

Charakterisierung der Rezeptorabhängigen pro- inflammatorischen und pro-thrombotischen Effekte von Cyclophilin A

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Saskia Natascha Isabell Freiin von Ungern-Sternberg

aus Hannover

Tübingen

2018

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

13.11.2018

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thilo Stehle

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Seizer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Kardiovaskuläre Zellen bei thromboinflammatorischen kardiovaskulären Erkrankungen	1
1.1.1. Thrombozyten	1
1.1.2. Monozyten	5
1.1.3. Monozyten-Thrombozyten-Aggregate	7
1.2. Cyclophilin A	8
1.2.1. Posttranslationale Modifikationen	10
1.2.2. Extrazelluläres CyPA	10
1.3. Das Immunglobulin CD147.....	11
1.3.1. Bindungspartner von CD147	13
1.3.2. Vorkommen und Expression von CD147	13
1.3.3. Die Interaktion von CD147 und CyPA bei kardiovaskulären Erkrankungen	14
1.3.4. Die Interaktion von CyPA und CD147 in Entzündungs-vermittelten Erkrankungen	16
1.4. Das Immunglobulin RAGE	17
1.4.1. „Splicing“ Formen von RAGE.....	18
1.4.2. Bindungspartner von RAGE.....	18
1.4.3. Vorkommen und Expression von RAGE.....	19
1.4.4. RAGE und kardiovaskuläre Erkrankungen.....	20
1.5. Zielsetzung.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Chemikalien, Antikörper und Lösungen	21
2.2. Zellbiologische Arbeiten	32
2.2.1. Isolation von humanen Thrombozyten	32
2.2.2. Isolation von humanen Monozyten aus Vollblut	33

2.2.3.	<i>Isolation von murinen Monozyten aus Knochenmark</i>	33
2.3.	Proteinbiochemische Methoden	34
2.3.1.	<i>Detektion von Proteinen mittels Gelelektrophorese und Western Blot</i>	34
2.3.2.	<i>Konfokale Aufnahmen</i>	36
2.3.3.	<i>Bindungs-ELISA</i>	37
2.4.	Funktionelle Assays.....	39
2.4.1.	<i>Statischer Adhäsions-Assay</i>	39
2.4.2.	<i>Migration</i>	39
2.4.3.	<i>Dynamische Adhäsion mit humanen Monozyten und murinen Leukozyten (Flusskammer)</i>	41
2.4.4.	<i>Thrombozytenaktivierung</i>	42
2.4.5.	<i>Thrombusformation</i>	43
2.5.	<i>In vivo</i> Versuche an der Maus	44
2.5.1.	<i>Versuchstiere</i>	44
2.5.2.	<i>Peritonitis</i>	45
2.5.3.	<i>Intravital Mikroskopie – Ligatur an der Karotis – in vivo Adhäsion von Thrombozyten</i>	46
2.5.4.	<i>Intravital Mikroskopie - FeCl₃ (Eisen(III)Chlorid Modell in Mesenterialgefäßen – in vivo Thrombusbildung</i>	47
2.5.5.	<i>Blutungszeit - Schwanzspitzensektion</i>	47
2.5.6.	<i>Ethische Vertretbarkeit der Tierversuche</i>	48
2.6.	Statistische Auswertung	48
3.	Ergebnisse	49
3.1.	Einfluss von extrazellulärem CyPA auf Thrombozyten.....	49
3.1.1.	<i>Wirkung von extrazellulärem CyPA auf humane Thrombozyten</i>	49
3.1.2.	<i>Einfluss von extrazellulärem CyPA auf murine Thrombozyten</i>	51
3.1.3.	<i>Einfluss von intrazellulärem CyPA auf die Aktivierung von murinen Thrombozyten</i>	52

3.2.	Entwicklung eines spezifischen CyPA Antikörpers.....	55
3.2.1.	<i>Screening nach einem spezifischen CyPA Antikörper.....</i>	55
3.2.2.	<i>Funktionstest der CyPA Antikörper</i>	56
3.2.3.	<i>Entzündungshemmende Effekt von 8H7-mAk in vitro</i>	57
3.2.4.	<i>8H7-mAk hemmt die Infiltration von Zellen in vivo</i>	58
3.2.5.	<i>8H7-mAk reduziert die CyPA-vermittelte Thrombozytenaktivierung</i>	59
3.2.6.	<i>8H7-mAk hat anti-thrombotische Effekte.....</i>	60
3.2.7.	<i>8H7-mAk reduziert die Thrombusbildung in vivo</i>	61
3.2.8.	<i>8H7-mAk hat keinen Einfluss auf Hämostaseparameter von Thrombozyten.....</i>	62
3.3.	CyPA ist ein neuer Ligand des „Receptor for advanced glycation endproducts“ (RAGE)	64
3.3.1.	<i>RAGE und CD147 / CyPA sind auf der Oberfläche von Monozyten kolokalisiert</i> <i>64</i>	
3.3.2.	<i>Die CyPA-vermittelten Adhärenz und Migration von Monozyten geht über die</i> <i>Rezeptoren RAGE und CD147</i>	66
3.3.3.	<i>CyPA induziert die Adhäsion und Migration von Monozyten über die Bindung</i> <i>an RAGE in vitro</i>	68
3.3.4.	<i>Die CyPA-vermittelt Infiltration von inflammatorischen Zellen involviert den</i> <i>AGE-Rezeptor.....</i>	70
3.3.5.	<i>CyPA induziert pro-thrombotische Effekte über die Bindung an den RAGE.....</i>	71
3.3.6.	<i>RAGE-defiziente Mäuse bilden nach CyPA Stimulation keine Thromben auf</i> <i>einer Kollagenmatrix.....</i>	72
4.	Diskussion	74
4.1.	Einfluss von extrazellulärem CyPA auf Thrombozyten.....	74
4.2.	Screening und Testung eines spezifischen CyPA Antikörpers	75
4.2.1.	<i>Screening und Funktionstest nach einem spezifischen Antikörper</i>	75
4.2.2.	<i>8H7-mAk beeinflusst die CyPA-induzierte Adhäsion und Migration von</i> <i>Monozyten</i>	76
4.2.3.	<i>Der Einfluss von 8H7-mAk auf die CyPA-induzierte Thrombozytenaktivierung</i>	77
4.2.4.	<i>Limitierung der 8H7-mAk Studie</i>	78

4.3.	Die Interaktion von CyPA und mit RAGE.....	79
4.3.1.	<i>Die CyPA-RAGE Interaktion beeinflusst Monozyten.....</i>	<i>79</i>
4.3.2.	<i>Signalkaskade von RAGE nach Ligandbindung.....</i>	<i>81</i>
4.3.3.	<i>Auswirkung der CyPA-RAGE Interaktion auf Thrombozyten.....</i>	<i>81</i>
4.4.	Fazit	82
5.	Zusammenfassung.....	83
6.	Summary	85
7.	Literaturverzeichnis.....	86
8.	Anhang	98
8.1.	Buchstaben-Code der Aminosäuren	98
8.2.	Kristallstruktur Ig Domänen	99
8.3.	Abbildungsverzeichnis	100
8.4.	Tabellenverzeichnis	102
8.5.	Zusammensetzung des Western Blot Gels	103
8.5.1.	<i>15% Trenngel.....</i>	<i>103</i>
8.5.2.	<i>Sammelgel</i>	<i>103</i>
8.6.	Abkürzungsverzeichnis	104
8.7.	Publikationen und Kongressbeiträge	109
8.7.1.	<i>Publikationen</i>	<i>109</i>
8.7.2.	<i>Kongressbeiträge</i>	<i>110</i>
8.8.	Danksagung	112

1. Einleitung

1.1. Kardiovaskuläre Zellen bei thromboinflammatorischen kardiovaskulären Erkrankungen

1.1.1. Thrombozyten

Der Thrombozyt wurde erstmals im Jahr 1865 von Max Schultze beschrieben. Kurze Zeit später, im Jahr 1882 wurde von Julius Bizzozero nachgewiesen, dass Thrombozyten zu den sich im Blut befindenden Zellen gehören und damit Teil des Blutkreislaufs sind. Sie sind die ersten Zellen, die sich an einer beschädigten Gefäßwand anheften und einen Thrombus bilden. Sich im Blut befindende Thrombozyten haben einen Durchmesser von $2-5 \mu\text{m}^1$. Damit ist der Thrombozyt die kleinste Blutzelle im humanen Körper. Darüber hinaus besitzt der Thrombozyt keinen Nukleus. Ein gesunder Mensch besitzt zwischen $150 - 350 \times 10^9$ Thrombozyten pro Liter².

1.1.1.1. Die Entstehung von Thrombozyten

Die Entwicklung der Megakaryozyten und der anschließenden Entstehung der Thrombozyten wird durch Zytokine reguliert. Dabei spielt vor allem Thrombopoietin eine wichtige Rolle. Megakaryozyten befinden sich im Knochenmark in der Nähe kleiner Blutgefäße. Durch die Scherkräfte in den Blutgefäßen kommt es zur Fragmentierung der Megakaryozyten, wodurch die einzelnen Thrombozyten entstehen und in den Blutkreislauf gelangen. Die Lebensdauer der Thrombozyten beträgt circa 10 Tage³. Am Ende ihres Lebens werden sie in der Leber und der Milz wieder angebaut⁴.

1.1.1.2. Struktureller Aufbau des Thrombozyten

Der Thrombozyt besitzt verschiedene Zellorganellen, darunter verschiedene Speichergranula, die alpha-Granula (α -Granula), die Dichte Granula (δ -Granula) und die Lysosomen, sowie das intrazelluläre Membransystem und die Mitochondrien, die als Energielieferant für die Thrombozyten dienen². Bei ruhenden Thrombozyten sind die Zellorganellen, beschrieben in den folgenden Absätzen, voneinander getrennt im Zytoplasma zu finden. Bereits wenige Minuten nach der Aktivierung durch Thrombin gruppieren sich die Zellorganellen in der Mitte des Thrombozyten und um die Zellorganellen entsteht ein Ring aus Mikrotubulien und Mikrofilamenten. Des Weiteren kommt es zur Degranulation der Speichergranula⁵.

1.1.1.2.1. α -Granula

Die α -Granula haben einen Durchmesser von 200-500 nm. Jeder Thrombozyt besitzt zwischen 50 und 80 α -Granula. In den α -Granula befinden sich sowohl membranassoziierte als auch nicht membrangebundene Proteine. Die α -Granula sind in nicht-aktivierten, ruhenden Thrombozyten voneinander getrennt².

