{Gesamtfläche des Schnittes}}$$

Es zeigt sich im statistischen Vergleich der Fibroseanteile beider Versuchsgruppen fol-

gendes Ergebnis:

Isotyp-Antikörper: 20,2% ± 5,5%

anti-CD147: 13,2% ± 3,2%

Der Unterschied ist nicht signifikant ($p=0,296$).

Die Ausdehnung der infolge des Infarktes entstandenen Fibrose im Myokard ist bei der mit Antikörper gegen CD147 therapierten Gruppe durchschnittlich etwa ein Drittel geringer als bei der Kontrollgruppe, welche mit unspezifischem Antikörper behandelt wurde. Der beobachtete Unterschied der Mittelwerte ist jedoch nicht signifikant (Abb. 3.5).

Um eine mögliche Verzerrung durch stark unterschiedliche Größen der ausgewerteten histologischen Schnitte zu überprüfen, wurden die einzelnen Gesamtflächen der verwendeten Schnitte verglichen. Es zeigte sich dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

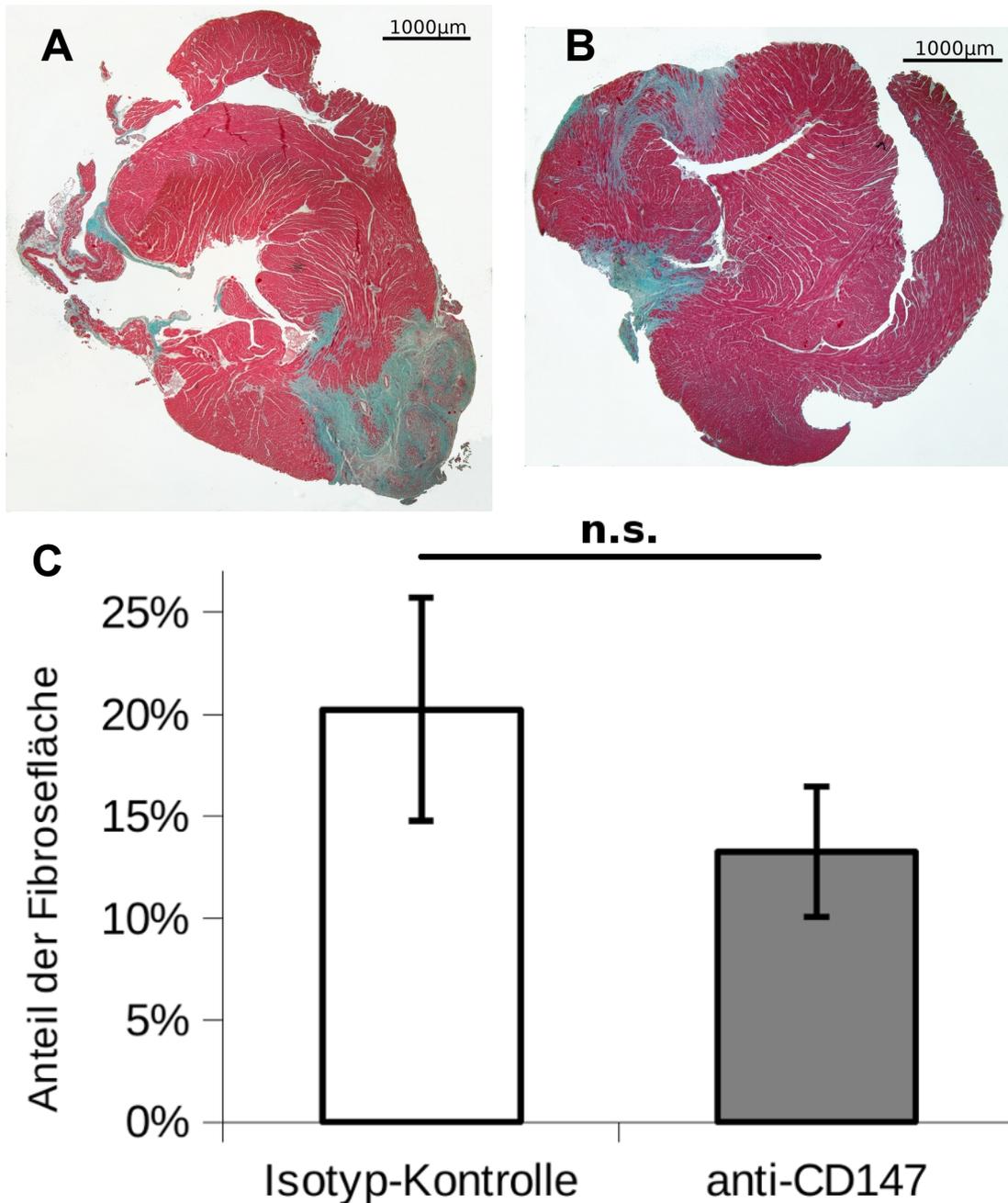


Abb. 3.5: Bei therapeutischer Gabe von anti-CD147 zeigt sich 28 Tage nach Ischämie/Reperfusion eine nicht signifikante Verringerung des myokardialen Fibroseanteils.

Bei Mäusen wurde durch transiente LAD-Ligatur eine kardiale Ischämie erzeugt. Therapeutisch wurde anti-CD147-AK oder unspezifischer Isotyp-AK injiziert. 28 Tage nach Ischämie/Reperfusion wurden die Mäuse getötet und histologische Schnitte der Herzen angefertigt. An der maximalen Ausdehnung der myokardialen Fibrose wurde in einer Masson-Goldner-Trichromfärbung der Anteil der Fibrosefläche an der Gesamtfläche des jeweiligen Schnittes verglichen.

In der Kontrollgruppe (**A**) ist der Anteil der grün gefärbten Fibrosefläche ausgedehnter als in der mit anti-CD147 behandelten Versuchsgruppe (**B**). In der quantitativen Auswertung (**C**) zeigt sich bei der mit anti-CD147 behandelten Gruppe eine Verringerung der relativen myokardialen Fibrosefläche gegenüber der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant (n=7).

AK: Antikörper; LAD: left anterior descending, n.s.: nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

3.2 Adhäsionsverhalten von MonoMac6-Zellen an stimulierten Endothelzellen unter Flussbedingungen *in vitro*.

Die Monozytenrekreturierung bei myokardialer Schädigung setzt sich aus mehreren Schritten zusammen, an deren Anfang das intravasale monozytäre Rollen und die anschließende feste Adhäsion am Endothel steht. Es schließt sich die Transmigration über die Endothelschicht an, bevor die interstitielle Migration zum Entzündungsherd erfolgt.⁶²

Im Folgenden soll die kritische erste Phase der Monozyten-Invasion untersucht werden, in der es zum Rollen und zur festen Adhäsion der Monozyten kommt. Um deren Adhäsionsverhalten am Endothel von Arterien zu untersuchen, wurden *in vitro* Versuche in einer Flusskammer durchgeführt. Als Modell dienten dabei Zellen der monozytären Zelllinie MonoMac6. Diese wurden in konstantem Fluss unter arteriellen Scherbedingungen über HUVEC-beschichtete Deckgläser geleitet.

Die HUVEC wurden zuvor für vier bis sechs Stunden mit 20ng/ml IFN- γ und 50ng/ml TNF- α inkubiert, um das aktivierte Endothel in einem Entzündungsprozess zu simulieren. Je nach Ansatz wurden die MonoMac6-Zellen unstimuliert verwendet oder waren für zwei Stunden mit 100nM CyPA stimuliert worden. Abhängig von der Versuchsgruppe hatte ggf. eine Vorinkubation mit den zu testenden Inhibitoren stattgefunden.

Es wurden repräsentative Videoaufnahmen von 42s Länge angefertigt. Mithilfe dieser Aufnahmen wurde verblindet ausgewertet, wie viele MonoMac6-Zellen in dieser Zeit im Sichtfeld am Endothel anhafteten („Adhärierende“) und wie viele Zellen durch losen Kontakt mit dem Endothel verlangsamt flossen und so monozytäres Rollen zeigten.

3.2.1 CyPA-induzierte Adhäsion

In Vorversuchen wurde zunächst bestätigt, dass es es beim genannten Versuchsaufbau durch Stimulation mit CyPA zu der bekannten Zunahme des Rollens und der Adhäsion von MonoMac6-Zellen kommt (vgl. Kapitel 1.4.1).

Als Kontrolle dienten mit Medium inkubierte, unstimulierte MonoMac6-Zellen.

3.2.2 Einfluss des extrazellulären CyPA-Inhibitors MM284 auf die CyPA-induzierte Adhäsion

Um die Wirkung von CyPA auf die Adhäsion von MM6-Zellen näher zu untersuchen, wurden MM6-Zellen mit MM284 vorinkubiert und anschließend mit CyPA stimuliert. Das kürzlich entwickelte nicht immunsuppressive CsA-Derivat MM284 dringt nicht in die Zelle ein und blockiert dadurch ausschließlich extrazelluläres CyPA.⁸⁸ So kann gezielt untersucht werden, in welchem Umfang die beobachtete Stimulation durch CyPA vermittelt wird, welches sich außerhalb der Zellen befindet ohne eine Interaktion mit intrazellulärem CyPA in Kauf nehmen zu müssen.⁸⁹

Beim Inhibitoransatz wurden die MM6-Zellen für 15-20min mit 200nM MM284 vorbehandelt, bevor wie bei der Positivkontrolle 100nM CyPA zugegeben wurde und die Zellen für zwei Stunden inkubiert wurden.

Die Negativkontrolle wurde lediglich mit Medium ohne CyPA versetzt.

Aus den Mittelwerten der Deckgläser werden 6 Gruppen der unstimulierten Negativkontrolle, 6 Gruppen der Positivkontrolle und 5 Gruppen des Ansatzes mit MM284 gebildet und im Folgenden ausgewertet.

Die Werte der in 42s adhärierenden Zellen werden chronologisch zu Gruppen zusammengefasst. Aus den Mittelwerten der Gruppen wird für die verschiedenen Ansätze der Mittelwert bestimmt:

unstimuliert: $0,83 \pm 0,18$

CyPA: $2,30 \pm 0,35$

MM284 + CyPA: $1,01 \pm 0,23$

Der Unterschied zwischen Inhibitoransatz und Positivkontrolle ist signifikant ($p=0,015$).

Die mit MM284 blockierten MM6-Ansätze zeigen nach CyPA-Inkubation signifikant weniger adhärierende Zellen an aktiviertem Endothel als MM6-Zellen der Positivkontrolle ohne Inhibitor (Abb. 3.6).

Der Effekt von extrazellulärem CyPA wurde durch MM284 stark vermindert, sodass trotz CyPA-Stimulation nur 22% mehr Adhärierende als bei der unstimulierten Negativ-

kontrolle gezählt wurden. Ohne Inhibitor zeigte sich bei Stimulation mit CyPA eine Zunahme um 177%.

Aus den Gruppen-Mittelwerten der beobachteten rollenden MonoMac6 ergeben sich folgende Mittelwerte der Ansätze:

unstimuliert: $2,06 \pm 0,50$

CyPA: $5,49 \pm 1,93$

MM284 + CyPA: $2,66 \pm 1,41$

Der Unterschied zwischen Inhibitoransatz und Positivkontrolle ist nicht signifikant ($p=0,269$).

Gegenüber der Positivkontrolle zeigen mit MM284 vorinkubierte MM6-Zellen eine tendenziell verringerte Zahl rollender Zellen. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant (Abb.3.6).

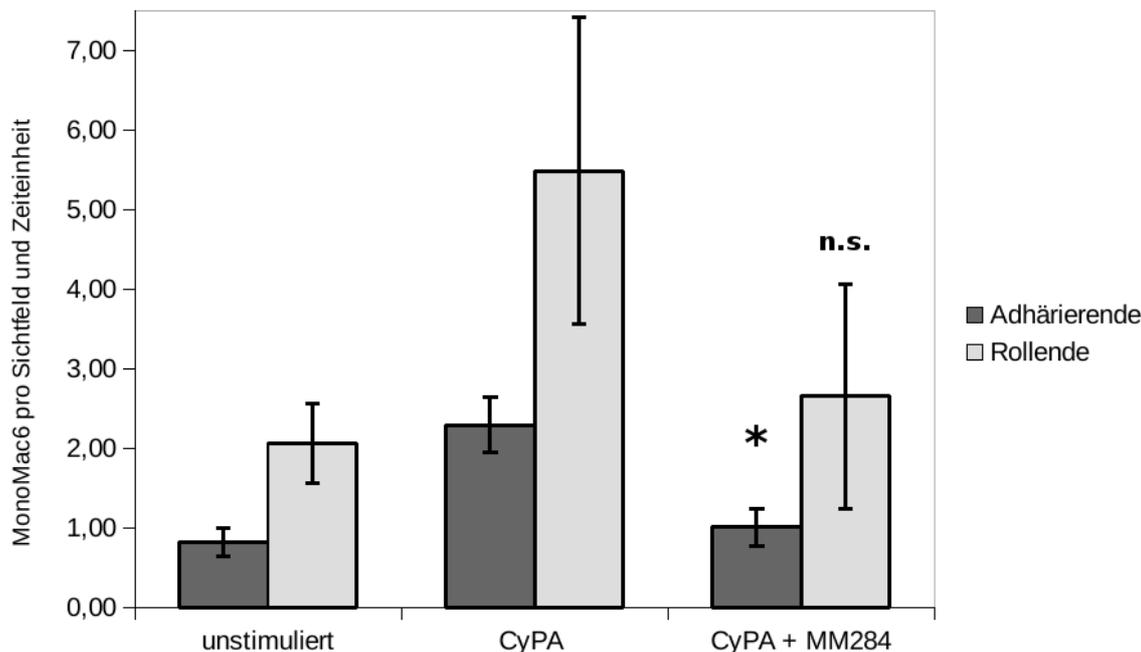


Abb. 3.6: Inhibition von extrazellulärem CyPA hemmt die durch CyPA vermittelte Adhäsion von MonoMac6-Zellen an aktiviertem Endothel.

Wie unter „Material und Methoden“ beschrieben strömten MM6-Zellen (2×10^5 Zellen/ml) in einer Flusskammer unter arteriellen Strömungsbedingungen über humane Endothelzellen (HUVEC). Die Ansätze wurden mit MM284 (200nM) bzw. Medium vorinkubiert. Inhibitoransatz und Positivkontrolle wurden dann für zwei Stunden mit CyPA (100nM) stimuliert.

In Videoaufnahmen wurden adhärierende und rollende Zellen im Sichtfeld pro Zeiteinheit gezählt. Die Ergebnisse wurden gruppiert und daraus die gezeigten Mittelwerte der Ansätze gebildet ($n \geq 5$).

Mit MM284 inhibierte MM6-Zellen zeigen nach CyPA-Stimulation signifikant weniger adhärierende Zellen als die nicht inhibierte Positivkontrolle.

Nach Inkubation mit MM284 zeigen MM6-Zellen eine nicht signifikant verringerte Zahl rollender Zellen gegenüber der nicht-inhibierten Positivkontrolle.

CyPA: Cyclophilin A; HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; ml: Milliliter; MM6: MonoMac6; nM: nanomolar; *: $p < 0,05$ gegenüber nicht-inhibierter Positivkontrolle; n.s.: nicht signifikant ($p \geq 0,05$) gegenüber nicht-inhibierter Positivkontrolle.