Bei der Thrombozytenaktivierung werden die membrangebundenen Proteine an der Thrombozytenoberfläche exprimiert, darunter P-Selektin (CD62P), $\alpha_{IIb}\beta_3$ und von Willebrand Faktor². Die nicht membrangebundenen Proteine, wie SDF (englisch: „stromal cell-derived factor“-1 α), werden in den extrazellulären Raum freigesetzt^{2, 6, 7}. Damit haben die α -Granula auch eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr, da sie durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen die Leukozytenfunktion beeinflussen können, was wiederum zur Migration oder anderen pro-inflammatorische Funktionen der Leukozyten fördert⁸ bzw. den Phänotyp von Monozyten hin zum pro-migratorischen und pro-adhäsiven Phänotyp ändern kann⁶. Die α -Granula haben ihren Ursprung im Golgi Komplex der Megakaryozyten, genauso wie die δ -Granula⁹, welche im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

1.1.1.2.2. δ -Granula

Von den δ -Granula befinden sich 3-8 in jedem Thrombozyten welche je einen Durchmesser von 200-300 nm haben. In den δ -Granula befindet sich unter anderem Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Kalzium (Ca^{2+}), Magnesium (Mg^{2+}) und Serotonin². Die Freisetzung der verschiedenen Substanzen erfolgt durch die Exozytose. Die Freisetzung von ADP ist als beteiligt an der Aggregation, Thromboxan Generation und der Formänderung der Thrombozyten durch die Bindung an die Rezeptoren P_2Y_1 und P_2Y_{12} . Damit ist die Sekretion von ADP essenziell für die Hämostase^{7, 10}. Vor kurzen wurde gezeigt, dass Serotonin eine wichtige Rolle bei der Interaktion, also dem Rollen und der Adhäsion, von Neutrophilen mit dem Endothel hat¹¹.

1.1.1.2.3. Lysosomen

Die dritten Speichergranula sind die Lysosomen. Jeder humane Thrombozyt enthält 0-2 Lysosomen. In den Lysosomen befinden sich verschiedene Hydrolasen und Proteasen, wie Elastase und Kollagenase, sowie verschiedene andere Proteine, welche nach einer Aktivierung der Thrombozyten in den extrazellulären Raum abgegeben werden².

1.1.1.2.4. Das intrazelluläre Membransystem

Das intrazelluläre Membransystem kann in zwei Systeme unterschieden werden, das offene kanalikuläre System („open canalicular system“, OCS) und das dichte tubuläre System („dense tubular system“). Das OCS ist ein Teil der Thrombozyten Oberflächenmembran und

besitzt eine Struktur aus verzweigten Kanälen, die dem Thrombozyt als Membran während der Oberflächenvergrößerung bei der Formveränderung zur Verfügung stehen. Daneben dient das OCS auch dem Transport von Proteinen aus den α -Granula zur Zellmembran, wie bei der Thrombozytenaktivierung oder der Einschleusung von Proteinen, wie Fibrinogen, in die α -Granula^{2, 5, 12}. Das andere intrazelluläre Membransystem ist das Dichte tubuläre System, was ein Überbleibsel des endoplasmatischen Retikulums der Megakaryozyten ist. Wie auch das OCS besteht es aus verzweigten Kanälen, die sich innerhalb des Zytoplasmas befinden².

1.1.1.3. Die Adhäsion von Thrombozyten

Die Hauptaufgabe der Thrombozyten ist die Hämostase, ein Mechanismus, mit dem ein Blutverlust, mittels der Koagulation von Thrombozyten verhindert wird. Durch Verletzungen am Endothel wird die endotheliale Matrix freigelegt, dadurch kommen die sich im Blut befindenden Thrombozyten mit der Matrix in Kontakt und beginnen zu adhären. Der Ursache für die Adhäsion ist, dass die Matrix verschiedene Makromoleküle enthält, darunter Kollagen und der von Willebrand Faktor (vWF). Durch diesen Kontakt werden die Thrombozyten aktiviert. Der Prozess, bei dem die Thrombozyten an die extrazelluläre Matrix binden, ist ein kontrollierter Prozess, der in verschiedenen Stufen abläuft. I, das Rollen der Thrombozyten; II, das Anheften der Thrombozyten III, die Ausbreitung der Thrombozyten und IV die stabile Adhäsion der Thrombozyten durch Aggregation. Im Laufe dieses Prozesses werden die Thrombozyten aktiviert, verändern ihre Form und weitere Thrombozyten interagieren mit den bereits adhärenierten Thrombozyten um einen Thrombus zu bilden, und dadurch die Blutung zu stoppen. Bei der endothelialen Matrix-Thrombozyten Interaktion sind der vWF und das Glykoprotein (GP) Ib von Bedeutung^{13, 14}. In dem Prozess der Bindung kommt es zur Interaktion zwischen den Thrombozytenrezeptoren und Proteinen der extrazellulären Matrix, wie Kollagen. Für eine stabile Adhäsion der Thrombozyten ist die Aktivierung essenziell. Durch die Aktivierung kommt es zur Konformationsveränderung, zur Aktivierung, von $\alpha_{IIb}\beta_3$, was zur stabilen Interaktion der Thrombozyten führt und wichtig ist für die Bindung von Fibrinogen. Durch die Aktivierung kommt es auch zur Formänderung (englisch: „shape change“) der Thrombozyten^{6, 15}. Die Veränderung des Aussehens während der Adhäsion wurde schon 1882 beschrieben. Damals als Veränderung von der runden Form zu einer unregelmäßig geformten Struktur, die von der Seite betrachtet eine Verdickung in der Mitte besitzt¹. Die Formveränderung der Thrombozyten kommt durch die Neugruppierung der Aktinfilamente, die sich parallel zueinander ausrichten¹⁵. Dadurch kommt es zuerst zur Bildung von Filopodien, also feinen Ausläufern der Thrombozyten. Im weiteren Verlauf wird der Thrombozyt flacher und es bilden sich die Lamellopodien, durch deren Bildung sich die Thrombozytenoberfläche vergrößert. Im letzten Schritt wird der Thrombozyt flach und rund, damit ist der Prozess der Formveränderung abgeschlossen¹⁶.

Durch die Sekretion der sich in den Granula befindlichen Substanzen werden verschiedene Funktionen der Thrombozyten induziert, darunter die Adhäsion, Aktivierung, Aggregation und Chemotaxis. Durch die aktivierten und adhärenierten Thrombozyten können Monozyten mit

den Thrombozyten interagieren und Monozyten-Thrombozyten-Aggregate (MTA) bilden¹⁷ (beschreiben in Abschnitt 1.1.3).

Neben ihrer Funktion in der Hämostase sind Thrombozyten auch an Prozessen der Immunabwehr beteiligt. Thrombozyten sind in der Lage Leukozyten zu rekrutieren und besitzen Immunrezeptoren, darunter Fc-Rezeptoren, auf ihrer Zelloberfläche. Durch diese Rezeptoren agieren sie als ein Teil der Immunabwehr, auch können die Thrombozyten mit Bakterien, Viren und Parasiten interagieren und diese phagozytieren. Dadurch werden die Thrombozyten ebenfalls aktiviert und Zytokine, wie Interleukin (IL)-1, sekretiert¹⁸.

1.1.1.4. Thrombozyten als Inflammationsmediatoren

Aktiviert Thrombozyten sind in der Lage pro-inflammatorische Substanzen, welche sie in ihren α -Granula und δ -Granula gespeichert haben zu sekretieren. Zu diesen Substanzen gehören verschiedenen Zytokine und Chemokine. Dies sind unter anderem CCL5 (C-C-Motif Chemokin-Ligand 5; RANTES), IL-1 β , Thrombozyten-Faktor (englisch: platelet factor)-4, SDF1 α und „Transforming Growth Factor“ (TGF)- β ¹⁹⁻²¹. Aber auch Serotonin und ADP können von Thrombozyten nach Aktivierung freigesetzt werden^{10, 11}. Jede dieser Substanzen hat einen anderen Einfluss auf die zirkulierenden Blutzellen aber auch auf das Endothelium und ist somit bei verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt. So wird durch die Freisetzung zum einen die Adhäsion von Monozyten und Neutrophilen an das Endothelium gefördert¹⁹⁻²¹. Zum anderen können die Thrombozyten mit den Monozyten zu Monozyten-Thrombozyten-Aggregaten interagieren, im Detail beschrieben in Absatz 1.1.3. Auch können die Thrombozyten, durch direkte Interaktion oder durch die Freisetzung von z. B. CCL5, die Sekretion von MCP-1 (CCL2) durch Monozyten fördern²². Des Weiteren werden verschiedene pathologische Funktionen beeinflusst, darunter die Proliferation und Differenzierung von Zellen. Die von Thrombozyten sekretierten Proteine haben darüber hinaus Einfluss auf die Angiogenese und Thrombose. Aber auch die Entstehung von Fibrose im Gewebe kann induziert werden¹⁹⁻²¹. Außerdem kommt es durch die Matrix Metalloproteinase (MMP) Aktivität, vor allem von MMP-2, auf der Thrombozytenoberfläche zur Degranulation der Kollagenmatrix²³.

Darüber hinaus konnten Studien an Patienten zeigen, dass sich sowohl die Thrombozytenaktivierung wie auch die Thrombozytenaggregation mit zunehmendem Alter verändern. Eine Ursache dafür ist, dass sich die Anzahl der Oberflächenrezeptoren verändert²⁴. Es konnte gezeigt werden, dass Personen es eine negative Korrelation zwischen der Anzahl der Prostacyclin Rezeptoren auf der Oberfläche der Thrombozyten und dem Alter der Probanden gibt. Dies kann ein Indiz dafür sein, dass die Thrombozyten von älteren Personen leichter aggregieren und damit auch leichter Thrombosen entstehen könnten²⁵.

Mikropartikel (MP) sind kleine Partikel aus der Plasmamembran von verschiedenen Zellen, hauptsächlich von Thrombozyten, aber auch von Endothelzellen sowie Leukozyten. MP spielen eine Rolle bei Entzündungen, der Angiogenese, Apoptose und endothelialen

Funktionen. Vor allem die von Thrombozyten entstandenen MP sind pro-inflammatorisch und gerinnungsfördernd, da sie zum einen die Zytokinfreisetzung und Apoptose von Endothelzellen fördern und zum anderen die Endothelzellen aktivieren können²⁰. Darüber hinaus konnte in Patientenstudien nachgewiesen werden, dass die Anzahl der Thrombozyten entstandenen MP bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen erhöht ist²⁶.

1.1.2. Monozyten

Monozyten gehören zu den mononuklearen Zellen und sind vor allem im Blut, Knochenmark und der Milz zu finden²⁷. Sie machen zwischen 5 und 10 % der sich im Blutkreislauf befindenden Leukozyten aus²⁸. Darüber hinaus sind Monozyten in der Lage zu dendritischen Zellen (DC, englisch „denritic cells“) und Makrophagen, im Gewebe, zu differenzieren. Monozyten können in verschiedene Untergruppen unterschieden werden, Ly-6C^{high}, welche CCL2 exprimieren, und Ly-6C^{low}, welche kein CCL2 exprimieren. Darüber hinaus können die Monozyten anhand ihrer CD14 und CD16 Expression unterschieden werden, dies sind drei Untergruppen: CD14⁺⁺CD16⁻ (klassische Monozyten), CD14⁺⁺CD16⁺ (intermediäre Monozyten) und CD14⁻CD16⁺⁺ (nicht-klassische Monozyten), wobei nur die CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten CCL2 exprimieren^{28, 29}, wodurch davon auszugehen ist, dass es sich bei den Ly-6C^{high}CCL2⁺ Zellen und den CD14⁺⁺CD16⁻ um dieselbe Population handelt, nur unterschieden im murinen und humanen System³⁰. Die Ly-6C^{high} Monozyten sind kurzlebig und zirkulieren durch das Gewebe, darüber hinaus können die zu Ly-6C^{low} Monozyten werden, sowie sich in entzündeten Regionen anhäufen³¹. Darüber hinaus sind Monozyten antigenpräsentierende Zellen³². Damit leisten Monozyten, Makrophagen und DC einen wichtigen Beitrag für die Gesundheit und das Immunsystem³¹.

1.1.2.1. Die Entwicklung von Monozyten

Monozyten entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC, englisch „hematopoietic stem cells“) im Knochenmark und in der Milz. Die ersten Vorläuferzellen der HSC sind die gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen, welche CD34 auf ihrer Oberfläche exprimieren, also CD34⁺ Zellen. Aus diesen Vorläuferzellen entwickeln sich dann sowohl die Granulozyten-/Makrophagen-Vorläuferzellen sowie die Makrophagen-/DC-Vorläuferzellen. Aus diesen Vorläuferzellen entwickeln sich dann letztendlich die Monozyten und DCs³³.

1.1.2.2. Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen

Monozyten können unter entzündungsbedingten Gegebenheiten ins Gewebe infiltrieren und dort zu Makrophagen differenzieren. Dennoch gibt es neben den aus Monozyten entstandenen Makrophagen auch die ständigen Makrophagen, welche unabhängig von den HSC entstehen. Zu diesen ständigen Makrophagen gehören die Mikroglia im Gehirn sowie die Langerhans

Zellen. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass sich residente Makrophagen in den verschiedenen Geweben befinden, die sich im Erwachsenenalter unabhängig von den zirkulierenden Monozyten entwickeln³². Makrophagen können in M1 und M2 Makrophagen unterschieden werden. Die M1 Makrophagen sind die inflammatorischen Makrophagen, welche sich durch die Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) oder Granulozyt/Makrophage Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF; englisch: granulocyte macrophage colony-stimulating factor) entwickeln. Dagegen entwickeln sich die M2 Makrophagen durch IL-4 und IL-13 und haben eine mehr regulatorische Funktion. Allerdings ist nicht klar welcher Makrophagentyp sich aus welcher Monozytensubpopulation entwickelt³¹.

1.1.2.3. Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen in der Atherosklerose

Die Endothelzellen in den von Atherosklerose betroffenen Gefäßwänden sekretieren verschiedene Substanzen, die in der Lage sind Monozyten anzulocken und eine Interaktion zu initiieren (Abbildung 1-1), dies führt zur Infiltration und Anhäufung von Monozyten im atherosklerotischen Plaque^{30, 32}. Vor allem die Chemokine CCL5 und CXC-Motif Ligand (CXCL)-1 sind an der Infiltration von Monozyten in die Plaques beteiligt. Die Monozyten häufen sich dort an, wo die Endothelfunktion beeinträchtigt ist und infiltrieren in die Gefäßwand, wo sie zu Makrophagen differenzieren³⁰. Dabei sind es vor allem die Ly-6C^{high}, bei der Maus, bzw. die CD14⁺⁺CD16⁻ und CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten beim Menschen, die im atherosklerotischen Plaque zu finden sind. Während der Atherosklerose infiltrieren Monozyten in die Gefäßwand und differenzieren in der Intima zu Makrophagen. Durch die Aufnahme von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL; englisch: Low Density Lipoproteins), differenzieren die Makrophagen zu Schaumzellen, welche einen großen Teil des atherosklerotischen Plaques ausmachen, sowie zu Komplikationen führen können^{31, 32}. Allerdings sind es vor allen die CD14 positiven Zellen welche das modifizierte LDL, also das oxidierte oder acetylierte LDL, aufnehmen³⁴. Darüber hinaus werden von den Zellen pro-inflammatorische Substanzen freigesetzt, welche die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen initiiert und dadurch die Entwicklung des Plaques, sowie dessen Ruptur begünstigen³¹. Aus Monozyten entstandene Makrophagen sind antigenpräsentierende Zellen, welche verschiedene Substanzen sekretieren können, darunter Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, sowie MMPs. Die Infiltration und das Überleben der Monozyten/Makrophagen in den Plaques ist abhängig von verschiedenen Substanzen, wie GM-CSF. Dennoch werden von den Plaques auch Substanzen, wie Interferon (INF)- γ freigesetzt, welche dazu beitragen, dass die Makrophagen in die Apoptose, den kontrollierten Zelltod, gehen. Dies führt dazu, dass es zur Entstehung eines nekrotischen Kerns innerhalb des atherosklerotischen Plaques kommt³⁵.

1.1.2.4. Monozyten im Myokardinfarkt

Auch beim Myokardinfarkt spielen Monozyten eine Rolle. Nach einem Myokardinfarkt kommt es zur Infiltration von Monozyten in die Infarktzone. Dabei kommt es in der inflammatorischen Phase nach dem Myokardinfarkt zur Anhäufung von $CD14^{++}CD16^{-}$ Zellen im Bereich der Infarkttrandzone³⁶, mit einem Peak nach 3 Tagen³⁷. In der späteren Proliferationsphase sind sowohl $CD14^{++}CD16^{-}$ wie auch $CD14^{++}CD16^{+}$ Zellen im eigentlichen Infarktbereich zu finden³⁶. Bei der Verteilung der Monozytenpopulationen zeigt sich, dass Patienten mit einem hohen Basislevel an $CD14^{+}CD16^{-}$ Monozyten eine beeinträchtigte linksventrikuläre Auswurf Funktion haben und eine größere Infarktfläche, dies zeigte sich auch noch in Nachuntersuchungen nach 4 Monaten, was darauf hindeutet, dass eine hohe $CD14^{++}CD16^{-}$ Monozytenpopulation mit einer gestörten Wiederherstellung der Herzfunktion nach einem Myokardinfarkt zusammenhängt³⁸.

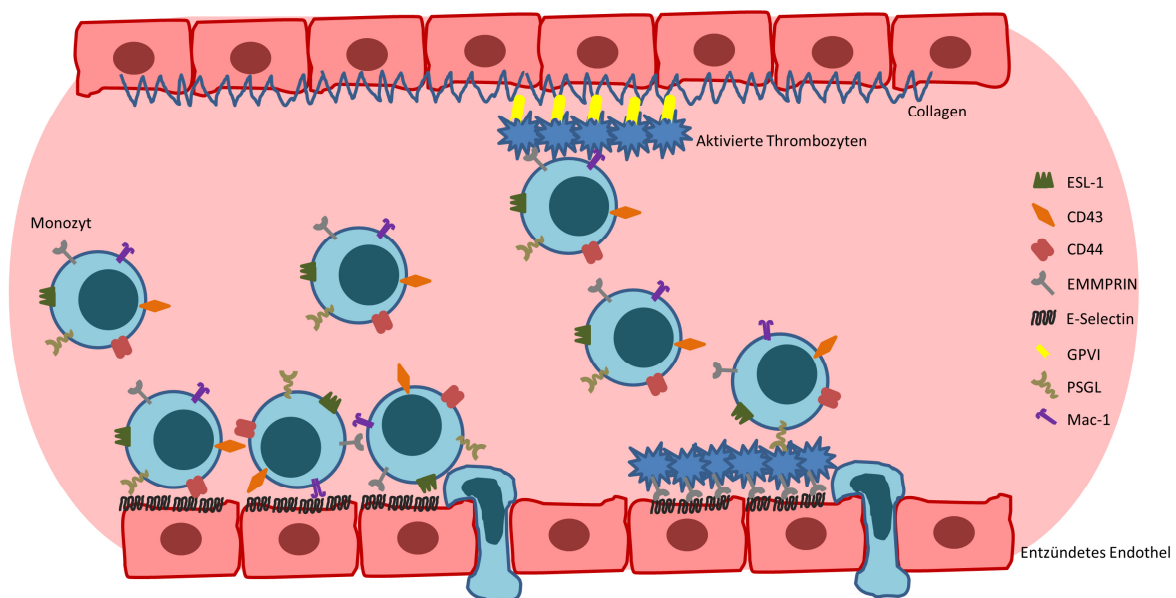


Abbildung 1-1 Die verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten von Monozyten, Thrombozyten und Endothelzellen. Monozyten, Thrombozyten und Endothelzellen können über verschiedene Rezeptoren miteinander zu interagieren. (modifiziert nach von Ungern-Sternberg et al.)³⁹

1.1.3. Monozyten-Thrombozyten-Aggregate

An der Bildung von Monozyten-Thrombozyten-Aggregation (MTA) sind nur aktivierten Thrombozyten beteiligt⁶. Dabei kommt es zur Interaktion von den aktivierten Thrombozyten mit Monozyten. An der Formation sind verschiedene Rezeptoren sowohl auf den Thrombozyten als auch auf den Monozyten beteiligt (Abbildung 1-2). Für die Interaktion sind vor allem P-Selektin auf Thrombozyten und der Gegenrezeptor auf Monozyten, der Rezeptor P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) verantwortlich. Darüber hinaus kann die Interaktion von Monozyten und Thrombozyten auch durch andere Rezeptorinteraktionen

initiiert werden, dies inkludiert sowohl Rezeptoren auf Thrombozyten, wie $\alpha_{IIb}\beta_3$, wie auch den Rezeptor Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18) auf Monozyten⁴⁰⁻⁴². Darüber hinaus kann auch CD147 auf Monozyten durch seine Bindung an GPVI auf Thrombozyten zu MTAs führen^{43, 44}. Thrombozyten können neben der Interaktion mit Monozyten auch Interaktionen mit anderen Immunzellen eingehen, darunter mit Neutrophilen⁴⁵. Die Interaktion von Monozyten und Thrombozyten findet in der Blutzirkulation statt⁴⁶ und fördert die Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen und Chemokinen²². Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt haben im Vergleich zu gesunden Personen oder Patienten ohne akuten Myokardinfarkt erhöhte Level an MTAs^{47, 48}. Allerdings reicht bereits ein schwacher Stimulus, wie eine Grippeimpfung aus, um die MTA-Bildung im Blut zu fördern. Monozyten können in drei Subgruppen klassifiziert werden $CD14^{++}CD16^-$, $CD14^{++}CD16^+$ und $CD14^-CD16^{++}$. Alle Subgruppen sind in der Lage mit Thrombozyten eine Interaktion einzugehen. Dennoch kommt es durch die MTA zu einer Veränderung der Subpopulationen vom $CD14^{++}CD16^-$ zum $CD14^{++}CD16^+$ Phänotyp. Die $CD14^{++}CD16^+$ Monozyten haben eine erhöhte Expression von CD11b und CD11c auf der Oberfläche, was auf eine Aktivierung der Monozyten hindeutet. Zusätzlich adhären $CD14^{++}CD16^+$ Monozyten vermehrt auf aktivierten Endothelzellen im Vergleich zu den anderen Monozyten Subpopulationen^{29, 49}.