3.2.3 Einfluss einer Phosphoinositid-3-Kinase-Hemmung durch Ly294002 auf die CyPA-induzierte Adhäsion

Ein Versuchsansatz mit Ly294002 wurde durchgeführt, um zeigen, in welchem Umfang der PI3K-Akt-Signalweg in MonoMac6 an der Stimulation durch CyPA beteiligt ist. Ly294002 hemmt reversibel die PI3K-Isoformen β und δ ¹⁵³.

Die MM6-Zellen der Testgruppe wurden 15-20min mit $20 \mu\text{M}$ Ly294002 vorinkubiert, bevor für zwei Stunden 100nM CyPA zugegeben wurde. Die Positivkontrolle bildeten für zwei Stunden mit 100nM CyPA stimulierte MM6-Zellen, für die Negativkontrolle waren die Zellen mit Medium inkubiert worden.

Aus den Mittelwerten der Deckgläser werden je 6 Gruppen der unstimulierten Negativkontrolle, der Positivkontrolle und des Ansatzes mit Ly294002 gebildet und für die folgende Berechnung verwendet.

Zur Auswertung werden aus den gruppierten Werten der in 42s gezählten adhärierenden Zellen die Mittelwerte der Ansätze berechnet. Es ergibt sich:

unstimuliert: $0,83 \pm 0,18$

CyPA: $2,30 \pm 0,35$

Ly + CyPA: $1,25 \pm 0,12$

Der Unterschied zwischen Inhibitoransatz und Positivkontrolle ist signifikant ($p=0,028$).

In Abb. 3.7 ist dargestellt, dass in dem Ansatz, der mit dem PI3K- β/δ -Inhibitor Ly behandelt wurde, unter CyPA-Stimulation signifikant weniger adhärierende MonoMac6 zu messen sind als in der mit CyPA stimulierten Positivkontrolle ohne Inhibitor.

Zum Vergleich der Ergebnisse für rollende MonoMac6-Zellen werden aus den Gruppen-Mittelwerten die Mittelwerte der Ansätze errechnet:

unstimuliert: $2,06 \pm 0,50$

CyPA: $5,49 \pm 1,93$

Ly + CyPA: $3,01 \pm 1,23$

Der Unterschied zwischen Inhibitoransatz und Positivkontrolle ist nicht signifikant ($p=0,308$).

Gegenüber der CyPA-stimulierten Positivkontrolle zeigt sich bei dem mit Ly294002 inhibierten Ansatz eine verringerte Anzahl von rollenden Zellen. Der Unterschied stellt sich jedoch nicht signifikant dar (Abb.3.7).

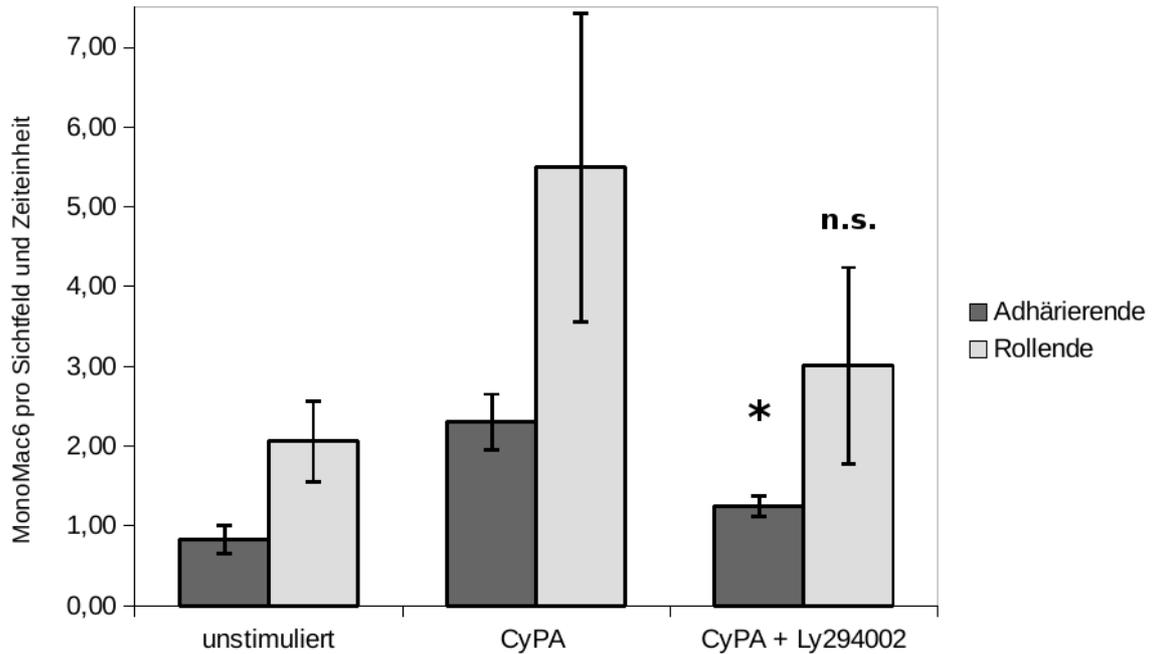


Abb. 3.7: Phosphoinositid-3-Kinase-Inhibition mit Ly294002 vermindert die Adhäsion CyPA-stimulierter MonoMac6-Zellen an aktiviertem Endothel.

MM6-Zellen wurden wie unter „Material und Methoden“ beschrieben unter arteriellen Strömungsbedingungen über humane Endothelzellen (HUVEC) perfundiert (2×10^5 Zellen/ml). Die Zellen wurden mit Ly ($20 \mu\text{M}$) bzw. Medium vorinkubiert. Anschließend wurden Positivkontrolle und Ly-Ansatz für zwei Stunden mit CyPA (100 nM) stimuliert.

In aufgenommenen Videosequenzen wurden am Endothel adhärerende und rollende Zellen im Sichtfeld pro Zeiteinheit gezählt. Mittelwerte der Ansätze wurden aus den gruppierten Deckglas-Ergebnissen gebildet ($n=6$).

Mit Ly inhibierte MM6-Zellen zeigen nach CyPA-Stimulation signifikant weniger adhärerende Zellen als die nicht gehemmte Positivkontrolle. Die Anzahl an Endothel rollender Zellen wird durch Inhibition mittels Ly nicht signifikant verringert.

CyPA: Cyclophilin A; HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; Ly: Ly294002; ml: Milliliter; MM6: MonoMac6; nM: nanomolar; μM : mikromolar; *: $p < 0,05$ gegenüber nicht-inhibierter Positivkontrolle; n.s.: nicht signifikant ($p \geq 0,05$) gegenüber nicht-inhibierter Positivkontrolle.

3.2.4 Einfluss einer Phosphoinositid-3-Kinase-Hemmung durch Wortmannin auf die CyPA-induzierte Adhäsion

Ein bekannter, irreversibler Inhibitor aller PI3K-Isoformen ist Wortmannin.¹⁵³ In diesem Versuchsteil wurden im Testansatz MM6-Zellen für 15-20min mit 100 nM Wortmannin inkubiert. Anschließend wurde zum Inhibitoransatz und zur Positivkontrolle für zwei Stunden 100 nM CyPA gegeben.

Die Negativkontrolle blieb unstimuliert und wurde lediglich mit Medium inkubiert.

Aus den Ergebnissen der Deckgläser werden 6 Gruppen der unstimulierten Negativkontrolle, 6 Gruppen der Positivkontrolle und 5 Gruppen des Ansatzes mit Wortmannin gebildet und zur folgenden Auswertung verwendet.

Es wird für jeden Ansatz der Mittelwert an Zellen errechnet, die in 42s an HUVEC adhärirten:

unstimuliert: $0,83 \pm 0,18$

CyPA: $2,30 \pm 0,35$

Wortmannin + CyPA: $1,16 \pm 0,14$

Der Unterschied zwischen dem Inhibitoransatz und der CyPA-Positivkontrolle ist signifikant ($p=0,021$).

Die zuerst mit dem PI3K-Inhibitor Wortmannin inkubierten MM6-Zellen zeigen nach CyPA-Stimulation eine signifikant geringere Adhärenz an aktiviertem Endothel als die Positivkontrolle, die ohne Inhibitor mit CyPA stimuliert wurde (Abb. 3.8).

Zur Untersuchung des Einflusses von Wortmannin auf das CyPA-stimulierte Rollverhalten wurden Mittelwerte der Anzahl rollender MM6-Zellen pro 42s jedes Ansatzes berechnet:

unstimuliert: $2,06 \pm 0,50$

CyPA: $5,49 \pm 1,93$

Wortmannin + CyPA: $2,27 \pm 0,67$

Der Unterschied zwischen dem Inhibitoransatz und dem CyPA-Ansatz ist nicht signifikant ($p=0,18$).

Wie bei den Inhibitoren MM284 und Ly294002 besteht bei MM6-Zellen, die mit Wortmannin vorinkubiert wurden in Bezug auf die rollenden Zellen kein signifikanter Unterschied zur Positivkontrolle:

Mit Wortmannin blockierte monozytäre Zellen zeigen im Mittel zwar weniger Rollen als der mit CyPA stimulierte Ansatz ohne Inhibitor (Abb. 3.8). Im Gegensatz zum hemmenden Effekt von Wortmannin auf die Adhäsion von MonoMac6 ist die inhibierende Wirkung auf rollende Zellen aber nicht signifikant.

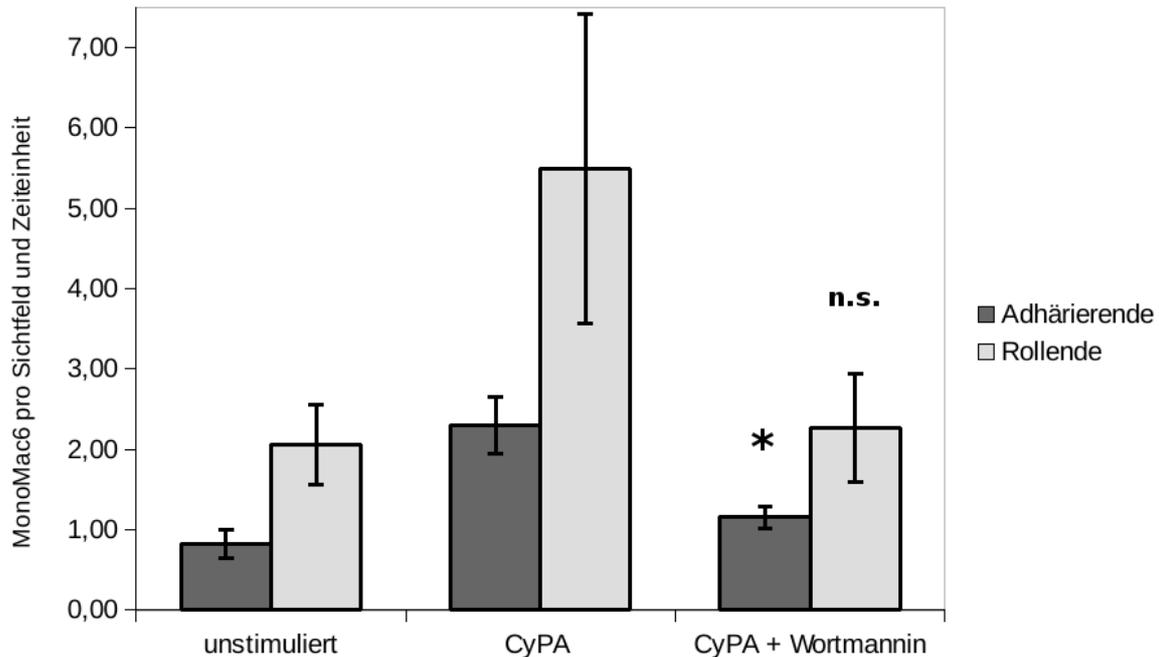


Abb. 3.8: Phosphoinositid-3-Kinase-Inhibition mit Wortmannin hemmt die Adhäsion von CyPA-stimulierten MonoMac6-Zellen an aktiviertem Endothel.

In einer Flusskammer wurden MM6-Zellen (2×10^5 Zellen/ml) unter arteriellen Strömungsbedingungen über aktivierte humane Endothelzellen (HUVEC) geleitet. Die Zellen wurden wie unter „Material und Methoden“ beschrieben mit Wortmannin (100nM) bzw. Medium vorinkubiert, bevor Wortmannin-Ansatz und Positivkontrolle für zwei Stunden mit CyPA (100nM) stimuliert wurden.

Im Sichtfeld adhären gewordenen sowie rollende Zellen wurden gezählt und die Ergebnisse gruppiert. Anschließend wurden die abgebildeten Mittelwerte der Ansätze errechnet ($n \geq 5$).

Bei CyPA-stimulierten MM6-Zellen, die zuvor mit Wortmannin inhibiert wurden, sind die adhärenierenden Zellen gegenüber der nicht gehemmten Positivkontrolle signifikant verringert. Bei der Zahl rollender Zellen zeigt sich ein nicht signifikanter Unterschied.

CyPA: Cyclophilin A; HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; ml: Milliliter; MM6: MonoMac6; nM: nanomolar; *: $p < 0,05$ gegenüber nicht-inhibierter Positivkontrolle; n.s.: nicht signifikant ($p \geq 0,05$) gegenüber nicht-inhibierter Positivkontrolle.

3.2.5 Vergleich der Inhibitoren MM284, Ly294002 und Wortmannin

In den Kapiteln 3.2.2 – 3.2.4 wurde gezeigt, dass MM284, Ly294002 und Wortmannin alle die stimulierende Wirkung von CyPA auf MM6-Zellen abschwächen. Die Effekte der Inhibitoren waren sowohl bezüglich der adhären gewordenen Zellen als auch des Rollens verschieden stark ausgeprägt. Um eine Aussage über eine unterschiedliche Wirkung der untersuchten Inhibitoren treffen zu können, werden die Inhibitionseffekte auf die Wirkung von CyPA einander gegenübergestellt.

Es werden die unter 3.2.2 – 3.2.4 für die einzelnen Ansätze beschriebenen Daten verwendet.

Um zu berechnen, wie stark die CyPA-induzierte Adhäsion vom jeweiligen Inhibitor gehemmt wird, wird die Differenz zwischen dem Mittelwert adhärierender MonoMac6 nach CyPA-Stimulation und dem Mittelwert adhärierender Zellen des Inhibitor-Ansatzes gebildet.

Die so errechnete inhibitorbedingte Differenz wird in Relation gesetzt zu der durch CyPA bedingten Zunahme adhärierender MonoMac6 gegenüber dem unstimulierten Ansatz:

$$\text{Hemmeffekt} = \frac{\text{Adh\u00e4rierende}_{\text{CyPA}} - \text{Adh\u00e4rierende}_{\text{CyPA} + \text{Inhibitor}}}{\text{Adh\u00e4rierende}_{\text{CyPA}} - \text{Adh\u00e4rierende}_{\text{unstimuliert}}}$$

Als Mittelwerte der so erhaltenen Hemmwirkung der Inhibitoren auf die CyPA-bedingte Adhäsion ergibt sich:

MM284:	87,3% ± 15,8%
Ly:	71,5% ± 8,3%
Wortmannin:	77,3% ± 7,1%

Der Unterschied zwischen den Ans\u00e4tzen mit MM284 und Ly ist nicht signifikant (p=0,410).

Der Unterschied zwischen den Ans\u00e4tzen mit MM284 und Wortmannin ist nicht signifikant (p=0,603)

Der Unterschied zwischen den Ans\u00e4tzen mit Ly und Wortmannin ist nicht signifikant (p=0,650)

Die Hemmeffekte der drei Inhibitorans\u00e4tze auf die CyPA-induzierte Adh\u00e4sion von monozyt\u00e4ren Zellen unterscheiden sich zwar in geringem Ausma\u00df von einander, jedoch sind diese Unterschiede nicht signifikant (Abb. 3.9). Mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 41% sind die Differenzen zuf\u00e4llig entstanden.

Analog wird der Hemmeffekt der Inhibitoren auf das CyPA-induzierte Rollen von Mo-

noMac6 berechnet:

MM284:	82,5% ± 41,2%
Ly:	72,3% ± 35,8%
Wortmannin :	93,9% ± 19,6%

Der Unterschied zwischen den Ansätzen mit MM284 und Ly ist nicht signifikant (p=0,855).

Der Unterschied zwischen den Ansätzen mit MM284 und Wortmannin ist nicht signifikant (p=0,812)

Der Unterschied zwischen den Ansätzen mit Ly und Wortmannin ist nicht signifikant (p=0,611)

Die beobachteten Unterschiede zwischen den einzelnen Inhibitoren sind auch in Bezug auf das durch CyPA bedingte monozytäre Rollen nicht signifikant (Abb. 3.9). Mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 61,1% sind diese Unterschiede durch Zufall zustande gekommen.

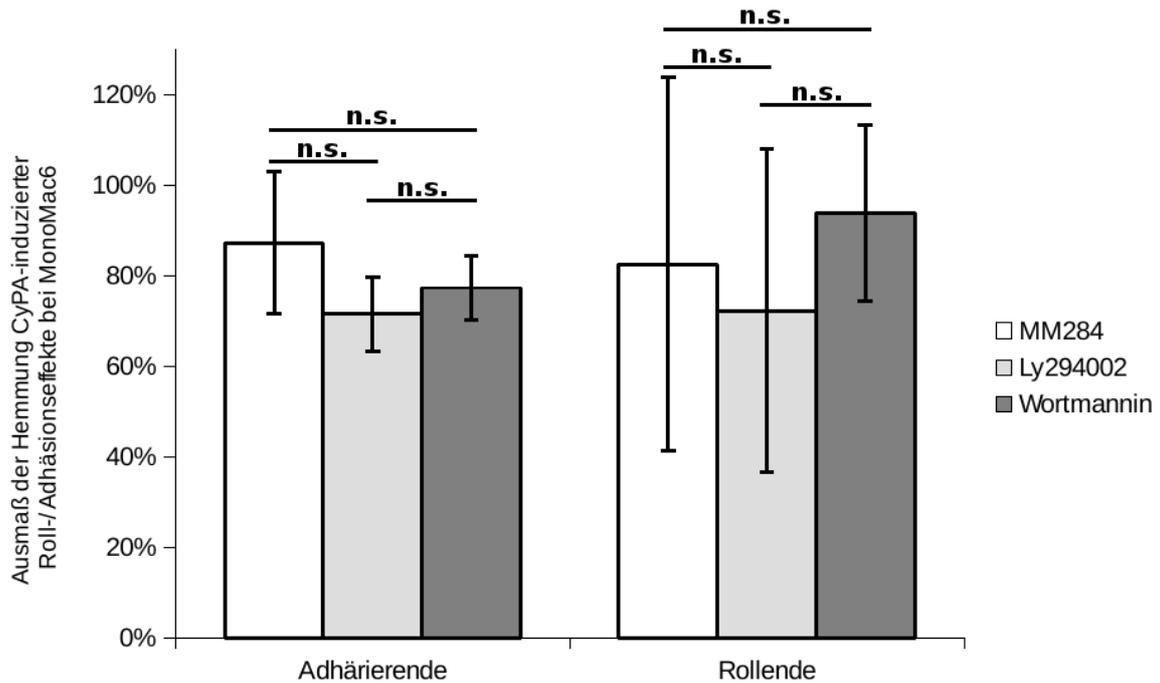


Abb. 3.9: Die Inhibitionseffekte von MM284, Ly und Wortmannin auf CyPA-bedingtes Adhären und Rollen von MonoMac6-Zellen an aktiviertem Endothel unterscheiden sich nur gering und nicht signifikant.

In einer Flusskammer wurden wie unter „Material und Methoden“ beschrieben MM6-Zellen (2×10^5 Zellen/ml) über Endothel geleitet. Die Ansätze der Inhibitoren wurden mit MM284 (200nM), Ly (20 μ M), Wortmannin (100nM) inkubiert, bevor für zwei Stunden CyPA (100nM) zugegeben wurde.

Es wurden rollende und adhären gewordene Zellen im Sichtfeld gezählt. Die Deckglas-Ergebnisse wurden chronologisch gruppiert und daraus die Mittelwerte der Ansätze errechnet ($n \geq 5$).

Die Hemmeffekte der drei Inhibitoren auf CyPA-vermittelte Wirkungen unterscheiden sich untereinander bei adhären und rollenden MonoMac6 nur wenig und nicht signifikant.

CyPA: Cyclophilin A; Ly: Ly294002; ml: Milliliter; MM6: MonoMac6; nM: nanomolar; n.s.: nicht signifikant ($p \geq 0,05$); μ M: mikromolar.

4. Diskussion

Bei einem Myokardinfarkt kommt es durch die Ischämie zum Untergang von Herzmuskelgewebe. In der Folge führt dies zu einer Entzündungsreaktion mit der Einwanderung von Leukozyten.^{5,6,33} Das Ausmaß dieser Inflammation korreliert mit der Mortalität und Morbidität nach dem Herzinfarkt.^{36,47,71,162}

Dieser Studie liegt die Hypothese zugrunde, dass eine ausgeprägte Entzündung zu einem zusätzlichen Myokardschaden führt¹⁶² und dass durch eine Steuerung und Abschwächung dieser Entzündung das Infarktausmaß verringert werden kann. Insbesondere wird postuliert, dass das extrazelluläre inflammatorische Zytokin CyPA und dessen Rezeptor CD147 die Einwanderung von Monozyten vermitteln, die in der Folge zu einem negativen Remodelling führen. Eine Hemmung der CyPA-CD147-Interaktion würde demnach zu einer abgeschwächten Monozyteninvasion und so zu einem geringeren Gewebeumbau, zu einer kleineren Infarktgröße sowie zu einer besseren Herzfunktion führen.

In vielversprechenden Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe war tatsächlich nachgewiesen worden, dass ein Eingriff in die Wechselwirkung von CyPA und CD147 die Inflammationsreaktion hemmt. Dies ging mit den oben vermuteten positiven Effekten einher.⁶⁶

In der vorliegenden Arbeit wurde nun in Ischämie-Reperfusion-Versuchen an der Maus untersucht, ob auch die Applikation von anti-CD147-Antikörper in einem praxisnahen Szenario diese Wirkung zeigt.

Monozyten nehmen eine zentrale Rolle in den Umbauprozessen nach einem Herzinfarkt ein.^{5,6,36} Am Beginn der Monozyteninvasion in das Infarktgewebe steht die Interaktion der Monozyten mit der Gefäßwand. Daher wurde in dieser Studie besonders der Einfluss von CyPA auf das Roll- und Adhäsionsverhalten von monozytären Zellen an Endothel erforscht. Vor allem der Einfluss von extrazellulärem CyPA und die Rolle des intrazellulären Phosphoinositid-3-Kinase-Akt-Signalweges hierbei standen im Mittelpunkt.

4.1 Diskussion der angewandten Methoden

4.1.1 Tierversuche

Um die Rolle von extrazellulärem CyPA und seines Rezeptors CD147 bei der postischämischen Entzündung und Leukozyteninvasion *in vivo* zu untersuchen, wurden Mäuse als Modelltiere verwendet. Um einen Herzinfarkt zu erzeugen, wurde für 30min der Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie (LAD) ligiert und anschließend reperfundiert.

4.1.1.1 Der Ischämie-Reperfusion-Versuch als *in-vivo*-Modell des Myokardinfarkts

Wenn *in vivo* Untersuchungen zum akuten Myokardinfarkt durchgeführt werden sollen, stellt sich die Frage nach einem geeigneten Infarktmodell. Pathophysiologisch soll es dabei zu einem plötzlichen Sistieren der Durchblutung in einem definierten Gebiet kommen. Um den aktuellen therapeutischen Standard einzubeziehen, soll außerdem die Reperfusion des ischämischen Areals möglich sein. Eine Technik, welche die genannten Kriterien erfüllt, stellt die Ligatur der LAD dar wie sie 1978 von Zolotareva beschrieben und in dieser Arbeit angewandt wurde.^{19,169,170}

Bei diesem Verfahren können Zeitpunkt und Dauer der Ischämie sowie das Einsetzen der Reperfusion genau bestimmt werden. Allerdings kann je nach Lokalisation des Gefäßverschlusses die Größe der Infarktareale deutlich variieren.¹⁷¹⁻¹⁷³ Daher wurde in dieser Studie auf eine exakte Positionierung der Ligatur geachtet. Zusätzlich ist es jedoch aufgrund von anatomischen Varianten im Verlauf der Koronarien möglich, dass das Versorgungsgebiet der LAD variiert.

Es ist außerdem zu beachten, dass die OP einen großen Eingriff darstellt, der das Tier belastet und selbst eine Wundheilungsreaktion anstößt, die mit der Infarktheilung interferieren könnte.

Eine Alternative zur Gefäßligatur ist die Verwendung eines Kryomodells. Bei diesem wird durch eine stark gekühlte Sonde ein Myokardschaden induziert. Diese Methode hat den Vorteil einer hohen Reproduzierbarkeit bei gut kontrollierbarer Infarktgröße.¹⁷¹ Allerdings wird nicht der Verschluss und die anschließende Wiedereröffnung eines Ge-

fäßes simuliert, sondern lediglich ein Gewebeschaden induziert.

Wegen der größeren Nähe zur Pathophysiologie eines Herzinfarktes und der Möglichkeit, eine Reperfusionstherapie zu simulieren, wählten wir daher für unsere Versuche die Methode der LAD-Ligatur.

Obwohl die verwendete Technik den Herzinfarkt durch einen Arterienverschluss reproduzierbar darstellt, wird ein tatsächlicher Myokardinfarkt dennoch nur bedingt abgebildet. Im Tiermodell erfolgt die Okklusion eines intakten Gefäßes von außen. Dagegen tritt der Infarkt bei den meisten Patienten auf dem Boden eines atherosklerotisch vorgeschädigten Gefäßsystems auf und ist oft durch die Erosion oder Ruptur einer Plaque verursacht.^{5,9} Darüber hinaus verbleibt bei einem Teil der Patienten nach interventioneller Reperfusion eine residuale Stenose, wohingegen im Tiermodell immer eine vollständige Wiedereröffnung erfolgt.¹⁷⁴ Ebenso bleiben mögliche Komorbiditäten und kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus oder Zigarettenrauchen unberücksichtigt.

Die LAD-Ligatur stellt somit zwar ein geeignetes Modell dar, um die Auswirkungen eines akuten Koronararterienverschlusses isoliert zu untersuchen. Jedoch werden dabei weitere Einflussfaktoren der Entstehung und Heilung eines Myokardinfarktes ausgeklammert.

4.1.1.2 Die Maus als Modelltier

Obwohl teilweise auch größere Säugetiere wie Hunde als Modell in Myokardinfarkt-Studien verwendet wurden,^{161,175} werden meist kleine Tiere gewählt. Mäuse bieten dabei praktische Vorteile wie eine unkomplizierte postoperative Pflege, günstige Haltungskosten und einen geringen Verbrauch an verwendeten Agenzien.^{169,174} Nicht zuletzt wegen der Verfügbarkeit von Knockout-Tieren sind gerade Mäuse für die Erforschung kardiovaskulärer Pathophysiologie weit verbreitet.^{176,177}

Die Maus ist als Modelltier für die Untersuchung des Herzinfarktes geeignet, weil zum einen die morphologischen Veränderungen im ischämischen Myokard identisch mit denen bei Infarkt-Patienten sind.¹⁶⁹ Zum anderen weil auch die Entzündungsantwort einschließlich der Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren viele Gemeinsamkeiten mit höheren Säugetieren aufweist.¹⁷⁶

Ein Unterschied besteht jedoch darin, dass die postischämische Entzündung bei Mäusen schneller und kürzer ausgeprägt ist als bspw. bei Hunden.^{174,176}

Anatomisch sind bei der Maus Besonderheiten im Verlauf der Koronargefäße zu beobachten: Wird das Septum beim Mensch und größeren Säugetieren weitgehend von Ästen der LAD oder posteriorer Arterien versorgt, so existiert am murinen Herz eine eigene Arterie.^{178,179} Die abweichende Koronarversorgung führt dazu, dass sich die experimentell gesetzten Infarkte in ihrer Größe und Lokalisation von Infarkten des menschlichen Herzens unterscheiden.¹⁷¹ Dies könnte dazu führen, dass auch das postischämische Remodelling Unterschiede aufweist.¹⁷⁸

Unabhängig davon muss festgestellt werden, dass die LAD-Ligatur bei Mäusen zumindest nicht einem Verschluss der LAD beim Menschen entspricht.¹⁷⁸

4.1.1.3 Auswertung der Infarktgröße

Bedingt durch anatomische Varianten und intraoperativ geringfügig unterschiedliche Lokalisation der Gefäß-Ligatur kommt es zu einer gewissen Varianz des ischämischen Gebietes. Daher erscheint die absolute Infarktausdehnung als Messgröße ungeeignet. Deshalb wurde, wie in Kapitel 2.3 (Auswertung der Infarktgröße) beschrieben, mittels Evans-Blue-Färbung das Ausmaß des ischämischen Areals bestimmt und die Infarktgröße in Relation dazu angegeben. So können Unterschiede der Ischämieareale nivelliert werden,^{19,165,170} sodass die auf diese Weise berechnete relative Infarktgröße als zuverlässiger Parameter anerkannt ist.¹⁷⁴

4.1.1.4 Die HE-Färbung zur Bestimmung der Dichte einwandernder Zellen

Um die ins Infarktgebiet einwandernden Entzündungszellen quantitativ zu erfassen, wurden wie beschrieben¹⁷⁰ histologische Schnitte HE-gefärbt und ausgewertet. Dafür wurde der Randbereich des Infarktes betrachtet, weil dort Inflammationsreaktion und Leukozyteninfiltration am intensivsten sind.¹⁸⁰

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine HE-Färbung, um die Gesamtzahl der vorhandenen Zellen zu erfassen. Auf eine nähere Differenzierung der infiltrierenden Leukozyten durch immunhistochemische Färbungen wurde verzichtet. Solche Untersuchungen waren jedoch in ähnlichen Versuchen unserer Arbeitsgruppe durchgeführt worden. Dabei

war aufgefallen, dass die einwandernden Leukozyten sich v.a. aus Neutrophilen und Makrophagen zusammensetzen.⁶⁶

4.1.1.5 Die Kollagen-Färbung nach Masson-Goldner zur Analyse der Fibrosefläche

Binnen weniger Tage steigt nach dem Infarkt die Kollagensynthese im betroffenen Gebiet an.¹⁸¹ Im Zuge des Gewebeumbaus nach einem Herzinfarkt wird dabei geschädigtes Myokard durch kollagenreiches Fibrosegewebe ersetzt. Die Größe der Fibrose ist somit ein Anhaltspunkt für das Ausmaß der eingetretenen Gewebeschädigung. Wie bereits in anderen Studien beschrieben,^{53,178} wurde die Masson-Trichrom-Färbung eingesetzt, um zuverlässig die Größe der myokardialen Fibrose abgrenzen zu können.