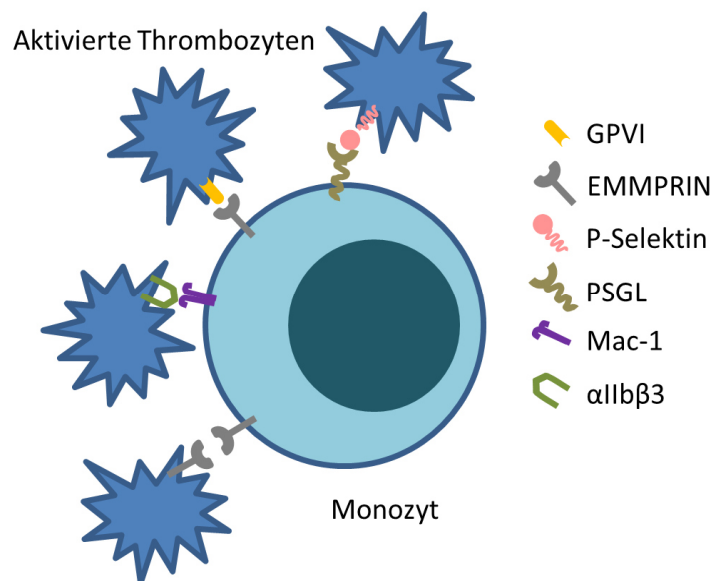


Abbildung 1-2 Möglichkeiten der Monozyten-Thrombozyten Aggregation. Monozyten und Thrombozyten können durch verschiedene Rezeptoren miteinander Aggregate bilden. (modifiziert nach von Ungern-Sternberg et al.)³⁹

1.2. Cyclophilin A

Cyclophilin A (CyPA) wurde in Jahr 1984 als intrazellulärer Bindungspartner für Cyclosporin A (CsA) entdeckt⁵⁰. Im selben Jahr wurde auch die Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase

(PPIase) zum ersten Mal beschrieben⁵¹ und im Jahr 1989 wurde von Fischer et al. beschrieben, dass es sich bei CyPA und der Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase um dasselbe Protein handelt⁵². CyPA macht 0,1-0,4% des gesamten intrazellulären Proteingehalts einer Zelle aus⁵³. Die Struktur von CyPA besteht aus drei α -Helices und acht β -Strängen (Abbildung 1-3), wovon zwei α -Helices und alle β -Stränge einen hydrophoben Kern der Struktur bilden^{54, 55}.



Abbildung 1-3 Die Struktur von CyPA bei Raumtemperatur. Das Protein CyPA besteht aus zwei α -Helices, einer $^3/_{10}$ Helix und acht β -Strängen (modifiziert nach von Ungern-Sternberg et al.)⁵⁶

Cyclophilin A (CyPA) ist ein 18 kDa großes Protein, welches allen Zellen vorkommt und im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert ist^{50, 57}. Das intrazelluläre CyPA ist an der Ca^{2+} Hämostase beteiligt, sowie an der Proteinfaltung und dem Proteintransport⁵⁸⁻⁶¹. Darüber hinaus besitzt CyPA eine PPIase Aktivität, welche die Proteinfaltung beschleunigen kann⁶². Durch seinen Einfluss auf die Ca^{2+} ist CyPA an der Hämostase und der Thrombusbildung *in vitro* und *in vivo* beteiligt⁶³. Allerdings ist CyPA auch an der Produktion von ROS beteiligt. Die ROS Produktion wird durch Nicotinamid adenin dinukleotid phosphat (NADPH) Oxidase reguliert. Dabei spielt vor allem die Untereinheit p47^{phox} eine wichtige Rolle. Durch Angiotensin II kommt es zur Translokation von p47^{phox} an die Zellmembran, diese Translokation ist CyPA abhängig, wodurch CyPA dazu beiträgt die intrazelluläre ROS Produktion in aktivierten Thrombozyten zu erhöhen^{64, 65}. Die Aktivierung des Rezeptors $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ auf Thrombozyten benötigt die Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} . Durch die Beteiligung von CyPA bei diesem Prozess ist CyPA dadurch auch bei der „inside-out“ Aktivierung von Thrombozyten, also der intrazellulären Signalkaskade, in diesem Fall der Konformationsveränderung von $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ auf Thrombozyten, beteiligt. Im Weiteren Verlauf der Thrombozyten Aktivierung ist das intrazelluläre CyPA bei der Regulierung des „outside-in“ Signalwegs beteiligt, indem es an der Reorganisation des Zytoskeletts durch eine Assoziation

mit F-Aktin beteiligt ist. Der Prozess der Thrombozyten Aktivierung ist abhängig von der PPIase Aktivität von CyPA⁶⁵.

1.2.1. Posttranslationale Modifikationen

CyPA kommt als methylierte, acetylierte, phosphorylierte und native Form in der Zelle vor⁶⁶. Vom endogenen CyPA ist beschrieben, dass es an Lysin¹²⁵ acetyliert werden kann, in den humanen Zelllinien, HeLa und Jurkat T-Zellen. Wie viel Prozent acetyliert sind, ist abhängig von der Zelllinie und beträgt zwischen einem Drittel und der Hälfte des endogenen CyPA. Das acetylierte CyPA hat einen anderen optimalen pH wie das native CyPA, wobei das native CyPA einen basischen und das acetylierte CyPA einen sauren pH bevorzugt. Durch die Acetylierung kommt es nicht zur Konformationsveränderung, dennoch hat das acetylierte CyPA eine schlechtere Bindungsaffinität zu Cyclosporin A (CsA) im Vergleich zum nativen CyPA⁶⁷. Darüber hinaus, kommt es zu einer verstärkten Acetylierung von CyPA während einer Hypoxie. Acetyliertes CyPA bindet an die Promotor ATG5 und ATG7, welche bei der Autophagozytose eine wichtige Rolle spielen. Durch die Aktivierung der Promotor kommt es zur Autophagozytose und dadurch zu einer Veränderung der Angiogenese, wodurch es zu einer Verschlechterung der pulmonalen arteriellen Hypertonie kommt⁶⁸.

Wie das native CyPA kann auch das acetylierte CyPA von Endothelzellen freigesetzt werden. Dies geschieht unter anderen bei oxidativem Stress, welcher unter anderem durch Angiotensin II induziert werden kann. Durch eine vermehrte Sekretion von CyPA in den extrazellulären Raum kommt es zu einer erhöhten Entzündungsreaktion des Endothels. Die entzündungsfördernden Eigenschaften von CyPA sind beim acetylierten CyPA besser ausgeprägt als beim nativen CyPA. Durch die Pro-inflammatorischen Eigenschaften von CyPA kommen beide Formen bei der pulmonalen arteriellen Hypertonie vor^{69, 70}.

Neben der Acetylierung kommt es auch zur Phosphorylierung von CyPA, unter anderem über die Bindung von Liganden an den CXC-Motif Rezeptor (CXCR)-4 Rezeptor. Außerdem ist CyPA bei der Internalisierung von CXCR4 nach SDF1 Bindung beteiligt und die intrazelluläre Interaktion von CyPA und CXCR4 führt darüber hinaus zur Translokation von CyPA in den Zellkern⁵⁷.

1.2.2. Extrazelluläres CyPA

CyPA kann von verschiedenen Zellen durch die Gegenwart von inflammatorischen Stimuli freigesetzt werden, darunter von Thrombozyten nach Stimulation mit Thrombin⁷¹ und von Monozyten durch erhöhte Glukosewerte⁷² oder LPS Stimulation⁷³, oder von LPS aktivierten Endothelzellen⁷⁴. Daher, dass CyPA als Response nach einem Stimulus in den extrazellulären Raum sekretiert werden kann und weitere pro-inflammatorische Zellen anlockt, kann es zu den DAMPs (Gefahr assoziierte molekulare Struktur, englisch: „Danger Associated

Molecular Pattern“) gezählt werden. Als DAMPs werden jene extrazellulären Substanzen bezeichnet, die von den Zellen sekretiert werden⁷⁵.

Darüber hinaus ist CyPA an der Entstehung von verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen. In CyPA^{+/+} Mäusen konnte, im Karotisligatur Modell, gezeigt werden, dass es zu einer erhöhten CyPA Expression kommt, wenn der Blutfluss zum Erliegen kommt. Darüber hinaus ist CyPA an der Expression von VCAM (Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül, englisch: „vascular cell adhesion molecule“)-1 beteiligt und auch an der Infiltration von Leukozyten in die Intima und medialen Bereich eines verletzten Gefäßes, nach 14 Tagen. Neben der Infiltration von Leukozyten fördert CyPA auch die Migration von glatten Muskelzellen, *in vitro*. Diese Daten zeigen, dass CyPA am vaskulären Umbau der Gefäßwand beteiligt ist⁷⁶. Das CyPA beim Gefäßumbau beteiligt ist, wird auch durch die Tatsache deutlich, dass Apolipoprotein (Apo)E^{-/-}CyPA^{-/-} Mäuse keine abdominalen Aorten Aneurysmen (AAA), nach einer Angiotensin II Behandlung, entwickeln, im Vergleich zu ApoE^{-/-}CyPA^{+/+}. Darüber hinaus kommt es bei den ApoE^{-/-}CyPA^{-/-} nicht zu einer Elastindegredierung des Gefäßes, vermutlich durch eine reduzierte MMP2 Aktivität in den ApoE^{-/-}CyPA^{-/-} Mäusen. An der Entstehung von AAA ist vor allem das endotheliale CyPA beteiligt⁷⁷.

CyPA ist ebenfalls für die Angiotensin II-induzierten ROS Produktion durch glatte Muskelzellen verantwortlich und spielt ebenfalls eine Rolle in der ROS Produktion in Endothelzellen^{77, 78}. Durch die Angiotensin II-induzierte ROS Produktion kommt es zu einer kardialen Hypertrophie, an welcher wie auch schon bei der Entwicklung der AAA vor allem das endotheliale CyPA beteiligt ist⁷⁹. Allerdings ist nicht nur das intrazelluläre CyPA an der ROS Produktion beteiligt, sondern auch das extrazelluläre CyPA. ROS sind auch an der Entstehung von Ischämie- und Reperfusionsschäden beteiligt. Durch eine Blockierung von CD147 verringert sich der oxidative Stress nach einem Myokardinfarkt *in vivo* im Mausmodell. Was darauf hindeutet, dass das extrazelluläre CyPA durch die Interaktion mit CD147 ebenfalls die ROS Produktion fördern kann⁸⁰.