Auf diese Weise wurde das Myokard 24 Stunden und 28 Tage nach der LAD-Ligatur beurteilt. Da das Remodelling und der Umbau des Narbengewebes über ein Jahr andauert,^{26,32,79} kann zu diesen Zeitpunkten noch keine endgültige Narbe beurteilt werden. Da aber nach 14 Tagen abgestorbene Kardiomyozyten bereits vollständig entfernt sind,¹⁷ ist am 28. Tag das voraussichtliche Ausmaß der Narbe gut erkennbar.

In der vorliegenden Arbeit soll daher untersucht werden, ob die beobachteten Effekte einer CD147-Inhibition auf die Infarktgröße auch zu histologisch nachvollziehbaren Veränderungen der entstehenden myokardialen Fibrose führen.

4.1.2 In-vitro-Versuche an der Flusskammer

4.1.2.1 Humane Nabelvenen-Endothelzellen als Modell der arteriellen Gefäßwand

Mit den durchgeführten Versuchen an der Flusskammer soll die Interaktion von zirkulierenden Monozyten mit dem Endothel der koronaren Gefäßwand untersucht werden.

Als Modell für die Gefäßwand dienten Endothelzellen aus Umbilikalvenen (HUVEC), die zu einem konfluenten Zellrasen gewachsen waren. HUVEC sind aufgrund ihrer einfachen Gewinnung, ihrer Kultivierbarkeit und der Möglichkeit zur Kryokonservierung die vorherrschende Quelle humaner Endothelzellen in Zellkulturen.¹⁸²⁻¹⁸⁴ Allerdings ist zu beachten, dass diese Zellen schnell zu altern scheinen und typische Eigenschaften schon nach wenigen Passagen verlieren.¹⁸⁴ Daher wurden in der vorliegenden

Arbeit nur Endothelzellen niederer Passagen verwendet.

In den Versuchen soll das Endothel in entzündlich verändertem Gewebe dargestellt werden. Dazu wurden die HUVEC mit TNF- α und IFN- γ vorbehandelt, um sie in einen aktivierten Zustand zu versetzen. Diese Zytokine bewirken die vermehrte Anhaftung von Leukozyten am Endothel durch eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ Die maximale Wirkung tritt dabei nach ca. 4 Stunden ein.^{185,187}

Unterschiede zwischen HUVEC und dem Endothel von Koronararterien ergeben sich v.a. aus ihrem Ursprung: Zum einen stammen HUVEC aus einem venösen Gefäß, in dem andere Druckbedingungen herrschen als in Arterien. Zum anderen stellen die Umbilikalvenen einzigartige Gefäße dar, weil sie oxygeniertes Blut transportieren und sich in ihrem histologischen Aufbau von regulären Venen unterscheiden.^{182,184}

Zudem kann die Plastizität des Endothels bewirken, dass durch die veränderten Umgebungsbedingungen *in vitro* ein anderer Phänotyp entsteht als dies *in vivo* der Fall wäre.¹⁸² Daher ist es notwendig, die gewonnenen Ergebnisse am lebenden Modell bspw. mittels Intravitalmikroskopie zu verifizieren.

4.1.2.2 MonoMac6 als Modell der zirkulierenden Monozyten

Um eine mechanische Aktivierung bei der aufwändigen Isolation von Monozyten aus Spenderblut zu umgehen und sicherzustellen, dass die für das Experiment erforderliche Menge an Zellen zur Verfügung steht, wurde eine Zellkultur verwendet. Dabei kamen Zellen der Linie MonoMac6 zum Einsatz, die bezüglich ihrer Funktion und Morphologie reife zirkulierende Monozyten repräsentieren.^{167,168,188} Ihre monozytären Eigenschaften bleiben in Kultur über mehrere Monate stabil.¹⁶⁷

Alternative monozytäre Zelllinien wie THP1 oder U937 bilden ein früheres Stadium der Monozyten-Differenzierung ab. Sie adhären weniger stark an HUVEC und zeigen – im Unterschied zu MonoMac6 – für reife Monozyten typische Eigenschaften erst, nachdem ihre Differenzierung induziert wurde.^{167,189}

Unterschiede zu isolierten Monozyten aus Spenderblut bestehen in einer geringeren Varianz bezüglich ihres Bindungsverhaltens. Womöglich kann dies jedoch auf eine einheitlichere Population in der Zellkultur zurückgeführt werden.¹⁸⁹ Außerdem scheinen MonoMac6-Zellen – anders als zirkulierende humane Monozyten – nicht in der Lage zu sein, Gonokokken zu internalisieren.¹⁹⁰

Trotz dieser Unterschiede zeigen MonoMac6-Zellen eine ähnliche Adhäsions-Charakteristik an aktiviertem Endothel wie humane Blutmonozyten. Das macht sie zu einem geeigneten Modell für die Untersuchung der Monozyten-Endothel-Interaktion.¹⁸⁹

4.1.2.3 Die Flusskammer als in-vitro-Modell der Monozyten-Endothel-Interaktion

Um die dynamischen Vorgänge bei der Monozytenadhäsion im Organismus *in vitro* nachzustellen, wurde eine Flusskammer verwendet.

Anders als *in vivo* fließt die Suspension monozytärer Zellen technisch bedingt konstant an den HUVEC vorbei und weist keine Pulsatilität auf. Darüber hinaus wurde die Untersuchung aus praktischen Erwägungen bei Raum- und nicht bei Körpertemperatur durchgeführt. Da aber viele Enzyme ihr Funktionsoptimum bei Körpertemperatur haben, wurden alle Zellen bis unmittelbar vor ihrer Verwendung bei 37°C in einem Brutschrank gehalten.

Bei den Experimenten wurde sorgfältig darauf geachtet, dass im Flusskanal keine Hindernisse oder Leckagen vorliegen. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass kleinere Inkonsistenzen zu Turbulenzen im simulierten Blutstrom geführt haben. Ebenso kann trotz vorsichtiger Handhabung in der Vorbereitung der MonoMac6-Zellen eine gewisse mechanische Alteration aufgetreten sein. Eine solche könnte die Wirkung von Aktivatoren und Inhibitoren beeinflussen.

Da mehrere Ansätze an einem Versuchstag verwendet wurden, traten Wartezeiten auf, in denen die Zellen der MonoMac6-Suspensionen in den Perfusorspritzen sedimentieren konnten. Um zu vermeiden, dass es so zu einer inhomogenen Konzentration der Suspension kommt, wurden die Spritzen in regelmäßigen Abständen sanft gewendet.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Therapeutische CD147-Inhibition im Tiermodell des Herzinfarkts

4.2.1.1 Therapeutische CD147-Inhibition verringert die Infarktgröße nach Ischämie/Reperfusion

Diese Studie demonstriert, dass durch die pharmakologische Inhibition von CD147 in einem praxisnahen Szenario die Größe eines Myokardinfarkts signifikant gesenkt werden kann.

In vorausgegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe war bereits gezeigt worden, dass eine Defizienz von CD147 oder seines Liganden CyPA bei Mäusen die Infarktgröße verringert.⁶⁶ Darauf aufbauend war eine Behandlung mit anti-CD147-Antikörper getestet worden, welche eine ähnlich starke Reduktion des Infarktareals bewirkte wie eine CD147-Defizienz.⁶⁶ Bei diesen Versuchen war der Antikörper appliziert worden, bevor ein Infarkt induziert wurde. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde nun anti-CD147 erst nach Setzen der LAD-Ligatur verabreicht. So sollte untersucht werden, ob die bekannten positiven Effekte auch erzielbar sind, wenn in der klinischen Praxis Patienten mit bereits bestehendem Infarkt behandelt werden.

Die Größe des Infarktes wurden jeweils 24h und 28 Tage nach Ischämie/Reperfusion bestimmt. Zu beiden Zeitpunkten war die Infarktgröße durch die CD147-Inhibition um ca. ein Drittel gesenkt worden.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass nach 24h noch keine kollagene Fibrose vorhanden ist. In der Untersuchung 28 Tage nach Ischämie/Reperfusion hingegen war bereits eine deutliche Fibrose im Infarktgebiet erkennbar. Diese myokardiale Fibrose war bei der mit anti-CD147-Antikörpern behandelten Gruppe tendenziell weniger ausgedehnt. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Möglicherweise ist dies auf die hohe Varianz der einzelnen Messwerte zurückzuführen. Ein Grund hierfür kann sein, dass bei der histologischen Aufbereitung die einzelnen Herzfragmente methodenbedingt in unterschiedlichen Winkeln angeschnitten und präpariert wurden. Im Gegensatz zur Messung der Infarktgröße am frisch entnommenen und geschnittenen Herzen war bei den histologischen Untersuchungen somit keine einheitliche Schnittebene gegeben.

Da der verwendete Antikörper die chemotaktische Funktion von CD147 hemmt, aber nicht die Funktion als MMP-Induktor,^{66,97} ist die Reduktion der Infarktausdehnung am ehesten auf eine geringere Leukozyteninvasion zurückzuführen. Da eingewanderte Immunzellen proteolytische Enzyme, reaktive Sauerstoffspezies und proinflammatorische Mediatoren freisetzen, ist es plausibel, dass die verringerte Einwanderung von Leukozyten für die Minderung des myokardialen Schadens verantwortlich ist.^{5,10}

Es scheint folgerichtig, dass die gezeigte Reduktion des abgestorbenen Gewebes – im Sinne einer verringerten Infarktgröße – auch zu einer Verkleinerung der myokardialen Fibrose führt, welche aus dem geschädigten Gewebe entsteht. Unterstützt wird diese Überlegung dadurch, dass die beobachtete nicht-signifikante Verringerung der Fibrosefläche durch CD147-Inhibition ein ähnliches quantitatives Ausmaß zeigt wie die signifikante Reduktion der Infarktgröße. Möglicherweise kann durch eine höhere Fallzahl in folgenden Studien auch für die Reduktion der Fibrosefläche das Signifikanz-Niveau erreicht werden.

Denkbar ist jedoch auch, dass es bei der Inhibition von CD147 auf alternativen Wegen zu einer narbigen Gewebeumwandlung kommt. Zudem kann die fehlende Hemmung der MMP-Induktion des hier eingesetzten anti-CD147-AK eine Rolle spielen.

4.2.1.2 Therapeutische CD147-Inhibition vermindert die Zellinvasion 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion

Die histologische Auswertung zeigt, dass die Behandlung mit anti-CD147-Antikörper die Zelldichte im Infarkt-Randbereich signifikant auf etwa die Hälfte verringert.

Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibition von CD147 im klinischen Szenario die Leukozyteninvasion ähnlich effektiv hemmt wie eine CD147-Blockade, die bereits vor Induktion der Koronarischämie erfolgt.⁶⁶

Die Erkenntnisse stehen im Einklang mit zahlreichen anderen Studien, die eine wichtige Rolle des CyPA-CD147-Systems bei der Chemotaxis und Migration von Leukozyten belegen. So hemmen Antikörper gegen CD147 *in vitro* die CyPA-induzierte Migration von Monozyten, Neutrophilen Granulozyten und CD4⁺ T-Zellen.^{66,67,97,106,112,113} *In vivo* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Blockade von CD147 bei entzündlichen Erkrankungen wie Asthma,⁹⁸ LPS-induzierter Lungeninflammation³⁹ oder Rheumatoider

Arthritis¹⁹¹ die Invasion von Leukozyten hemmt.

Wird davon ausgegangen, dass EMMPRIN hier in seiner Eigenschaft als Rezeptor für extrazelluläres CyPA inhibiert wurde, so werden die hier gewonnenen Erkenntnisse zudem durch Tierversuche untermauert, bei denen CyPA gehemmt wurde. So senkt eine CyPA-Defizienz oder -Blockade die Leukozyteninfiltration bei allergischer Lungenentzündung,⁴³ viraler¹³⁸ oder autoimmuner Myokarditis⁸⁹ sowie bei atherosklerotischen Plaques.⁸²

Der Befund einer durch anti-CD147 abgeschwächten Zellinvasion ins Infarktgebiet stützt die Hypothese dieser Arbeit. Derzufolge beruht die festgestellte Verringerung der Infarktgröße (s.o.) auf einer gehemmten Einwanderung von Immunzellen.

4.2.2 Extrazelluläres Cyclophilin A induziert die endotheliale Adhäsion von monozytären Zellen

Die Versuche in der Flusskammer zeigen zunächst eine signifikante Zunahme von rollenden und adhärenen MonoMac6 an aktiviertem Endothel durch Stimulation mit CyPA.

Diese adhäsionsfördernde Wirkung von CyPA wurde kürzlich von unserer Arbeitsgruppe an humanen Blutmonozyten beschrieben.⁶⁶ Es fällt auf, dass die Zunahme der Adhäsion bei MonoMac6-Zellen weitaus geringer ausfällt als bei Blutmonozyten. Womöglich kommt dies daher, dass MonoMac6-Zellen ein geringfügig früheres Differenzierungsstadium darstellen. Es ist denkbar, dass Blutmonozyten deshalb mehr EMMPRIN exprimieren als MonoMac6-Zellen und so eine ausgeprägtere Reaktion auf CyPA zeigen. Dies ist umso wahrscheinlicher, als analog hierzu auch bei der weiteren Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen die CD147-Expression zunimmt.¹¹⁴

Es ist bekannt, dass die Blockade des Rezeptors CD147 die durch CyPA vermittelte Adhäsion und das Rollen von Blutmonozyten nach CyPA-Stimulation fast vollständig hemmt.⁶⁶ In der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis, dass auch die direkte Inhibition von extrazellulärem CyPA eine Stimulation der Adhäsion durch CyPA nahezu vollständig unterbindet.

Allerdings erreichte der Effekt des verwendeten nicht-zellpermeablen CsA-Derivats

MM284 nur für die Verminderung der Adhäsion das geforderte Signifikanzniveau.

In der nicht-softwaregestützten Auswertung ist die Identifizierung rollender Zellen weniger exakt möglich als dies bei adhären den Zellen der Fall ist. Dies führt bei der Bestimmung rollender Zellen zu einer hohen Varianz, welche möglicherweise für die ausbleibende Signifikanz der gemessenen Reduktion bei monozytärem Rollen verantwortlich ist.

Bislang war v.a. bekannt, dass CyPA die leukozytäre Migration bei inflammatorischen Zuständen fördert.^{40,43,66,93,95} Es konnte gezeigt werden, dass CyPA in Bezug auf Monozyten nicht nur chemotaktisch wirkt. Es fördert auch die Adhäsion der Zellen an Endothel unter arteriellen Flussbedingungen und ist so bereits für den ersten Schritt der Migration ins entzündete Gewebe verantwortlich. Dies war bereits kürzlich demonstriert worden⁶⁶ und konnte hier durch unabhängige Wiederholung bestätigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun nachgewiesen, dass für diese Adhäsionsinduktion speziell extrazelluläres CyPA verantwortlich ist. In nachfolgenden Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte dieser Zusammenhang an humanen Monozyten bestätigt werden.⁸⁹

Dass eine Blockade von ausschließlich extrazellulärem CyPA ausreicht, um die Adhäsion und Migration zu hemmen, wird zusätzlich durch Experimente mit Knock-out-Tieren untermauert: Diese belegen, dass eine (intrazelluläre) CyPA-Defizienz die Monozytenmigration auf höhere Konzentrationen extrazellulären CyPAs hin nicht beeinträchtigt.¹³⁸ Darüber hinaus konnte bei der allergischen Lungeninflammation bereits *in vivo* gezeigt werden, dass die ausschließliche Blockade extrazellulärer Cyclophiline die Invasion von Monozyten hemmt.⁴³ Dass bereits die Adhäsion am Endothel als erster Schritt der Monozyteninvasion von extrazellulärem CyPA abhängt, konnte die vorliegende Studie zeigen.

Yang et al. fanden heraus, dass CyPA über seinen Rezeptor EMMPRIN die Adhäsion von Monozyten an die Extrazelluläre Matrix fördert.¹¹² Aus ihren Versuchen wird deutlich, dass CyPA die monozytäre Adhäsion nicht ausschließlich an Endothel vermittelt. Es ist daher denkbar, dass extrazelluläres CyPA zu einer allgemeinen Aktivierung monozytärer Zellen führt, die daraufhin eine Reihe unterschiedlicher Adhäsionsmoleküle exprimieren.

4.2.3 Die durch Cyclophilin A induzierte endotheliale Adhäsion von monozytären Zellen ist abhängig von der Phosphoinositid-3-Kinase

Weitere Untersuchungen der vorliegenden Studie an der Flusskammer belegen, dass die CyPA-induzierte Adhäsion von MonoMac6 an aktiviertem Endothel über den Phosphoinositid-3-Kinase-Akt-Signalweg vermittelt wird. In nachfolgenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass extrazelluläres CyPA eine Phosphorylierung von Akt bewirkt.¹⁶⁰

Da Wortmannin alle PI3K-Isoformen hemmt, wohingegen Ly294002 lediglich PI3K- β und - δ inhibiert,¹⁵³ könnte bei der Inhibition durch Wortmannin aufgrund des breiteren Spektrums ein ausgeprägterer Effekt zu erwarten sein. Allerdings sind die gemessenen Unterschiede im Hemmeffekt von Ly294002 und Wortmannin nicht signifikant.

Möglicherweise sind besonders die Isoformen β und δ der PI3K in die Signalkaskade der CyPA-stimulierten Adhäsion von Monozyten eingebunden. So könnte die Inhibition weiterer Isoenzyme keine lineare Zunahme der hemmenden Wirkung auf CyPA-Effekte mehr bewirkt. Eine weitergehende Abklärung diesbezüglich durch weitere Studien scheint erstrebenswert.

Analog zu den hier vorgestellten Versuchen an Zellen einer monozytären Zelllinie ist aus anderen Experimenten bekannt, dass eine PI3K-Inhibition die Adhäsion von Neutrophilen Granulozyten an aktiviertem Endothel abschwächt.¹⁵² Darüber hinaus konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass die CyPA-induzierte Chemotaxis von Monozyten abhängig von der PI3K ist.⁶⁶

Allgemein lässt sich eine wichtige Rolle von PI3K- γ und - δ in der Immunabwehr feststellen.¹⁵⁷ So beeinträchtigt eine Defizienz an PI3K- γ stark die Migration von Monozyten und anderen Immunzellen bei Entzündungsprozessen.¹⁵⁸

Die Bedeutung von PI3K- γ und - δ für die Infarktheilung machen Doukas et al. deutlich, indem sie nachweisen, dass eine Inhibition dieser Isoenzyme nach Ischämie/Reperfusion die Infarktgröße reduziert. Unerwartet ist jedoch, dass dabei die inflammatorischen Infiltrate im Infarktgebiet nicht vermindert sind.¹⁵³ Möglicherweise wurden durch die Inhibition des PI3K-Akt-Signalwegs nicht nur die dargestellten adhäsions-/migrations-

fördernden Eigenschaften beeinträchtigt, sondern gleichzeitig auch Signale, welche die Migration hemmen.

Obwohl die durchgeführten Versuche Unterschiede im Hemmeffekt zwischen einer PI3K-Inhibition und der Inhibition von extrazellulärem Cyclophilin zeigen, sind diese nicht signifikant. Daher kann keine Aussage getroffen werden, über welchen dieser Wege eine Infiltration von Monozyten effektiver gehemmt wird.

Zudem bleibt es weiteren Untersuchungen vorbehalten, festzustellen, inwiefern die untersuchten Effekte von CyPA über weitere Signalwege vermittelt werden.

4.3 Limitationen der vorliegenden Studie

Die hier vorgestellte Arbeit erforscht im Mausmodell und an der Flusskammer die Bedeutung von CyPA und CD147 bei pathophysiologischen Prozessen ähnlich denen, die bei einem Herzinfarkt ablaufen.

Zur Auswertung der Leukozyteninfiltrate 24h nach Ischämie/Reperfusion wurde eine HE-Färbung zur Bestimmung der Zelldichte durchgeführt. Zusätzlich könnten immunhistologische Untersuchungen Aufschluss über die Zusammensetzung der eingewanderten Immunzellen geben. In Vorversuchen an Mäusen, die anti-CD147 bereits vor der LAD-Ligatur erhalten hatten, konnte in unserer Arbeitsgruppe immunhistologisch gezeigt werden, dass die Einwanderung von Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen um mehr als die Hälfte gesenkt wurde.⁶⁶ Da die Wirkung von anti-CD147 auf die Zelldichte bei jenem Versuch nur wenig von den in dieser Arbeit ermittelten Effekten abweicht, ist von einer ähnlichen Zusammensetzung der einströmenden Leukozyten auszugehen wie bei den genannten Vorversuchen.

Die vorliegende Studie analysiert im Tierversuch lediglich histologische Merkmale und die Fibrose- bzw. Infarktgröße. Die Infarktgröße korreliert zwar mit dem funktionellen Schaden und der Mortalität,^{24,26} eine explizite Analyse der Herzfunktion mittels Echokardiographie wäre allerdings wünschenswert. Eine solche war in unserer Arbeitsgruppe bei Mäusen erfolgt, die anti-CD147 vor Setzen der LAD-Ligatur erhalten hatten. Dabei konnte dort ein signifikanter protektiver Effekt von anti-CD147 auf die Pumpfunktion bestätigt werden.⁶⁶

In den Flusskammerexperimenten wurde die Wirkung verschiedener Inhibitoren der CyPA-induzierten monozytären Adhäsion untersucht. Die Durchführung wäre weiter optimierbar durch die Hinzunahme einer mit LPS stimulierten Kontrollgruppe. Dadurch könnte nachgewiesen werden, ob spezifisch CyPA-abhängige Effekte oder allgemeinere Mechanismen inhibiert werden.

Des Weiteren ist zukünftig eine softwarebasierte automatisierte Auswertung der Flusskammer-Videos denkbar, die eine präzisere Definition und Zählung rollender Zellen erlauben würde. Eine solche objektive Bestimmung könnte genauere Ergebnisse mit geringeren Varianzen liefern, sodass womöglich auch für den Hemmeffekt von MM284, Ly294002 und/oder Wortmannin auf das monozytäre Rollen das Signifikanzniveau erreicht würde.

Das verwendete Mausmodell spiegelt eine vollständig reversible Okklusion eines Koronargefäßes an einem jungen, gesunden Herzen wider. Bei Patienten häufig vorhandene Komorbiditäten wie Atherosklerose oder Diabetes wurden in der vorliegenden Arbeit nicht einbezogen. Beide Erkrankungen scheinen jedoch Einfluss auf die Infarkttheilung zu haben.^{5,10,78,192,193} Speziell der protektive Effekt einer CyP-Inhibition durch CsA in Bezug auf den Reperfusionsschaden konnte bei prädiabetischen Mäusen nicht nachgewiesen werden.¹⁹³

Da die verwendeten Mäuse einem ca. 7-jährigen Menschen entsprechen, wurde außerdem nicht berücksichtigt, dass der Myokardinfarkt bevorzugt bei älteren Patienten auftritt.¹⁷⁴ Man weiß zum einen, dass kardioprotektive Methoden im Alter weniger wirksam sind.¹⁷⁴ Zum anderen ist die Entzündungsreaktion bei jungen Individuen stärker ausgeprägt, sodass die positiven Effekte einer Hemmung der Leukozyteninvasion für ältere Patienten überschätzt werden könnten.^{6,194,195} In den Empfehlungen des Hatter Workshops, die sich als Leitlinie für das Design von Studien zur Kardioprotektion verstehen, wird daher vorgeschlagen, zunächst den Einflussfaktor Alter in Tierversuchen einzubeziehen.¹⁷⁴

Darüber hinaus wurde nicht berücksichtigt, dass mehrere häufig von kardiologischen Patienten eingenommene Medikamente wie ACE-Hemmer, AT-1-Rezeptor-Antagonisten, β -Blocker oder Statine bereits eine positive Wirkung auf das Remodelling nach ei-

nem Herzinfarkt entfalten.¹⁹⁵ Es ist daher möglich, dass der hier erforschte kardioprotektive Effekt einer CyPA-CD147-Blockade in der klinischen Praxis bereits heute partiell durch andere Medikamente bewirkt wird. So könnte es sein, dass der zusätzliche Nutzen der untersuchten Therapie für Infarktpatienten überschätzt wird.

Grundsätzlich wurde in der vorgelegten Studie angestrebt, isoliert und standardisiert den Einfluss einer CyPA-CD147-Inhibition zu evaluieren. Um Interferenzen zu vermeiden, wurden daher die bei Patienten vorhandene Komorbiditäten und andere Umweltfaktoren außer Acht gelassen. Auch die Komplexität des Patientenguts im Hinblick auf die Infarktlokalisierung und Ischämiedauer blieb im Sinne einer Standardisierung unbeachtet.^{6,174}

In vitro wurde gezeigt, dass extrazelluläres CyPA die Monozytenmigration stark beeinflusst. *In vivo* konnte jedoch in den durchgeführten Experimenten nicht differenziert werden, welchen Anteil an den beobachteten Effekten der CD147-Blockade die verminderte Monozyteninvasion hat und wie stark der Einfluss der gleichzeitig bewirkten Hemmung der Neutrophilenmigration^{66,106} ist. Da die Neutrophilen Granulozyten nur in der initialen Phase der Infarktheilung vorhanden sind, wird aber vermutet, dass sie – im Gegensatz zu Makrophagen – für die Remodelling-Vorgänge nur eine untergeordnete Rolle spielen.^{36,196}

In dieser Arbeit wird besonders die Interaktion von extrazellulärem CyPA und CD147 betrachtet.

Bei Mäusen wurde hierfür durch Antikörper der Hauptrezeptor von CyPA, CD147, blockiert. Mutmaßlich vorhandene weitere Rezeptoren für CyPA⁶⁹ wurden jedoch nicht erfasst. Des Weiteren wurde dadurch auch die homophile Interaktion zwischen CD147-Molekülen¹⁰⁹ und die Signaltransduktion von CyPB blockiert.¹¹⁷

Im Unterschied dazu wurde im Flusskammerversuch durch MM284 die CyPA-Wirkung auf sämtliche CyP-Rezeptoren blockiert. Es erfolgte also keine ausschließliche Blockade des CyPA-CD147-Systems.

Eine exakte Abgrenzung der CyPA-CD147-Achse von darüber hinausgehenden Interaktionen der beiden Moleküle ist deshalb mit den durchgeführten Untersuchungen nicht möglich. In anderen Arbeiten hatte eine gemeinsame Blockade von CD147 und CyPA

indes keinen stärkeren Effekt als die alleinige Inhibition eines der beiden Bindepartner erzielt.^{39,81} Daher scheinen die nicht betrachteten Nebeninteraktionen allenfalls von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Es wurde in der vorliegenden Arbeit nicht versucht, die genauen Ursachen des beeinflussten myokardialen Schadens zu klären. Die Hypothese dieser Studie besagt, dass durch die Reduktion der postischämischen Inflammation die Infarktgröße verringert wird. Es wäre allerdings zusätzlich oder alternativ möglich, dass dieser Effekt durch eine Verringerung des Reperfusionsschadens oder des durch die Ischämie selbst ausgelösten Schadens zustande kommt.

Dem widerspricht hingegen, dass eine anti-CD147-Gabe bereits vor dem Zeitpunkt der Koronarokklusion keine bedeutend höhere Kardioprotektion erzielt⁶⁶ als die hier durchgeführte Applikation nach LAD-Ligatur. Daher scheint zumindest eine Verminderung des direkt durch die Ischämie bedingten Schadens unwahrscheinlich.

Aufgrund der erwähnten Grenzen dieser Arbeit, sollte in weiteren Untersuchungen folgenden Fragestellungen nachgegangen werden:

Durch Tierexperimente sollte zunächst der Einfluss des Alters auf die Infarkttherapie mittels CyPA-CD147-Inhibition geklärt werden.¹⁷⁴ Zusätzlich ist es notwendig, die Tiere über einen längeren Zeitraum zu beobachten, um die langfristigen Auswirkungen der Intervention zu erkennen.

Die an MonoMac6-Zellen gewonnenen Erkenntnisse sollten vollständig an Blutmonozyten verifiziert werden, wie dies für den Adhäsionseffekt von extrazellulärem CyPA bereits in späteren Experimenten unserer Gruppe geschehen ist.⁸⁹ Darüber hinaus ist es wünschenswert, die *in vitro* gefundenen Aspekte *in vivo* nachzuvollziehen, bspw. über intravitalmikroskopische Untersuchungen.

Grundsätzlich bleibt zu erforschen, welche Adhäsionsmoleküle durch extrazelluläres CyPA hochreguliert werden und die beobachteten Effekte vermitteln.

4.4 Schlussfolgerung

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die bei der Interaktion von extrazellulärem CyPA und CD147 wirkenden Mechanismen zu charakterisieren. Speziell der Einfluss

auf die endotheliale Adhäsion von Monozyten sollte untersucht werden, da diese für den Remodelling-Prozess nach einem Myokardinfarkt von besonderer Bedeutung sind.^{5,53} Es zeigt sich, dass eine Hemmung des CyPA-Rezeptors CD147 sowohl die Leukozyten-Infiltration als auch die Infarktgröße nach Ischämie und Reperfusion signifikant senkt. Die beobachtete Reduktion der Leukozyten-Migration konnte im Falle der Monozyten mithilfe der *in-vitro*-Versuche erklärt werden: Hier wurde nachgewiesen, dass bei einem Myokardinfarkt vermehrt exprimiertes extrazelluläres CyPA^{66,145} die Adhäsion von monozytären Zellen am Endothel fördert. Zusätzlich wurde festgestellt, dass diese Adhäsion über den PI3K-Akt-Signalweg vermittelt wird.

Mögliche Therapeutika, welche die CyPA-CD147-Interaktion hemmen, könnten zukünftig bei einem Herzinfarkt appliziert werden, um die Monozyteninvasion zu verringern. Dadurch könnte der inflammatorische Myokardschaden sowie negatives Remodelling minimiert und die langfristige Herzfunktion nach einem Infarkt verbessert werden. Da für die notwendige Abheilungsreaktion nach einem Herzinfarkt eine vollständige Unterdrückung der Monozytenantwort nicht anzustreben ist,³⁴ scheint eine Kontrolle der Monozytenrekrutierung sinnvoll.