Da diese Versuche teilweise einen Vergleich von CyPA^{+/+} mit CyPA^{-/-} darstellen, bzw. keine CD147 blockierenden Antikörper verwendet wurden, ist es schwer zu schlussfolgern welche von diesen Effekten durch die Freisetzung, somit von extrazellulären CyPA abhängig sind und das intrazelluläre CyPA nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Die Interaktion von CyPA mit CD147 wird im Abschnitt 1.3.3 beschrieben und die Interaktion von CD147 und CyPA bei kardiovaskulären Erkrankungen und im Abschnitt 1.3.4.

1.3. Das Immunglobulin CD147

Das humane CD147 ist lokalisiert auf dem Chromosom 19 p13.3 und besitzt 10 Exonen⁸¹. Von CD147 sind vier verschiedene Isoformen bekannt (Isoformen -1, -2, -3, und -4) Die am

meisten vorkommende Isoform ist die Isoform basigin-2, welche auch als CD147 bekannt ist. Die Isoform Basigin-1 ist um eine extrazelluläre Domäne länger als die Isoform basigin-2 und kommt in der Retina vor und die Isoform basigin-3 und basigin-4 besitzt nur eine extrazelluläre Domäne^{82, 83}.

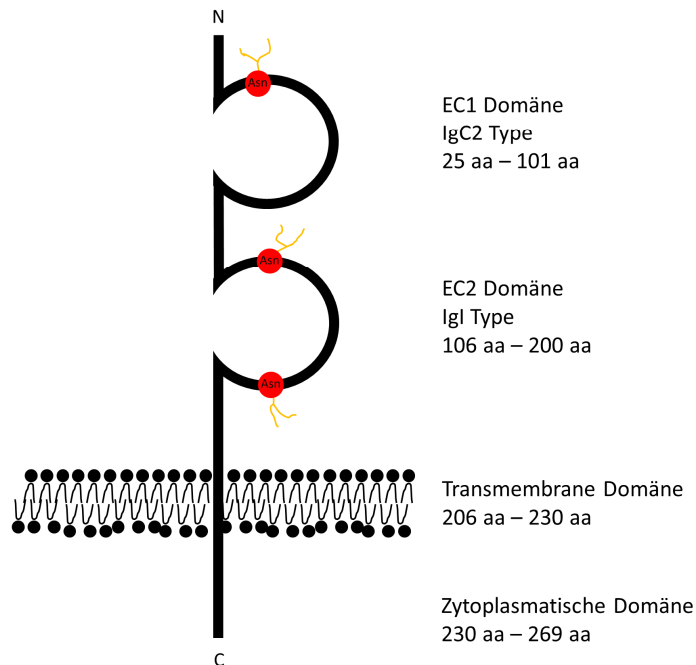


Abbildung 1-4 Schematische Darstellung des Rezeptors CD147. Der Rezeptor CD147 besteht aus drei Teilen, einem intrazellulären Teil, einem transmembranen Teil und extrazellulärem Teil. Der extrazelluläre Teil ist aus zwei Domänen aufgebaut, einer IgC2-Typ und einer Igl-Typ Domäne.

CD147 gehört zur Familie der Immunglobuline⁸⁴ und wurde in Jahr 1982 von C. Biswas auf Tumorzellen entdeckt und dementsprechend „Tumor Cell-derived Collagenase Stimulating Factor“ (TCSF) genannt. Der Grund für diesen Namen war, dass damals davon ausgegangen wurde, dass durch die Interaktion von Tumorzellen mit Fibroblasten es zu einer erhöhten Collagenase Produktion von Fibroblasten kommt⁸⁵. In den darauf folgenden Jahren wurde CD147 auf verschiedenen Zelltypen und in verschiedenen Spezies nachgewiesen, wodurch es zu unterschiedlichen Namen kam, basigin⁸⁴ und gp42⁸⁶ bei Mäusen, ox-47⁸⁷ und CE9⁸⁸ bei Ratten, HT7⁸⁹ und Neurothelin⁹⁰ in Hühnern und M6⁹¹ und TCSF⁹² beim Menschen. Im Jahr 1995 wurde TCSF in EMMPRIN („Extracellular Matrix MetalloProteinase Inducer“) umbenannt⁹³.

Das humane CD147 besteht aus einer intrazellulären, einer transmembranen und zwei extrazellulären Domänen und ist aus 269 Aminosäuren aufgebaut. Von den 269 Aminosäuren entfallen 39 auf die zytoplasmatische Domäne, 24 Aminosäuren befinden sich in der transmembranen Domäne und 185 Aminosäuren bilden die zwei extrazellulären Domänen⁹³.

Der extrazelluläre Teil besteht aus zwei Domänen, einer IgC2-Typ Domäne beim N-terminalen Ende und einer IgI-Typ Domäne am C-terminalen Ende der extrazellulären Domäne⁹⁴⁻⁹⁶. Der Rezeptor CD147 hat in der nicht glykosilierten Form eine Größe von 27 kDa⁹⁷. Allerdings besitzt CD147 drei Glykosilierungsstellen Asn⁴⁴, Asn¹⁵² und Asn¹⁸⁶.⁸⁴ Dies führt dazu, dass CD147 in zwei verschiedenen Formen vorkommen kann, einer gering glykosilierten Form von ca. 32 kDa und einer hohen glykosilierten Form, welche zwischen 45-65 kDa groß ist⁹⁷.

Die Homologie zwischen dem humanen und dem murinen CD147 beträgt bei der extrazellulären Domäne 51 %, bei der transmembranen Domäne 96 % und bei der intrazellulären Domäne 70 %⁹⁸.

1.3.1. Bindungspartner von CD147

CD147 kann mit verschiedenen Rezeptoren, Integrinen, Adhäsionsproteinen und Liganden eine Interaktion eingehen. Zu den Liganden gehören neben CyPA⁹⁹ auch CyPB¹⁰⁰ und S100A9¹⁰¹. Andere Interaktionspartner sind GPVI⁴³, CD98¹⁰², CD44¹⁰³, CD43¹⁰⁴, E-Selektin¹⁰⁵, CyP60¹⁰⁶, Apolipoprotein D¹⁰⁷, Caveolin-1¹⁰⁸, Annexin-2¹⁰⁹ und NOD2¹¹⁰ sowie die Integrine $\alpha^3\beta_1$ und $\alpha^6\beta_1$ ¹¹¹. Für die „Monocarboxylate Transporter“ (MCT) agiert CD147 als ein Chaperon Protein. Dabei ist CD147 für die korrekte Ausrichtung von MCT1 und MCT4 auf der Zellmembran verantwortlich¹¹². Außerdem kann CD147 eine homophile Interaktion mit anderen CD147 über die IgC2 Domäne eingehen, in der cis-Form auf derselben Zellmembran oder in der Trans-Form mit CD147 von anderen Zellen^{83, 113, 114}. Die homophile Interaktion spielt eine Rolle bei der MMP-2 Produktion, nicht aber bei der MMP-9 Produktion. Die CD147-induzierte MMP Produktion ist abhängig vom Glykosilierungsstatus von CD147¹¹⁴.

1.3.2. Vorkommen und Expression von CD147

Intrazellulär gibt es eine Interaktion zwischen CyP60 und CD147 über Prolin²¹¹ auf CD147. Die Bindung von CyP60 mit CD147 ist wichtig für die Translokalisierung von CD147 vom Golgi-Apparat zur Zellmembran¹⁰⁶. CD147 kann durch zwei verschiedene Möglichkeiten in den extrazellulären Raum kommen, durch Abspaltung von der Zellmembran oder über die Freisetzung durch Mikrovesikeln. Die Freisetzung von CD147 erfolgt via Mikrovesikeln, nach der Aktivierung von Zellen und ist zeit- und dosisabhängig. Freigesetztes CD147 ist in der Lage bei Fibroblasten die Produktion von MMP-1 zu initiieren¹¹⁵. Allerdings ist nur das glykosilierte CD147 in der Lage MMP-1 und MMP-2 Aktivität zu induzieren. Dagegen ist das unglykosylierte CD147 nicht in der Lage MMP-1 oder MMP-2 Aktivität zu induzieren, im Gegenteil es antagonisiert die Effekte von glykosyliertem CD147 auf die MMP-1 Aktivierung¹¹⁴.

Bei verschiedenen Erkrankungen kommt es zu einer erhöhten Expression von CD147. Dazu gehört die rheumatoide Arthritis, dabei stimuliert CD147 die Produktion von MMP-1 und MMP-3, wodurch es zum Anstieg in der Gelenksflüssigkeit kommt. Dies kann zu einer Verschlechterung der rheumatoiden Arthritis beitragen¹¹⁶. CD147 wird, vor allem, von Krebszellen vermehrt exprimiert¹¹⁷. Dabei ist z.B. die Expression von CD147 in epithelialen Tumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe erhöht. Zu den Krebsarten wo CD147 erhöht ist gehören Plattenepithelkarzinome, Pankreas-, Nieren-, Leberkarzinoms sowie bei einigen Brustkrebsarten. Auch bei nicht epithelialen Tumoren, wie dem Glioblastom, kommt es zu einer vermehrten Expression von CD147¹¹⁸. Durch die erhöhte Expression von CD147 kommt es auch zu einer erhöhten Expression von MMPs durch Fibroblasten und Krebszellen⁹³. Die homophile Interaktion von CD147 spielt eine Rolle in der MMP-2 Produktion und der Metastasierung von Krebs¹¹⁴. Auch bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist CD147 beteiligt. Bei der Atherosklerose kommt es zu einer Anhäufung von CD147, in Bereichen in denen sich viele Makrophagen befinden. Dadurch spielt CD147 eine Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose haben¹¹⁹. Aber auch bei einem akuten Myokardinfarkt kommt es zu einer vermehrten Expression von CD147 auf der Zellmembran von Monozyten im Vergleich zur stabilen Angina Pectoris¹²⁰. Bei der Herzinsuffizienz kommt es ebenfalls zur erhöhten Expression von CD147, sowie einer erhöhten MMP-Aktivität¹²¹.