Ein möglicher Vorteil einer therapeutischen Beeinflussung der CyPA-CD147-Interaktion gegenüber einer breiten Unterdrückung des Immunsystems besteht in einem geringeren Nebenwirkungs-Potential: EMMPRIN und extrazelluläres CyPA werden im gesunden Organismus nur wenig exprimiert und steigen erst im Zuge einer Schädigung an.^{49,90,143-145} Somit ist es möglich, durch eine vorübergehende Blockade von extrazellulärem CyPA oder CD147 v.a. pathophysiologische Prozesse anzugreifen. Physiologische Vorgänge könnten zum Großteil unbeeinträchtigt bleiben.¹²²

Versuche mit CsA zur Blockade von Cyclophilinen waren in der Vergangenheit vielversprechend verlaufen und fanden eine Verringerung der Infarktausdehnung.^{163,164} Dennoch ist CsA aufgrund seiner immunsuppressiven Eigenschaften kein idealer Kandidat für den Einsatz bei Herzinfarkten.⁷ Aus demselben Grund wird aktuell Alisporivir zur Therapie von Hepatitis C in klinischen Phase-II-Studien getestet, ein CyPA-Inhibitor ohne abwehrschwächende Wirkung.¹⁹⁷

In der hier vorgestellten Arbeit wurde aufgezeigt, dass auch die Inhibition von ausschließlich extrazellulärem CyPA kardioprotektiv wirkt. So könnte eine nächste Genera-

tion von CyPA-Inhibitoren selektiv extrazelluläre Cyclophiline angreifen und dadurch das Potential für Nebenwirkungen weiter senken.

Um gezielt die Wirkung von extrazellulärem CyPA zu hemmen, könnten außerdem Antikörper gegen CD147 eingesetzt werden, ähnlich den in dieser Studie verwendeten Antikörpern.

Die vorliegende Studie gibt einen Hinweis darauf, dass ein therapeutischer Eingriff in den PI3K-Akt-Signalweg den CyPA-vermittelten Myokardschaden reduzieren könnte. Allerdings ist vor einer möglichen klinischen Anwendung eine weitergehende grundlegende Forschung auf diesem Gebiet unabdingbar, um eine zielgerichtete PI3K-Inhibition zu ermöglichen. Eine generelle Blockade des Enzyms wäre durch seine Beteiligung an zahlreichen Vorgängen im Organismus¹⁵⁷ vermutlich mit starken unerwünschten Wirkungen verbunden.

Bevor die Inhibition des CyPA-CD147-Systems in der klinischen Praxis zur Anwendung kommen kann, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Darin muss u.a. der Einfluss von Komorbiditäten und Alter geklärt werden, sowie die Wirksamkeit der vorgeschlagenen Therapiestrategie an höheren Säugetieren bestätigt werden.¹⁷⁴ Schließlich sind diejenigen Patienten zu identifizieren, welche von einer Blockade der CyPA-CD147-Interaktion zusätzlich zur Reperfusion profitieren.^{6,174} Bislang ist noch ungeklärt, welche Infarktgrößen am besten auf diese Behandlung ansprechen und welche Rolle die Ischämiedauer für den Nutzen dieser Therapie spielt.¹⁷⁴

Obwohl eine direkte klinische Anwendung aktuell noch nicht abzusehen ist, liefert die vorliegende Arbeit wichtige Informationen über die Rolle von extrazellulärem CyPA beim Myokardinfarkt. Diese Grundlagen sind unverzichtbar, um die effektive Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen kontinuierlich weiterzuentwickeln.

5. Zusammenfassung

Der akute Myokardinfarkt ist eine Erkrankung mit hoher Morbidität und Letalität. Ein überlebter Infarkt führt häufig zu Herzinsuffizienz, welche die Lebensqualität der Patienten deutlich eingeschränkt.

In der vorliegenden Arbeit wird deshalb untersucht, ob therapeutisch in die Interaktion des Proteins CyPA mit seinem Rezeptor CD147 eingegriffen werden kann, um die Größe eines Herzinfarkts zu verringern. Dem zugrunde liegt die Hypothese, dass extrazelluläres CyPA über CD147 die Einwanderung von Monozyten in geschädigtes Myokard bewirkt. Dort führen Monozyten zu Zellschäden und einem Gewebeumbau, der die Entstehung einer Herzinsuffizienz begünstigt.

In vivo wurde daher an Mäusen durch Ligatur der LAD ein Myokardinfarkt erzeugt und kurz vor der Reperfusion Antikörper gegen CD147 appliziert. In diesem praxisnahen Szenario wurden durch die Inhibition von CD147 sowohl die Infarktgröße als auch die Zahl einwandernder Zellen ins Infarktgebiet deutlich reduziert.

In vitro wurde unter Strömungsbedingungen der Einfluss von CyPA auf das Adhäsionsverhalten monozytärer MonoMac6-Zellen an aktiviertem Endothel untersucht. Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass speziell extrazelluläres CyPA die monozytäre Adhäsion fördert. Es wurde nachgewiesen, dass dieser Effekt über den PI3K-Akt-Signalweg vermittelt wird.

Die pharmakologische Inhibition von CyPA bzw. CD147 stellt damit einen vielversprechenden Ansatz für die zukünftige Therapie des Myokardinfarkts dar. Hierdurch könnte es gelingen, die Herzfunktion nach einem Infarkt langfristig zu verbessern. Da sowohl CyPA als auch CD147 v.a. bei Krankheitsprozessen exprimiert werden, ist ein geringes Nebenwirkungspotential wahrscheinlich, das durch die Fokussierung auf ausschließlich extrazelluläres CyPA weiter gesenkt werden kann.

Das grundlegende Wissen um die Rolle des PI3K-Akt-Signalwegs bei der CyPA-vermittelten Monozytenadhäsion ermöglicht eine weitere Forschung, an deren Ende eine gezielte Beeinflussung intrazellulärer Signalwege in verschiedenen Krankheiten stehen könnte.

In der vorliegenden Studie bleiben das höhere Alter der meisten Herzinfarkt-Patienten sowie häufige Komorbiditäten und Begleitmedikation unberücksichtigt. Daher müssen

die Ergebnisse dieser Studie unter weiteren Bedingungen evaluiert werden, sodass es möglich wird, die Patienten zu identifizieren, welche von einer zusätzlichen Therapie durch CyPA-CD147-Inhibition profitieren.

6. Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Compact Disc
CD	Cluster of Differentiation, Classification Determinant
CsA	Ciclosporin A
CyPA	Cyclophilin A
CyPB	Cyclophilin B
d	Tag(e)
d.h.	das heißt
DVD	Digital Versatile Disc
EMMPRIN	Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer = CD147
ERK	Extracellular-signal-Regulated Kinase
FCS	Fetal Calf Serum
ggf.	gegebenenfalls
GPVI	thrombozytäres Glykoprotein VI
h	Stunde(n)
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
i.d.R.	in der Regel
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN- γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminal Kinase

kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LAD	left anterior descending; Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie
LFA-1	Lymphocyte Function-Associated Antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
Ly	Ly294002
M	molare Stoffkonzentration [mol/l]
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
max.	maximal
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MCT	Monocarboxylat-Transporter
min	Minute(n)
mind.	mindestens (verwendet? evtl. beseitigen?)
Mio	Millionen
ml	Milliliter
MM6	Mono Mac 6
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
MT-MMP	Membrane-Type Matrix-Metalloprotease
NaCl	Kochsalzlösung, wo nicht anders erwähnt 0,9%
NEAA	Non-Essential Amino Acids
NFκB	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, Phosphate Buffered Saline
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PPIase	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase
rpm	rotations per minute; Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde(n)
S	Seite
s.o.	siehe oben
STEMI	ST Elevation Myocardial Infarction

TGF- β	Transforming Growth Factor β
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazolium-Chlorid
u-PA	urokinase-type Plasminogen Activator
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VCD	Video-CD
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	vergleiche
VLA-4	Very Late Antigen-4
μ l	Mikroliter
μ M	mikromolar

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Anteil des verhinderbaren Myokardschadens nach einem Herzinfarkt.....	11
Abb. 1.2: Vereinfachte Darstellung der Phasen einer Wundheilungsreaktion.....	18
Abb. 1.3: Strukturmodell von CD147.....	22
Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Hypothese dieser Studie.....	33
Abb. 2.1: Versuchsaufbau der Flusskammer.....	52
Abb. 3.1: Durch Behandlung mit anti-CD147 wird die relative Infarktgröße 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion deutlich verkleinert.....	56
Abb. 3.2: Die therapeutische Behandlung mit anti-CD147 verringert die Zelldichte im Infarkt-Grenzgebiet 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion.....	58
Abb. 3.3: Die Infarkt-Randgebiete zeigen 24 Stunden nach Ischämie und Reperfusion keine Fibrose.....	59
Abb. 3.4: Durch Behandlung mit anti-CD147 wird die relative Infarktgröße 28 Tage nach Ischämie/Reperfusion vermindert.....	61
Abb. 3.5: Bei therapeutischer Gabe von anti-CD147 zeigt sich 28 Tage nach Ischämie/Reperfusion eine nicht signifikante Verringerung des myokardialen Fibroseanteils.....	63

Abb. 3.6: Inhibition von extrazellulärem CyPA hemmt die durch CyPA vermittelte Adhäsion von MonoMac6-Zellen an aktiviertem Endothel.....	67
Abb. 3.7: Phosphoinositid-3-Kinase-Inhibition mit Ly294002 vermindert die Adhäsion CyPA-stimulierter MonoMac6-Zellen an aktiviertem Endothel.....	69
Abb. 3.8: Phosphoinositid-3-Kinase-Inhibition mit Wortmannin hemmt die Adhäsion von CyPA-stimulierten MonoMac6-Zellen an aktiviertem Endothel.....	71
Abb. 3.9: Die Inhibitionseffekte von MM284, Ly und Wortmannin auf CyPA-bedingtes Adhären und Rollen von MonoMac6-Zellen an aktiviertem Endothel unterscheiden sich nur gering und nicht signifikant.....	74

6.3 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt. Staat & Gesellschaft - Todesursachen. *Todesursachen - destatis.de* Available at: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Gesellschaft-Staat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html>. (Accessed: 20th June 2014)
2. Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information. DIMDI - ICD-10-GM Version 2014. *ICD-10-GM Version 2014* Available at: <http://www.dimdi.de/static/de/klassi/icd-10-gm/kodesuche/onlinefassungen/htmlgm2014/block-i20-i25.htm>. (Accessed: 7th July 2014)
3. Mandelzweig, L. *et al.* The second Euro Heart Survey on acute coronary syndromes: characteristics, treatment, and outcome of patients with ACS in Europe and the Mediterranean Basin in 2004. *Eur Heart J* **27**, 2285–2293 (2006).
4. Steg, P. G. *et al.* ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* **33**, 2569–2619 (2012).
5. Nahrendorf, M., Pittet, M. J. & Swirski, F. K. Monocytes: Protagonists of Infarct Inflammation and Repair After Myocardial Infarction. *Circulation* **121**, 2437–2445 (2010).
6. Frangogiannis, N. G. Regulation of the Inflammatory Response in Cardiac Repair. *Circulation Research* **110**, 159–173 (2012).
7. Seizer, P., Gawaz, M. & May, A. E. Cyclophilin A and EMMPRIN (CD147) in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* **102**, 17–23 (2014).
8. van Amerongen, M. J., Harmsen, M. C., van Rooijen, N., Petersen, A. H. & van Luyn, M. J. A. Macrophage Depletion Impairs Wound Healing and Increases Left Ventricular Remodeling after Myocardial Injury in Mice. *Am J Pathol* **170**, 818–829 (2007).
9. White, H. D. & Chew, D. P. Acute myocardial infarction. *The Lancet* **372**, 570–584 (2008).

10. Swirski, F. K. & Nahrendorf, M. Leukocyte Behavior in Atherosclerosis, Myocardial Infarction, and Heart Failure. *Science* **339**, 161–166 (2013).
11. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233–241 (2000).
12. LAVIE, C. J. & GERSH, B. J. Mechanical and Electrical Complications of Acute Myocardial Infarction. *Mayo Clinic Proceedings* **65**, 709–730 (1990).
13. Tharmaratnam, D., Nolan, J. & Jain, A. Management of cardiogenic shock complicating acute coronary syndromes. *Heart* **99**, 1614–1623 (2013).
14. Zaman, S. & Kovoov, P. Sudden Cardiac Death Early After Myocardial Infarction Pathogenesis, Risk Stratification, and Primary Prevention. *Circulation* **129**, 2426–2435 (2014).
15. Jugdutt, B. I. Monocytosis and adverse left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* **39**, 247–250 (2002).
16. Neumann, F.-J. *et al.* Cardiac Release of Cytokines and Inflammatory Responses in Acute Myocardial Infarction. *Circulation* **92**, 748–755 (1995).
17. Heymans, S. *et al.* Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med* **5**, 1135–1142 (1999).
18. Schuster, E. H. & Bulkley, B. H. Expansion of transmural myocardial infarction: a pathophysiologic factor in cardiac rupture. *Circulation* **60**, 1532–1538 (1979).
19. Michael, L. H. *et al.* Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **269**, H2147–H2154 (1995).
20. Yellon, D. M. & Hausenloy, D. J. Myocardial Reperfusion Injury. *New England Journal of Medicine* **357**, 1121–1135 (2007).
21. Ginks, W. R. *et al.* Coronary Artery Reperfusion. *J Clin Invest* **51**, 2717–2723 (1972).
22. Braunwald, E. & Kloner, R. A. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *Journal of Clinical Investigation* **76**, 1713 (1985).
23. Michael, L. H. *et al.* Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **277**, H660–H668 (1999).
24. Gibbons, R. J., Valeti, U. S., Araoz, P. A. & Jaffe, A. S. The quantification of infarct size. *Journal of the American College of Cardiology* **44**, 1533–1542 (2004).
25. White, H. D. *et al.* Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation* **76**, 44–51 (1987).
26. Gaudron, P., Eilles, C., Kugler, I. & Ertl, G. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation* **87**, 755–763 (1993).
27. Fröhlich, G. M., Meier, P., White, S. K., Yellon, D. M. & Hausenloy, D. J. Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *Eur Heart J* **34**, 1714–1722 (2013).
28. Manning, A. S. & Hearse, D. J. Reperfusion-induced arrhythmias: Mechanisms and prevention. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **16**, 497–518 (1984).
29. Braunwald, E. & Kloner, R. A. The stunned myocardium: prolonged, postischemic