1.3.3. Die Interaktion von CD147 und CyPA bei kardiovaskulären Erkrankungen

Das extrazelluläre CyPA ist ein spezifischer Ligand des Rezeptors CD147, wobei die Interaktion das erste Mal im Jahr 2002 beschrieben wurde⁹⁹. Die Bindung zwischen CyPA und CD147 ist unabhängig von der PPIase Aktivität von CyPA¹²². Thrombozyten exprimieren CD147 auf ihrer Zelloberfläche innerhalb weniger Minuten nach deren Aktivierung *in vitro*. Darüber hinaus exprimieren Monozyten CD147 auf ihrer Oberfläche während eines akuten Myokardinfarkts^{123, 124}. Durch die Bindung von CyPA an CD147 kommt es bei Thrombozyten zur Degranulierung der α -Granula durch die Aktivierung des PI3 Kinase/Akt Signalwegs. Außerdem kommt es durch die Thrombozytenaktivierung zur Freisetzung von entzündungsfördernden Chemokinen, wie SDF1 α , in den extrazellulären Raum²¹. Aktivierte Thrombozyten sind in der Lage mit den entzündeten Endothelzellen zu interagieren. Anschließend können noch Leukozyten an die Thrombozyten binden, wodurch eine Endothelzellen-Thrombozyten-Monozyten Interaktion entsteht¹²⁵. Die Bindung von CyPA und CD147 induziert nicht nur die Interaktion von Monozyten, Thrombozyten und Endothelzellen, sondern führt auch zur Chemotaxis von Neutrophilen, Monozyten, Eosinophilen und T-Zellen^{73, 126, 127}.

Murine Daten zeigen, dass es zu einer vermehrten Expression von CyPA und CD147 im atherosklerotischen Plaque von Mäusen mit einer hohen Fett Ernährung kommt¹²⁸. Das CyPA eine wichtige Rolle in der Entstehung von Atherosklerose spielt, konnte mit ApoE CyPA Doppelknockout Tieren gezeigt werden, da diese Tiere keine Atherosklerose entwickelten⁷⁸.

In humanen Plaques kommt es zu einer vermehrten Expression von CD147 in Arealen mit einer hohen Dichte an Makrophagen¹¹⁹, was darauf hindeutet, dass es durch die Anwesenheit von Makrophagen zur Sekretion von CD147 kommt^{34, 129}. Durch die Fähigkeit von CyPA die Infiltration von Monozyten/Makrophagen zu fördern kommt es durch die Sekretion von CyPA zu einer beschleunigten Infiltration von Monozyten in den atherosklerotischen Plaque^{99, 130}. Durch die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen und Schaumzellen wird darüber hinaus vermehrt CD147 und CyPA exprimiert, wodurch die erhöhten CyPA und CD147 Levels im Plaque zu erklären sind^{119, 128}.

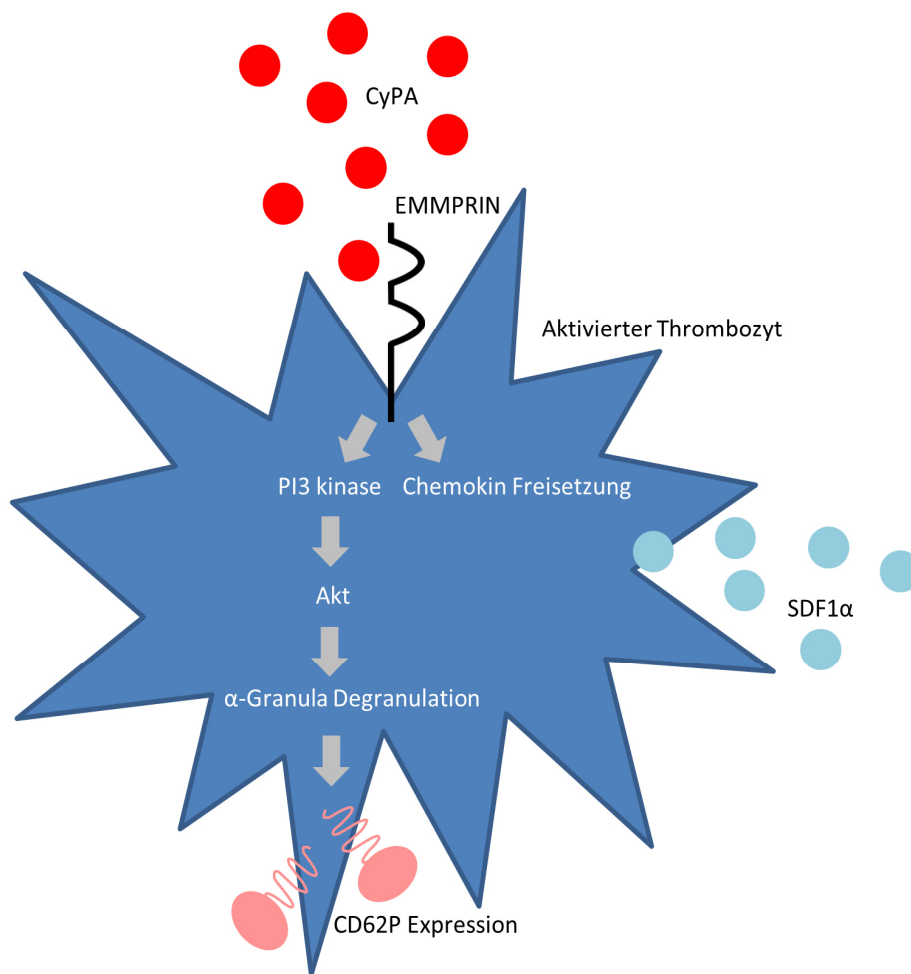


Abbildung 1-5 CyPA-induzierte Aktivierung von Thrombozyten. Extrazelluläres CyPA bindet an CD147 und aktiviert die Thrombozyten über den PI3 Kinase/Akt Signalweg, dies führt zur Degranulation der α -Granula und zur Expression von CD62P. Darüber hinaus kommt es zur Freisetzung des Chemokins SDF1 α . (modifiziert nach von Ungern-Sternberg et al.)³⁹

Die Interaktion von CyPA und CD147 fördert die Migration und Infiltration von Neutrophilen, Monozyten, Eosinophilen und T-Zellen^{73, 126, 127}. Dass diese Effekte CD147 induziert sind, wird deutlich, da durch eine Störung der CyPA-CD147 Interaktion die CyPA-

induzierte Migration, *in vitro*, aufgehoben werden kann. Außerdem kommt es zu einer Reduktion der adhärennten Zellen auf aktiviertem Endothel, wenn CyPA nicht an CD147 binden kann¹³¹.

Die Interaktion von CyPA und CD147 führt außerdem zum Anstieg der MMP-9 Aktivität¹²⁸, durch die Aktivierung von NF- κ B¹³². Dabei ist die Hochregulierung der MMP-9 Expression in M-CSF ausdifferenzierten Makrophagen höher als in Monozyten. Dies könnte auf die erhöhte Expression von CyPA und CD147 zurück zu führen sein¹³³. Die MMP Aktivität im atherosklerotischen Plaque wird vor allem durch Monozyten/Makrophagen und glatte Muskelzellen hervorgerufen. Darüber hinaus gibt es eine Korrelation zwischen der thrombozytären Expression von CD147 und der schwere von koronaren Herzerkrankungen bei Patienten¹³⁴. Zusätzlich zu den erhöhten CD147 Levels kommt es auch zur Erhöhung von oberflächengebunden CyPA auf Thrombozyten¹³⁵. Bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt kommt es neben der erhöhten CD147 Expression auf Thrombozyten auch zu einem Anstieg von CD147 auf Monozyten¹²⁰, darunter auf allen Monozytensubpopulationen¹²⁴. Darüber hinaus konnte bei Patienten mit einem Myokardinfarkt eine erhöhte Expression von CD147 durch Kardiomyozyten und eine erhöhte Expression von CyPA durch infiltrierte Leukozyten im Infarktareal festgestellt werden. Der Einfluss von CD147 beim Myokardinfarkt wurde auch im murinen System untersucht, dabei konnte gezeigt werden, dass es durch die Blockierung von CD147 durch einen neutralisierenden Antikörper zu einem verringerten, durch den Myokardinfarkt hervorgerufenen, Ischämie und Reperfusionsschäden kommt. Neben CD147 führt auch die Expression von CyPA zu Myokardinfarktabhängigen Schäden. CyPA^{-/-} Mäuse entwickeln dagegen keine Ischämie- und Reperfusionsschäden¹³⁶.

1.3.4. Die Interaktion von CyPA und CD147 in Entzündungs-vermittelten Erkrankungen

Neben den kardiovaskulären Erkrankungen ist die Interaktion von CyPA und CD147 auch bei der Entstehung und Progression von anderen Erkrankungen beteiligt. Durch die Bindung von CyPA an CD147 werden entzündliche Prozesse im Körper verstärkt. Dies geschieht durch die Sekretion von entzündungsfördernden Zytokinen wie TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-1 β und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)¹³². Durch diese inflammatorischen Eigenschaften ist CyPA an verschiedenen Erkrankungen beteiligt, darunter rheumatoiden Arthritis¹³² und Sepsis¹³⁷. In beiden Erkrankungen spielen auch Thrombozyten eine wichtige Rolle¹³⁸. Neben CyPA ist auch CD147 bei der rheumatischen Arthritis involviert, vor allem durch die Expression von MMPs¹³⁹. Im Sepsismodell konnte gezeigt werden, dass es durch die Blockierung von CD147 das sepsisinduzierte Organversagen der Nieren vermindert werden kann, da durch die Blockierung die Rezeptor-Ligand-Interaktion von CyPA und CD147 gestört wird¹⁴⁰.

1.4. Das Immunglobulin RAGE

Der „Receptor for advanced glycation endproducts“ (RAGE, deutsch: Rezeptor für fortgeschrittene Glykations Endprodukte) wurde im Jahr 1992 als Bindungsrezeptor für die „advanced glycation endproducts“ (AGE) identifiziert und gehört zur Familie der Immunoglobulin Superfamilie^{141, 142}. Das AGER (englisch: advanced glycation endproduct receptor) Gen liegt auf dem Chromosom 6 p21.32 und besteht aus 11 Exonen¹⁴³.

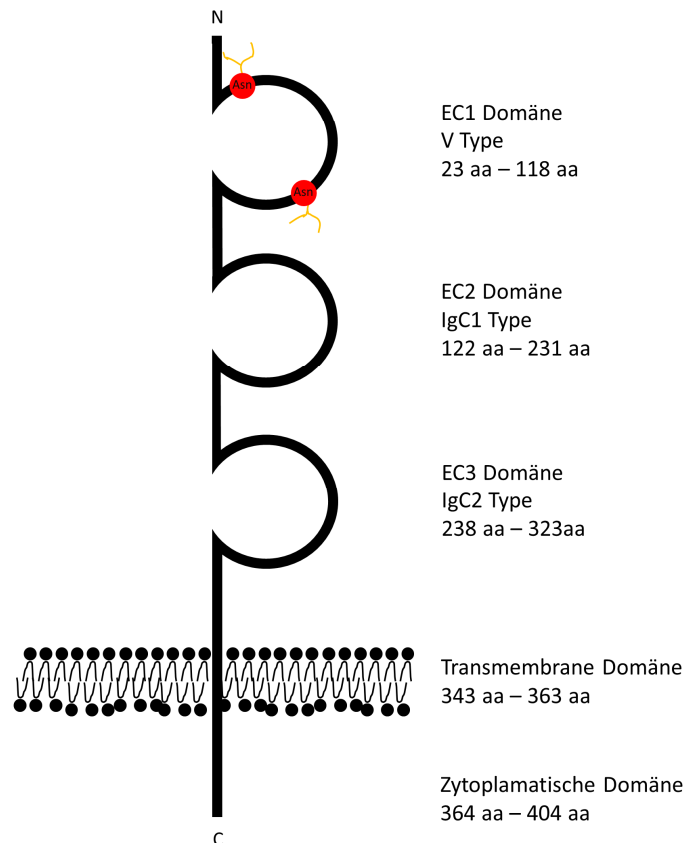


Abbildung 1-6 Schematische Darstellung von RAGE. Der Rezeptor ist aus drei Teilen zusammengesetzt. Einem extrazellulären Teil der aus drei Domänen besteht, einer IgV-Typ Domäne am N-terminalen Ende gefolgt von einer IgC1-Typ und einer IgC2-Typ Domänen. Desweiteren besitzt RAGE einen transmembranen und einen intrazellulären Teil.

Strukturell besteht RAGE aus 404 Aminosäuren aufgeteilt in drei extrazelluläre Domänen, eine transmembrane Domäne und eine zytoplasmatische Domäne¹⁴¹. Die extrazelluläre Domäne besteht aus einem Signalpeptid von 22 Aminosäuren, einer IgV-Typ (EC1) Domäne von Aminosäure Ala²³-Tyr¹¹⁸, einer IgC1-Typ (EC2) Domänen von Aminosäure Thr¹²²-Glu²³¹ und einer IgC2-Typ (EC3) Domäne von Aminosäure Val²³⁸-Pro³²³. Die transmembrane Domäne besteht aus 20 Aminosäuren und die zytoplasmatische Domäne aus 40 Aminosäuren (Abbildung 1-6)^{95, 96, 144}. RAGE besitzt zwei Glykosylierungsstellen in der extrazellulären Domäne. Die erste Glykosylierungsstelle ist an der Position Asn²⁵ und die zweite

Glykosilierungsstelle ist an Position Asn^{81, 145}. Das Molekular Gewicht des kompletten Rezeptors inklusive Glykosilierung beträgt 55 kDa¹⁴⁶, der unglykosilierte Rezeptor hat ein Molekular Gewicht von 35 kDa¹⁴¹.

Die EC1 und EC2 Domäne bilden eine gebogene Struktur mit einem Winkel von 145° zwischen den beiden Domänen¹⁴⁷. Dadurch formen die IgV-Typ und IgC1-Typ Domänen eine Einheit. Die IgC2-Typ Domäne ist eine unabhängige Einheit und kann sich dagegen frei von den IgV-Typ und IgC1-Typ Domänen drehen¹⁴⁸.

1.4.1. „Splicing“ Formen von RAGE

RAGE kann in 20 verschiedenen Splicing Formen auf cDNA Level vorkommen, darunter als „full length“ RAGE, und als „endogenous secretory“ RAGE (esRAGE)¹⁴⁹.

1.4.1.1. „Full length“ RAGE

Das full-length RAGE ist die am meisten vorkommende „splicing“ (englisch für miteinander verbinden, zusammenkleben) Variante und hat eine Größe von 55 kDa^{149, 150}. In humanem Lungengewebe wird durch die vorhandene mRNA 80 % zu dieser Variante kodiert¹⁴⁹.

1.4.1.2. „Soluble“ RAGE und „endogenous secretory“ RAGE

Das „endogenous secretory“ RAGE (esRAGE) ist eine „splicing“ Variante von RAGE und 7 % der im Lungengewebe vorkommenden mRNA kodieren das esRAGE¹⁴⁹. Dagegen entsteht das „soluble“ RAGE (sRAGE) durch das Abspalten der extrazellulären Domain, von „full length“ RAGE, durch Metalloproteinasen. Dadurch fehlt dem sRAGE die transmembrane und intrazelluläre Domäne. Dies führt dazu, dass das sRAGE eine Größe von 48 kDa. Damit entstehen sRAGE und esRAGE unabhängig voneinander¹⁵⁰.

1.4.2. Bindungspartner von RAGE

RAGE hat verschiedenen Bindungspartner, darunter welche die intrazellular binden, wie auch welche die eine Bindung über die extrazellulären Ig Domänen eingehen. Zu den intrazellulären Bindungspartnern gehört Diaphanous-1 (Dia1)¹⁵¹. Diese Bindung ist bei der Veränderung des Zytoskeletts beteiligt und somit bei der Entstehung von Lamellipodien, sowie bei der Migration von glatten Muskelzellen. Allerdings kann dieser Dia1-induzierte Effekt auch RAGE unabhängig stattfinden¹⁵². Ein anderer intrazellulärer Bindungspartner ist Erk¹⁵³. Zu den extrazellulären Bindungspartnern von RAGE gehören die AGEs, welche als erster Bindungspartner von RAGE identifiziert wurden¹⁴¹. Andere Liganden sind HMGB1¹⁵⁴, β -Amyloid¹⁵⁵, und die S100 Proteine¹⁵⁶. Neben verschiedenen Liganden kann RAGE auch

eine Interaktion mit dem β 2-Integrin von Mac-1 eingehen¹⁵⁷. Die meisten Liganden binden an der IgV- oder IgC1-Typ Domäne¹⁵⁸⁻¹⁶¹, mit Ausnahme von S100A6, welches an die IgC2-Typ Domäne bindet¹⁵⁸.

1.4.3. Vorkommen und Expression von RAGE

RAGE wird von den meisten humanen Geweben in geringen Level exprimiert, mit einer Ausnahme der Lunge. In der Lunge kommt RAGE auf den Pneumozyten des Typs I, an der basolateralen Membran, vor, allerdings nicht auf den Pneumozyten des Typs II¹⁶². Zu einer Erhöhung der RAGE Expression kommt es durch Entzündungsreaktionen und dem damit verbundenen Anstieg des C-Reaktive Protein (CRP). CRP fördert die Produktion von ROS und die Aktivierung des Erk1/2 – NF- κ B Signalweg, wodurch die Oberflächenexpression von RAGE induziert wird¹⁶³.

Zu einer erhöhten Expression von RAGE kommt es auch bei verschiedenen Erkrankungen, dazugehört die Alzheimer-Erkrankung. Dabei kommt es zu einer erhöhten Expression von RAGE, wenn AGEs an RAGE binden. Durch die Bindung von AGEs an RAGE kommt es zu einer Hyperphosphorylierung des Tau Proteins, was bereits in der frühen Phase der Alzheimer Erkrankung auftritt, wodurch die AGE-RAGE Interaktion eine wichtige Rolle in der Verschlechterung der Krankheit beiträgt¹⁶⁴. Bei der Pathogenese von inflammatorischen Erkrankungen ist die Interaktion von S100A12 an RAGE beteiligt, darunter entzündlichen Darmerkrankungen. Durch die Interaktion werden intrazelluläre Signalwege aktiviert, wodurch es zur Zellaktivierung und zur Sekretion von IL-1 β und TNF α durch die Zellen kommt¹⁵⁶. Daneben ist die Expression von RAGE bei verschiedenen Krebsarten erhöht, darunter im Gliom, sowie den Tumorgefäßen und in infiltrierten Makrophagen im Gliom,¹⁶⁵ beim Mammakarzinom¹⁶⁶, Magenkarinom¹⁶⁷, Osteosarkom¹⁶⁸. Der Zusammenhang zwischen RAGE und Krebserkrankungen ist, dass bei Krebserkrankungen das Risiko für Metastasen durch eine hohe RAGE Expression steigt und gleichzeitig die Überlebenschancen sinkt.¹⁶⁹ Bei Lungenkrebs ist es genau anders herum, dort sinkt die Expression von RAGE bei einer Krebserkrankung¹⁷⁰.

Durch die Interaktion von Liganden und RAGE kommt es auch zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und zur Erhöhung des mRNA-Levels von Hämooxygenase bei Endothelzellen und Leukozyten, da es z.B. durch die Bindung von AGEs an RAGE oxidativer Stress für die Zellen entsteht ausgelöst durch verschiedene Sauerstoffradikale¹⁷¹.

Die Bindung von AGEs an RAGE fördert die Wahrscheinlichkeit von diabetischen Komplikationen, wozu unter anderem die Nephropathie gehört¹⁷².

1.4.4. RAGE und kardiovaskuläre Erkrankungen

Die RAGE Expression spielt auch beim Fortschreiten der Atherosklerose¹⁷³ sowie bei der Entstehung von Ischämie- und Reperfusionsschäden eine Rolle. Bei einem Myokardinfarkt kommt es durch den Verschluss des Gefäßes zu einem Anstieg der AGE Expression, welche wiederum die Expression des RAGE Rezeptors fördern¹⁷⁴. Bei einem myokardialen Ereignis ist neben der Expression von RAGE auch das Plasma sRAGE Level von großer Bedeutung. Oberflächengebundenes RAGE und sRAGE buhlen um die Liganden. Je höher das sRAGE Level, desto geringer sind die Schäden, die nach einem Myokardinfarkt auftreten. Der Grund dafür ist, dass das sRAGE die AGEs im Plasma binden kann und dadurch die Bindung an das oberflächengebundenen RAGE verhindert^{173, 174}. Auch gibt es einen Zusammenhang zwischen den sRAGE Levels und dem Auftreten eines kardiovaskulären Ereignisses, je geringer das sRAGE, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit eines Myokardinfarktes oder anderen kardiovaskulären Erkrankungen^{175, 176}.

1.5. Zielsetzung

Während einer Inflammationsreaktion werden verschiedene pro-inflammatorische Substanzen freigesetzt, welche im weiteren Verlauf andere Entzündungszellen rekrutieren und damit die Entzündungsreaktion im Gewebe verstärken.

In dieser Dissertation wurde die Rezeptor-Ligand-Interaktion von dem DAMP CyPA während der Entzündungsreaktion und der Hämostase untersucht. CyPA ist intrazellulär im Zytoplasma lokalisiert und wird durch inflammatorische Stimulation der Zelle freigesetzt. Dieses extrazelluläre CyPA kann anschließend durch die Bindung an Zelloberflächenrezeptoren andere Zelle aktivieren. Daher ist die Untersuchung der spezifischen Rezeptor-Ligand Interaktion rund um CyPA von großer Bedeutung, da nur so ein grundlegendes Verständnis für die Bedeutung von CyPA, im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen, generiert werden kann.