- ventricular dysfunction. *Circulation* **66**, 1146–1149 (1982).
30. Hausenloy, D. J. Signalling pathways in ischaemic postconditioning. *Thrombosis and Haemostasis* (2009). doi:10.1160/TH08-11-0734
 31. Bopassa, J.-C., Ferrera, R., Gateau-Roesch, O., Couture-Lepetit, E. & Ovize, M. PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res* **69**, 178–185 (2006).
 32. Blankesteyn, W. M. *et al.* Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice. *Acta Physiologica Scandinavica* **173**, 75–82 (2001).
 33. Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O. H., Andersen, P. S. & Girardin, S. E. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin Exp Immunol* **147**, 227–235 (2007).
 34. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *Journal of Experimental Medicine* **204**, 3037–3047 (2007).
 35. White, P. D., Mallory, G. K. & Salcedo-Salgar, J. The Speed of Healing of Myocardial Infarcts. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **52**, 97–104.1 (1936).
 36. Maekawa, Y. *et al.* Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* **39**, 241–246 (2002).
 37. Herskowitz, A., Choi, S., Ansari, A. A. & Wesselingh, S. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am J Pathol* **146**, 419–428 (1995).
 38. Fenyó, I. M. & Gafencu, A. V. The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. *Immunobiology* **218**, 1376–1384 (2013).
 39. Arora, K. *et al.* Extracellular Cyclophilins Contribute to the Regulation of Inflammatory Responses. *J Immunol* **175**, 517–522 (2005).
 40. Sherry, B., Yarlett, N., Strupp, A. & Cerami, A. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *PNAS* **89**, 3511–3515 (1992).
 41. Bujak, M. *et al.* Interleukin-1 Receptor Type I Signaling Critically Regulates Infarct Healing and Cardiac Remodeling. *Am J Pathol* **173**, 57–67 (2008).
 42. Hojo, Y. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* **35**, 968–973 (2000).
 43. Balsley, M. A. *et al.* A Cell-Impermeable Cyclosporine A Derivative Reduces Pathology in a Mouse Model of Allergic Lung Inflammation. *J Immunol* **185**, 7663–7670 (2010).
 44. Schmidt, R. *et al.* Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (CD147) Is a Novel Receptor on Platelets, Activates Platelets, and Augments Nuclear Factor κ B-Dependent Inflammation in Monocytes. *Circulation Research* **102**, 302–309 (2008).
 45. Zamilpa, R. & Lindsey, M. L. Extracellular matrix turnover and signaling during cardiac remodeling following MI: causes and consequences. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 558–563 (2010).
 46. Cleutjens, J. P. M. & Creemers, E. E. J. M. Integration of concepts: Cardiac extracellular matrix remodeling after myocardial infarction. *Journal of Cardiac Failure*

- 8**, S344–S348 (2002).
47. Creemers, E. E. J. M., Cleutjens, J. P. M., Smits, J. F. M. & Daemen, M. J. A. P. Matrix Metalloproteinase Inhibition After Myocardial Infarction A New Approach to Prevent Heart Failure? *Circulation Research* **89**, 201–210 (2001).
 48. Massova, I., Kotra, L. P., Fridman, R. & Mobashery, S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J* **12**, 1075–1095 (1998).
 49. Schmidt, R. *et al.* Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer Regulates Matrix Metalloproteinase Activity in Cardiovascular Cells Implications in Acute Myocardial Infarction. *Circulation* **113**, 834–841 (2006).
 50. Koenig, G. C. *et al.* MT1-MMP-Dependent Remodeling of Cardiac Extracellular Matrix Structure and Function Following Myocardial Infarction. *The American Journal of Pathology* **180**, 1863–1878 (2012).
 51. Matsumura, S. *et al.* Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 599–609 (2005).
 52. Schmidt, R. *et al.* EMMPRIN (CD 147) is a central activator of extracellular matrix degradation by Chlamydia pneumoniae-infected monocytes. Implications for plaque rupture. *Thrombosis and Haemostasis* (2005). doi:10.1160/TH05-07-0465
 53. Ducharme, A. *et al.* Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* **106**, 55–62 (2000).
 54. Hayashidani, S. *et al.* Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **285**, H1229–H1235 (2003).
 55. Yarbrough, W. M. *et al.* Selective Targeting and Timing of Matrix Metalloproteinase Inhibition in Post-Myocardial Infarction Remodeling. *Circulation* **108**, 1753–1759 (2003).
 56. Stefanon, I. *et al.* Left and Right Ventricle Late Remodeling Following Myocardial Infarction in Rats. *PLoS ONE* **8**, e64986 (2013).
 57. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **5**, 953–964 (2005).
 58. Moore, K. J., Sheedy, F. J. & Fisher, E. A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol* **13**, 709–721 (2013).
 59. Ingersoll, M. A. *et al.* Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* **115**, e10–e19 (2010).
 60. Tsujioka, H. *et al.* Impact of Heterogeneity of Human Peripheral Blood Monocyte Subsets on Myocardial Salvage in Patients With Primary Acute Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology* **54**, 130–138 (2009).
 61. Idzkowska, E. *et al.* The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. *Scand. J. Immunol.* **82**, 163–173 (2015).
 62. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* **7**, 678–689 (2007).
 63. Beekhuizen, H. & Furth, R. van. Monocyte adherence to human vascular endothelium. *J Leukoc Biol* **54**, 363–378 (1993).
 64. Nahrendorf, M. *et al.* 18F-4V for PET–CT Imaging of VCAM-1 Expression in

- Atherosclerosis. *JACC: Cardiovascular Imaging* **2**, 1213–1222 (2009).
65. Iademarco, M. F., Barks, J. L. & Dean, D. C. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression by IL-4 and TNF-alpha in cultured endothelial cells. *J Clin Invest* **95**, 264–271 (1995).
 66. Seizer, P. *et al.* Disrupting the EMMPRIN (CD147)–Cyclophilin A Interaction Reduces Infarct Size and Preserves Systolic Function After Myocardial Ischemia and Reperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 1377–1386 (2011).
 67. Yuan, W., Ge, H. & He, B. Pro-inflammatory activities induced by CyPA–EMM-PRIN interaction in monocytes. *Atherosclerosis* **213**, 415–421 (2010).
 68. Lee, W. W. *et al.* PET/MRI of Inflammation in Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology* **59**, 153–163 (2012).
 69. Bahmed, K. *et al.* Extracellular cyclophilin-A stimulates ERK1/2 phosphorylation in a cell-dependent manner but broadly stimulates nuclear factor kappa B. *Cancer Cell International* **12**, 19 (2012).
 70. Spinale, F. G. *et al.* A Matrix Metalloproteinase Induction/Activation System Exists in the Human Left Ventricular Myocardium and Is Upregulated in Heart Failure. *Circulation* **102**, 1944–1949 (2000).
 71. Lowe, G. D., Machado, S. G., Krol, W. F., Barton, B. A. & Forbes, C. D. White blood cell count and haematocrit as predictors of coronary recurrence after myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* **54**, 700–703 (1985).
 72. Engström, G., Melander, O. & Hedblad, B. Leukocyte Count and Incidence of Hospitalizations Due to Heart Failure. *Circ Heart Fail* **2**, 217–222 (2009).
 73. Thomas, K. A. Vascular Endothelial Growth Factor, a Potent and Selective Angiogenic Agent. *J. Biol. Chem.* **271**, 603–606 (1996).
 74. Desmoulière, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. & Gabbiani, G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* **122**, 103–111 (1993).
 75. Jugdutt B. Prevention of ventricular remodelling post myocardial infarction: timing and duration of therapy. *Can J Cardiol* **9**, 103–114 (1992).
 76. Frantz, S., Bauersachs, J. & Ertl, G. Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Res* **81**, 474–481 (2009).
 77. Leuschner, F. *et al.* Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. *Nat Biotech* **29**, 1005–1010 (2011).
 78. Panizzi, P. *et al.* Impaired Infarct Healing in Atherosclerotic Mice With Ly-6Chi Monocytosis. *Journal of the American College of Cardiology* **55**, 1629–1638 (2010).
 79. Jugdutt, B. I. Ventricular Remodeling After Infarction and the Extracellular Collagen Matrix When Is Enough Enough? *Circulation* **108**, 1395–1403 (2003).
 80. Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J. & Speicher, D. W. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* **226**, 544–547 (1984).
 81. Yurchenko, V., Constant, S. & Bukrinsky, M. Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins. *Immunology* **117**, 301–309 (2006).
 82. Nigro, P. *et al.* Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E–deficient mice. *J Exp Med* **208**, 53–66 (2011).
 83. Fischer, G. & Schmid, F. X. The mechanism of protein folding. Implications of in

- vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry* **29**, 2205–2212 (1990).
84. Galat, A. Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *European Journal of Biochemistry* **216**, 689–707 (1993).
 85. Song, F. *et al.* Cyclophilin A (CyPA) Induces Chemotaxis Independent of Its Peptidylprolyl Cis-Trans Isomerase Activity DIRECT BINDING BETWEEN CyPA AND THE ECTODOMAIN OF CD147. *J. Biol. Chem.* **286**, 8197–8203 (2011).
 86. Bram, R. J., Hung, D. T., Martin, P. K., Schreiber, S. L. & Crabtree, G. R. Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: roles of calcineurin binding and cellular location. *Mol Cell Biol* **13**, 4760–4769 (1993).
 87. Billich, A. *et al.* Mode of action of SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus (HIV) type 1: interference with HIV protein-cyclophilin A interactions. *J. Virol.* **69**, 2451–2461 (1995).
 88. Malešević, M. *et al.* A Cyclosporin Derivative Discriminates between Extracellular and Intracellular Cyclophilins. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 213–215 (2010).
 89. Heinzmann, D. *et al.* The Novel Extracellular Cyclophilin A (CyPA) - Inhibitor MM284 Reduces Myocardial Inflammation and Remodeling in a Mouse Model of Troponin I -Induced Myocarditis. *PLoS ONE* **10**, e0124606 (2015).
 90. Tegeder, I. *et al.* Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis. *J. Clin. Immunol.* **17**, 380–386 (1997).
 91. Nigro, P., Pompilio, G. & Capogrossi, M. C. Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis* **4**, e888 (2013).
 92. Nagaraju, M., McGowan, L. C. & Hamelberg, D. Cyclophilin A Inhibition: Targeting Transition-State-Bound Enzyme Conformations for Structure-Based Drug Design. *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 403–410 (2013).
 93. Billich, A., Winkler, G., Aschauer, H., Rot, A. & Peichl, P. Presence of Cyclophilin A in Synovial Fluids of Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Exp Med* **185**, 975–980 (1997).
 94. Suzuki, J., Jin, Z.-G., Meoli, D. F., Matoba, T. & Berk, B. C. Cyclophilin A Is Secreted by a Vesicular Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research* **98**, 811–817 (2006).
 95. Seizer, P. *et al.* EMMPRIN and its ligand Cyclophilin A as novel diagnostic markers in inflammatory cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology* **163**, 299–304 (2013).
 96. Iacono, K. T., Brown, A. L., Greene, M. I. & Saouaf, S. J. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Experimental and Molecular Pathology* **83**, 283–295 (2007).
 97. Damsker, J. M. *et al.* Targeting the chemotactic function of CD147 reduces collagen-induced arthritis. *Immunology* **126**, 55–62 (2009).
 98. Gwinn, W. M. *et al.* Novel Approach to Inhibit Asthma-Mediated Lung Inflammation Using Anti-CD147 Intervention. *J Immunol* **177**, 4870–4879 (2006).
 99. Xu, Q., Leiva, M. C., Fischkoff, S. A., Handschumacher, R. E. & Lyttle, C. R. Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J. Biol. Chem.* **267**, 11968–11971 (1992).

100. Jin, Z.-G. *et al.* Cyclophilin A Is a Secreted Growth Factor Induced by Oxidative Stress. *Circulation Research* **87**, 789–796 (2000).
101. Satoh, K. *et al.* Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II–induced aortic aneurysms. *Nat Med* **15**, 649–656 (2009).
102. Kasinrerk, W. *et al.* Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule. *J Immunol* **149**, 847–854 (1992).
103. Miyauchi, T. *et al.* Basigin, a New, Broadly Distributed Member of the Immunoglobulin Superfamily, Has Strong Homology with Both the Immunoglobulin V Domain and the β -Chain of Major Histocompatibility Complex Class II Antigen. *J Biochem* **107**, 316–323 (1990).
104. Biswas, C. Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **109**, 1026–1034 (1982).
105. Biswas, C. *et al.* The Human Tumor Cell-derived Collagenase Stimulatory Factor (Renamed EMMPRIN) Is a Member of the Immunoglobulin Superfamily. *Cancer Res* **55**, 434–439 (1995).
106. Yurchenko, V. *et al.* Active Site Residues of Cyclophilin A Are Crucial for Its Signaling Activity via CD147. *J. Biol. Chem.* **277**, 22959–22965 (2002).
107. Seulberger, H., Unger, C. M. & Risau, W. HT7, Neurothelin, Basigin, gp42 and OX-47 - many names for one developmentally regulated immuno-globulin-like surface glycoprotein on blood-brain barrier endothelium, epithelial tissue barriers and neurons. *Neuroscience Letters* **140**, 93–97 (1992).
108. Schlegel, J. *et al.* Solution Characterization of the Extracellular Region of CD147 and Its Interaction with Its Enzyme Ligand Cyclophilin A. *Journal of Molecular Biology* **391**, 518–535 (2009).
109. Sun, J. & Hemler, M. E. Regulation of MMP-1 and MMP-2 Production through CD147/Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer Interactions. *Cancer Res* **61**, 2276–2281 (2001).
110. Huet, E. *et al.* Extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 promotes myofibroblast differentiation by inducing α -smooth muscle actin expression and collagen gel contraction: implications in tissue remodeling. *FASEB J* **22**, 1144–1154 (2008).
111. Huet, E., Gabison, E. E., Mourah, S. & Menashi, S. Role of Emmprin/CD147 in Tissue Remodeling. *Connective Tissue Research* **49**, 175–179 (2008).
112. Yang, Y., Lu, N., Zhou, J., Chen, Z. – & Zhu, P. Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **47**, 1299–1310 (2008).
113. Zhu, P. *et al.* Expression of CD147 on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis: its potential role in monocyte accumulation and matrix metalloproteinase production. *Arthritis Research & Therapy* **7**, R1023 (2005).
114. Major, T. C., Liang, L., Lu, X., Rosebury, W. & Bocan, T. M. A. Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) Is Induced Upon Monocyte Differentiation and Is Expressed in Human Atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 1200–1207 (2002).
115. Tang, Y., Kesavan, P., Nakada, M. T. & Yan, L. Tumor-Stroma Interaction: Positive Feedback Regulation of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMM-PRIN) Expression and Matrix Metalloproteinase-Dependent Generation of Soluble

- EMMPRIN. *Mol Cancer Res* **2**, 73–80 (2004).
116. Pushkarsky, T. *et al.* CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *PNAS* **98**, 6360–6365 (2001).
 117. Yurchenko, V. *et al.* CD147 Is a Signaling Receptor for Cyclophilin B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **288**, 786–788 (2001).
 118. Pushkarsky, T. *et al.* Cell Surface Expression of CD147/EMMPRIN Is Regulated by Cyclophilin 60. *J. Biol. Chem.* **280**, 27866–27871 (2005).
 119. Yurchenko, V. *et al.* Regulation of CD147 Cell Surface Expression INVOLVEMENT OF THE PROLINE RESIDUE IN THE CD147 TRANSMEMBRANE DOMAIN. *J. Biol. Chem.* **280**, 17013–17019 (2005).
 120. Saphire, A. C. S., Bobardt, M. D. & Gally, P. A. Host cyclophilin A mediates HIV-1 attachment to target cells via heparans. *EMBO J* **18**, 6771–6785 (1999).
 121. Vanpouille, C. *et al.* Octasaccharide is the minimal length unit required for efficient binding of cyclophilin B to heparin and cell surface heparan sulphate. *Biochemical Journal* **382**, 733 (2004).
 122. Bukrinsky, M. Extracellular cyclophilins in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1850**, 2087–2095 (2015).
 123. Kirk, P. *et al.* CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J* **19**, 3896–3904 (2000).
 124. Han, M., Trotta, P., Coleman, C. & Linask, K. K. MCT-4, A511/basigin and EF5 expression patterns during early chick cardiomyogenesis indicate cardiac cell differentiation occurs in a hypoxic environment. *Dev. Dyn.* **235**, 124–131 (2006).
 125. Zhang, F., Vannucci, S. J., Philp, N. J. & Simpson, I. A. Monocarboxylate transporter expression in the spontaneous hypertensive rat: Effect of stroke. *J. Neurosci. Res.* **79**, 139–145 (2005).
 126. Williams, T. M. & Lisanti, M. P. The caveolin proteins. *Genome Biol* **5**, 214 (2004).
 127. Tang, W. & Hemler, M. E. Caveolin-1 Regulates Matrix Metalloproteinases-1 Induction and CD147/EMMPRIN Cell Surface Clustering. *J. Biol. Chem.* **279**, 11112–11118 (2004).
 128. Berditchevski, F., Chang, S., Bodorova, J. & Hemler, M. E. Generation of Monoclonal Antibodies to Integrin-associated Proteins EVIDENCE THAT $\alpha 3 \beta 1$ COMPLEXES WITH EMMPRIN/BASIGIN/OX47/M6. *J. Biol. Chem.* **272**, 29174–29180 (1997).
 129. Engbring, J. A. & Kleinman, H. K. The basement membrane matrix in malignancy. *The Journal of Pathology* **200**, 465–470 (2003).
 130. Seizer, P. *et al.* EMMPRIN (CD147) is a novel receptor for platelet GPVI and mediates platelet rolling via GPVI-EMMPRIN interaction. *Thrombosis and Haemostasis* (2009). doi:10.1160/TH08-06-0368
 131. Schulz, C. *et al.* EMMPRIN (CD147/basigin) mediates platelet–monocyte interactions in vivo and augments monocyte recruitment to the vascular wall. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **9**, 1007–1019 (2011).
 132. Bony, V., Gane, P., Bailly, P. & Cartron, J.-P. Time-course expression of polypeptides carrying blood group antigens during human erythroid differentiation. *British Journal of Haematology* **107**, 263–274 (1999).
 133. Coste, I. *et al.* Unavailability of CD147 leads to selective erythrocyte trapping in the spleen. *Blood* **97**, 3984–3988 (2001).

134. Philp, N. J., Ochrietor, J. D., Rudoy, C., Muramatsu, T. & Linser, P. J. Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 Expression in the Retinal Pigment Epithelium and Neural Retina of the 5A11/Basigin-Null Mouse. *IOVS* **44**, 1305–1311 (2003).
135. Hori, K. *et al.* Retinal Dysfunction in Basigin Deficiency. *IOVS* **41**, 3128–3133 (2000).
136. Igakura, T. *et al.* A Null Mutation in Basigin, an Immunoglobulin Superfamily Member, Indicates Its Important Roles in Peri-implantation Development and Spermatogenesis. *Developmental Biology* **194**, 152–165 (1998).
137. Naruhashi, K. *et al.* Abnormalities of Sensory and Memory Functions in Mice LackingBsgGene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **236**, 733–737 (1997).
138. Seizer, P. *et al.* Cyclophilin A affects inflammation, virus elimination and myocardial fibrosis in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **53**, 6–14 (2012).
139. Guo, H., Zucker, S., Gordon, M. K., Toole, B. P. & Biswas, C. Stimulation of Matrix Metalloproteinase Production by Recombinant Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer from Transfected Chinese Hamster Ovary Cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 24–27 (1997).
140. Kataoka, H., DeCastro, R., Zucker, S. & Biswas, C. Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Research* **53**, 3154–3158 (1993).
141. Kanekura, T., Chen, X. & Kanzaki, T. Basigin (cd147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int. J. Cancer* **99**, 520–528 (2002).
142. Seizer, P. *et al.* EMMPRIN and its ligand cyclophilin A regulate MT1-MMP, MMP-9 and M-CSF during foam cell formation. *Atherosclerosis* **209**, 51–57 (2010).
143. Seko, Y. *et al.* Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **317**, 162–168 (2004).
144. Nie, R. *et al.* Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) Is Increased in Human Left Ventricle after Acute Myocardial Infarction. *Archives of Medical Research* **40**, 605–611 (2009).
145. Yan, J. *et al.* The clinical implications of increased cyclophilin A levels in patients with acute coronary syndromes. *Clinica Chimica Acta* **413**, 691–695 (2012).
146. Gough, P. J. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation* **116**, 59–69 (2005).
147. NABESHIMA, K. *et al.* Expression of emmprin and matrix metalloproteinases (MMPs) in peripheral nerve sheath tumors: emmprin and membrane-type (MT) 1-MMP expressions are associated with malignant potential. *Anticancer research* **26**, 1359–1367 (2006).
148. Liu, X., Zhao, Z. & Liu, W. Insights into the Roles of Cyclophilin A During Influenza Virus Infection. *Viruses* **5**, 182–191 (2013).
149. Fischer, G., Gallay, P. & Hopkins, S. Cyclophilin inhibitors for the treatment of HCV infection. *Curr Opin Investig Drugs* **11**, 911–918 (2010).
150. Steinkasserer, A. *et al.* Mode of action of SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive

- cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): interference with early and late events in HIV-1 replication. *J. Virol.* **69**, 814–824 (1995).
151. Seropian, I. M. *et al.* Pharmacologic Inhibition of Phosphoinositide 3-Kinase Gamma (PI3K[γ]) Promotes Infarct Resorption and Prevents Adverse Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction in Mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology December 2010* **56**, 651–658 (2010).
 152. Young, L. H., Ikeda, Y., Scalia, R. & Lefer, A. M. Wortmannin, a Potent Anti-neutrophil Agent, Exerts Cardioprotective Effects in Myocardial Ischemia/Reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* **295**, 37–43 (2000).
 153. Doukas, J. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase γ/δ inhibition limits infarct size after myocardial ischemia/reperfusion injury. *PNAS* **103**, 19866–19871 (2006).
 154. Cantley, L. C. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science* **296**, 1655–1657 (2002).
 155. Guha, M. The Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway Limits Lipopolysaccharide Activation of Signaling Pathways and Expression of Inflammatory Mediators in Human Monocytic Cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 32124–32132 (2002).
 156. Vanhaesebroeck, B., Ali, K., Bilancio, A., Geering, B. & Foukas, L. C. Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 194–204 (2005).
 157. Ward, S. G. & Blunt, M. D. Pharmacological targeting of phosphoinositide lipid kinases and phosphatases in the immune system: success, disappointment, and new opportunities. *Front. Immun.* **3**, 226 (2012).
 158. Hirsch, E. *et al.* Central Role for G Protein-Coupled Phosphoinositide 3-Kinase γ in Inflammation. *Science* **287**, 1049–1053 (2000).
 159. Tang, Y. *et al.* Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression by EMMPRIN via the PI3K-Akt Signaling Pathway. *Mol Cancer Res* **4**, 371–377 (2006).
 160. Seizer, P. *et al.* Extracellular cyclophilin A activates platelets via EMMPRIN (CD147) and PI3K/Akt signaling, which promotes platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 655–663 (2015).
 161. Libby, P., Maroko, P. R., Bloor, C. M., Sobel, B. E. & Braunwald, E. Reduction of Experimental Myocardial Infarct Size by Corticosteroid Administration. *J Clin Invest* **52**, 599–607 (1973).
 162. Entman, M. L. *et al.* Inflammation in the course of early myocardial ischemia. *The FASEB journal* **5**, 2529–2537 (1991).
 163. Skyschally, A., Schulz, R. & Heusch, G. Cyclosporine A at Reperfusion Reduces Infarct Size in Pigs. *Cardiovasc Drugs Ther* **24**, 85–87 (2010).
 164. Piot, C. *et al.* Effect of Cyclosporine on Reperfusion Injury in Acute Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine* **359**, 473–481 (2008).
 165. Ochmann, C. CD147 (EMMPRIN) und dessen Ligand Cyclophilin A bestimmen das Ausmaß des myokardialen Schadens nach Ischämie/Reperfusion im Mausmodell. (Ludwig-Maximilians-Universität, 2010).
 166. Zach, S. Cyclophilin A und sein Rezeptor CD147 bei myokardialer Ischämie und Reperfusion der Maus. (Universität Tübingen, 2012).

167. Ziegler-Heitbrock, H. W. *et al.* Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int. J. Cancer* **41**, 456–461 (1988).
168. Ziegler-Heitbrock, H. W. *et al.* Distinct patterns of differentiation induced in the monocytic cell line Mono Mac 6. *J. Leukoc. Biol.* **55**, 73–80 (1994).
169. Zolotareva, A. G. & Kogan, M. E. Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice. *Cor Vasa* **20**, 308–314 (1978).
170. Borst, O. *et al.* Methods Employed for Induction and Analysis of Experimental Myocardial Infarction in Mice. *Cellular Physiology and Biochemistry* **28**, 1–12 (2011).
171. Bos, E. J. van den, Mees, B. M. E., Waard, M. C. de, Crom, R. de & Duncker, D. J. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **289**, H1291–H1300 (2005).
172. Degabriele, N. M. *et al.* Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction. *Exp Physiol* **89**, 497–505 (2004).
173. Ahn, D. *et al.* Induction of myocardial infarcts of a predictable size and location by branch pattern probability-assisted coronary ligation in C57BL/6 mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **286**, H1201–H1207 (2004).
174. Hausenloy, D. J. *et al.* Translating novel strategies for cardioprotection: the Hatter Workshop Recommendations. *Basic Res Cardiol* **105**, 677–686 (2010).
175. Kim, W. G., Shin, Y. C., Hwang, S. W., Lee, C. & Na, C. Y. Comparison of myocardial infarction with sequential ligation of the left anterior descending artery and its diagonal branch in dogs and sheep. *Int J Artif Organs* **26**, 351–357 (2003).
176. Dewald, O. *et al.* Of Mice and Dogs: Species-Specific Differences in the Inflammatory Response Following Myocardial Infarction. *The American Journal of Pathology* **164**, 665–677 (2004).
177. James, J. F., Hewett, T. E. & Robbins, J. Cardiac Physiology in Transgenic Mice. *Circulation Research* **82**, 407–415 (1998).
178. Kumar, D. *et al.* Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation. [Miscellaneous Article]. *Coronary Artery Disease February 2005* **16**, 41–44 (2005).
179. Salto-Tellez, M. *et al.* Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: A quantifiable and highly reproducible experimental model. *Cardiovascular Pathology* **13**, 91–97 (2004).
180. Youker, K. A. *et al.* Molecular evidence for induction of intracellular adhesion molecule-1 in the viable border zone associated with ischemia-reperfusion injury of the dog heart. *Circulation* **89**, 2736–2746 (1994).
181. Cleutjens, J. P., Verluyten, M. J., Smiths, J. F. & Daemen, M. J. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol* **147**, 325–338 (1995).
182. Richardson, M. R., Lai, X., Witzmann, F. A. & Yoder, M. C. Venous and arterial endothelial proteomics: mining for markers and mechanisms of endothelial diversity. *Expert Rev Proteomics* **7**, 823–831 (2010).
183. Polchow, B. *et al.* Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks. *J Transl Med* **10**, 98 (2012).
184. Striker, G. E., Harlan, J. M. & Schwartz, S. M. Human endothelial cells in vitro.

- Methods Cell Biol.* **21A**, 135–151 (1980).
185. Pober, J. S. Effects of tumour necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells. *Ciba Found. Symp.* **131**, 170–184 (1987).
 186. Munro, J. M., Pober, J. S. & Cotran, R. S. Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of Papanicolaou anubis. *Am J Pathol* **135**, 121–133 (1989).
 187. Gamble, J. R., Harlan, J. M., Klebanoff, S. J. & Vadas, M. A. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**, 8667–8671 (1985).
 188. Haas, J. G., Baeuerle, P. A., Riethmüller, G. & Ziegler-Heitbrock, H. W. Molecular mechanisms in down-regulation of tumor necrosis factor expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 9563–9567 (1990).
 189. Erl, W., Weber, C., Wardemann, C. & Weber, P. C. Adhesion properties of Mono Mac 6, a monocytic cell line with characteristics of mature human monocytes. *Atherosclerosis* **113**, 99–107 (1995).
 190. Hauck, C. R., Lorenzen, D., Saas, J. & Meyer, T. F. An in vitro-differentiated human cell line as a model system to study the interaction of Neisseria gonorrhoeae with phagocytic cells. *Infection and immunity* **65**, 1863–1869 (1997).
 191. Jia, J. *et al.* Inhibitory effect of CD147/HAb18 monoclonal antibody on cartilage erosion and synovitis in the SCID mouse model for rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **48**, 721–726 (2009).
 192. Iwasaka, T. *et al.* Residual Left Ventricular Pump Function After Acute Myocardial Infarction in NIDDM Patients. *Dia Care* **15**, 1522–1526 (1992).
 193. Huhn, R. *et al.* Cyclosporine A administered during reperfusion fails to restore cardioprotection in prediabetic Zucker obese rats in vivo. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **20**, 706–712 (2010).
 194. Bujak, M. *et al.* Aging-Related Defects Are Associated With Adverse Cardiac Remodeling in a Mouse Model of Reperfused Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology* **51**, 1384–1392 (2008).
 195. Ertl, G. & Frantz, S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **66**, 22–32 (2005).
 196. Simpson, D. M. & Ross, R. The neutrophilic leukocyte in wound repair. *Journal of Clinical Investigation* **51**, 2009–2023 (1972).
 197. Gallay, P. & Lin. Profile of alisporivir and its potential in the treatment of hepatitis C. *Drug Design, Development and Therapy* **105** (2013). doi:10.2147/DDDT.S30946
 198. Muramatsu, T. & Miyauchi, T. Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol. Histopathol.* **18**, 981–987 (2003).

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Forschungslabor der Medizinischen Klinik III, Abteilung für Kardiologie und Kreislauferkrankungen, Tübingen durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Professor Dr. Seizer. Er hat ebenfalls die Betreuung sowie die Korrektur des Manuskripts übernommen.

Die Operation der Mäuse erfolgte durch Frau Dr. Ochmann, sie stellte die Daten für die Abbildungen 3.1 und 3.4 zur Verfügung.

Ich, Florian Daltoè, habe sämtliche übrigen Versuche durchgeführt, insbesondere die histologischen Untersuchungen und die Pflege, Isolierung und Untersuchungen der monozytären Zellkultur. Die statistische Auswertung erfolgte durch mich nach Beratung durch Herrn Professor Dr. Seizer.

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

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen meinen Dank ausdrücken, die in verschiedener Weise besonders zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Peter Seizer für die Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit und für seine freundliche und kompetente Betreuung in allen Phasen der Promotion. Unter seiner geduldigen Beratung und Unterstützung konnte ich die vorliegende Fragestellung bearbeiten.

Ich danke Herrn Professor Dr. Andreas May für die Annahme als Doktorand seiner Arbeitsgruppe.

Herrn Professor Dr. Meinrad Gawaz möchte ich danken für die von ihm geschaffenen Strukturen, welche diese experimentelle Forschungsarbeit erst ermöglichten.

Für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung der Operationen danke ich Frau Dr. Carmen Ochmann.

Frau Klaudia Posavec, Frau Christina Flaum und Frau Jadwiga Kwiatkowska danke ich herzlich für die praktische Unterstützung, die freundlichen Antworten und für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.

Zudem danke ich meinen Eltern, die mich immer unterstützt, bestärkt und motiviert haben.