Daraus ergaben sich dann die drei Hauptziele der Doktorarbeit:

1. Das erste Ziel war der Nachweis, ob extrazelluläres CyPA Thrombozyten aktiviert.
2. Das zweite Ziel war die Entwicklung eines spezifischen Antikörpers gegen CyPA, welcher die Bindung von extrazellulärem CyPA spezifische am Rezeptor CD147 hemmt.
3. Das dritte Ziel war die Identifizierung und Untersuchung der Interaktion von CyPA mit RAGE, einem bis jetzt noch unbekanntem Bindungspartner für extrazelluläres CyPA.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Antikörper und Lösungen

Tabelle 2-1 Rekombinante Proteine

Rekombinantes Protein	Hersteller/Firma
ADP	Probe & Go
CyPA	R&D Systems
Fibrinogen	Sigma-Aldrich
IgG ₁ -Fc	R&D Systems
INF γ	Peprtech
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma-Aldrich
RAGE-Fc	R&D Systems
Ratte IgG _{2a}	R&D Systems
TNF α	Peprtech

Tabelle 2-2 primäre Antikörper für Western Blot

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller/Firma
Cyclophilin A	Kaninchen	1:1000	abcam
	Maus	1:1000	abcam
Cyclophilin B	Kaninchen	1:1000	R&D Systems
TAKTE (Cyclophilin A Antikörper)	Siehe Tabelle 2-3	Siehe Tabelle 2-3	Helmholtz Zentrum München, Frau Kremmer

Tabelle 2-3 Primäre anti-TAKTE Antikörper für Western Blot

Antikörper	Spezies	Verdünnung
7C2	Maus	1:20
5A11	Maus	1:20

Material und Methoden

1B7	Maus	1:20
8E6	Maus	1:20
8H7	Ratte	1:20

Tabelle 2-4 Sekundäre Antikörper für Western Blot

Antikörper	Verdünnung	Hersteller/Firma
IRDye® 800CW Esel anti-Maus	1:15 000	Li-Cor Odyssey
IRDye® 800CW Esel anti-Kaninchen	1:15 000	Li-Cor Odyssey
IRDye® 680RD Esel anti-Maus	1:15 000	Li-Cor Odyssey
IRDye® 680RD Esel anti-Kaninchen	1:15 000	Li-Cor Odyssey
IRDye® 680RD Ziege anti-Ratte	1:15 000	Li-Cor Odyssey

Tabelle 2-5 FACS Antikörper

Antikörper	Farbstoff	Hersteller/Firma
CD62P	FITC	Beckman Coulter
CD3	APC	ebioscience
F4/80	APC	ebioscience
CD11b	APC	ebioscience
Fibrinogen-488	Alexa Fluor 488	Invitrogen/ThermoFisher Scientific

Tabelle 2-6 Fluoreszenzfärbung primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller/Firma
CD147 Antikörper	1:100	Santa Cruz

CyPA Antikörper	1:100	abcam
RAGE Antikörper	1:50	Santa Cruz, N-16

Tabelle 2-7 Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz

Antikörper	Farbstoff	Verdünnung	Hersteller/Firma
Esel anti-Kaninchen	Alexa Fluor 488	1:200	Cell Signaling
Esel anti-Kaninchen	Alexa Fluor 568	1:200	Cell Signaling
Esel anti-Ziege	Alexa Fluor 488	1:200	Cell Signaling
Kaninchen anti-Maus	Alexa Fluor 568	1:200	Cell Signaling

Tabelle 2-8 Neutralisierende / Blockierende Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller/Firma
CD147 Antikörper	UM8D6	Ancell
RAGE Antikörper	176902	R&D Systems
	MM0520-8D11	abcam
TLR4 Antikörper		R&D Systems
Maus IgG ₁		Southern Biotech
Ziege IgG		R&D Systems
Ratte IgG _{2a}		R&D Systems

Tabelle 2-9 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien	Hersteller/Firma
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
BSA	Appllichem
BD Lysis Solution	BD Biosciences
Biorad Proteinassay Detektionslösung	BioRad

Biotinylierter sekundär Antikörper	Dako
Bromphenolblau	Roth
β-Mercaptoethanol (Western Blot)	Sigma-Aldrich
DCF	Life Technologies
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich
Fluoreszenz Eindeckelmedium (Dako Fluorescent Mounting Medium)	Dako
Eisen(III)Chloride Lösung (FeCl ₃)	Sigma-Aldrich
FACS Lysis Solution (FACS Lyselösung)	BD Biosciences
Ficoll Paque	GE Healthcare
Formaldehydlösung (4%)	Otto Fischar GmbH
Glucose	Sigma-Aldrich
Glycin	Applichem
HCl (1N)	VWR
Hepes	Roth
Isopropanol	VWR
Kaliumchloride (KCl)	Merck
Kollagenreagens HORM	Takeda
Milchpulver	Applichem
Natriumchloride (NaCl)	Applichem
Natriumcitrat (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	Applichem
Natrium-Desoxycholat	Applichem
di-Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH (1N))	Merck

NP 40 (Ipegal)	Sigma Aldrich
PageRuler Prestained Protein Ladder (Marker für Western Blot)	Thermo Fisher Scientific
Phosphate Buffered Saline (Tabletten)	Sigma Aldrich
Poly-Lysin	Sigma-Aldrich
Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail	Cell Signaling
Proteinstandard für Western Blot	Sigma-Aldrich
Rothi-Histol Eindeckelmedium	Roth
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Roth
Streptavin-HRP Komplex	Dako
TEMED	Roth
TMB	Serva
Tripan Blau	Sigma-Aldrich
Tris (Trizima (base))	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Merck
ToPro-3 Iodine	Cell Signaling
Türkislösung	Merck
Zitronensäure	Sigma-Aldrich

Tabelle 2-10 Pufferlösungen

Pufferlösungen	Zusammensetzung
ACD-Puffer	12,5 g Na ₃ -Citrat, 6,82 g Zitronensäure, 10 g Glucose, mit 500 ml Aqua dest auffüllen, pH 4,69 mit NaOH einstellen
10x Tyrodes (Human)	1370 mM NaCl, 120 mM NaHCO ₃ , 26 mM KCl, mit Aqua dest auf 1L auffüllen

1x Tyrodes (Human)	10 ml 10x Tyrodes (Human), 90 ml Aqua dest, 0,1 % Glucose, 0,1 % BSA, pH 7,4 mit HEPES, und anschließend pH 6,5 mit HCl
20x Tyrodes (Maus)	159,5 g NaCl, 3,99 g KCl, 19,99 g NaHCO ₃ , 1,1 g Na ₂ HPO ₄ , mit Aqua dest auf 1 L auffüllen
1x Tyrodes (Maus)	5 ml 20x Tyrodes (Maus), 95 ml Aqua dest, 0,1 % Glucose, 0,1 % BSA, pH 7,4 mit HEPES, pH 6,35 mit HCl
Modifizierter Tyrodes nach Coppinger ⁷¹	130 mM NaCl, 10mM Trisodium Citrat, 9 mM NaHCO ₃ , 0,81 mM KH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris auf 1 L mit Aqua dest. auffüllen, 6 mM Glukose und 0,9 mM MgCl ₂ , pH mit HEPES auf 7,4 einstellen
RIPA Puffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1 % SDS, 0,5%iges Na-Desoxycholat, 1 % Triton X-100, mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen Für die Lyse von Zellen mit Phosphatase/Proteinase Inhibitor versetzen.
10 %-iges SDS	10 g SDS in 100 ml Aqua dest. gelöst
Ladepuffer (5x Lämmli)	6,5 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8, 2 ml 10 %iges SDS, 1 ml Glycerin, 1 Spatelspitze Bromphenolblau
1,5 M Tris-Puffer pH 8,8	45,4 g Tris base in 200 ml Aqua dest lösen, pH 8,8 mit HCl einstellen, mit Aqua dest auf 250 ml auffüllen
1 M Tris-Puffer pH 6,8	12,21 g Tris base in 70 ml Aqua dest. lösen, pH 6,8 mit HCl einstellen, mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen
10x Laufpuffer (Western Blot) Stocklösung	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, mit Aqua dest auf 1 L auffüllen
10x Blotpuffer (Western Blot) Stocklösung	20 mM Tris, 150 mM Glycin, mit Aqua dest auf 1 L auffüllen
1x Laufpuffer (Western Blot)	100 ml 10x Laufpuffer Stocklösung mit 900

	ml Aqua dest verdünnen
1x Blotpuffer (Western Blot)	50 ml 10 Blotpuffer Stocklösung mit 450 ml Aqua dest Verdünnen und anschließend mit 20 % Methanol versetzen

Tabelle 2-11 Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
Monozytenmedium (Human)	500 ml RPMI 1640, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep
Leukozytenmedium (Knochenmark Murin)	500 ml RPMI 1640, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 1 % HEPES, 1,8µl β-Mercaptoethanol
HUVEC Medium	VascuLife VEGF Endothelial Medium Complete Kit, 1 % Pen/Strep

Tabelle 2-12 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

	Hersteller/Firma
Accutase®	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Gibco
GMCSF	Miltenyi Biotec
HEPES	Sigma-Aldrich
HI FCS	Gibco,
Na-Pyruvat	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) + Ca ²⁺ + Mg ²⁺	Gibco
Penicillin /Streptavidin (Pen/Strep)	Sigma-Aldrich
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)	Gibco

1640 Medium

Trypsin

Gibco

Tabelle 2-13 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft/Firma
HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)	Cell Systems

Tabelle 2-14 Medikamente / Betäubungsmittel

Medikament/Schmerzmittel	Hersteller/Firma
Buprenorvet 1:2 Verdünnt mit NaCl	Bayer
Fentanyl	CuraMedPharma GmbH
Isofluran CP [®]	cp-pharma
Medetomidine	Pfizer GmbH
Midazolame	Ratiopharm GmbH

Tabelle 2-15 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller/Firma
1 ml Spritze	B. Braun
5 ml Spritze	B. Braun
20 ml Spritze	B. Braun
50 ml Spritze	B. Braun
1,5 ml Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf Safe-Lock Tubes TM)	Eppendorf
15 ml Reaktionsgefäß (BD Falcon TM)	BD Biosciences
50 ml Reaktionsgefäß (BD Falcon TM)	BD Biosciences

Safety-Multifly 21G	Sarstedt
CPDA-Monovetten 8,5 ml	Sarstedt
EDTA-Monovetten 1,5 ml	Sarstedt
FACS Röhrchen	Falcon
Gelkassette	Invitrogen
Immobilion-FL PVDF Transfer-membran	Merck Millipore
Kanüle i.p. Injektion (Peritonitis) 26G x ½“	BD Biosciences
Kanüle Peritoneallavage (Peritonitis) 20G x 1½“	B. Braun
Kanüle (Spülung Knochenmark) 26G x ½“	BD Biosciences
Pasteurspipette	Ratiolab
PBS Tabletten	Sigma-Aldrich
PVDF Membran	GE Healthcare
Mehrweghahn	Braun
Skalpell	Feather Safety Razor
Spritzenpumpenleitung (Injectomat Line)	Frisenius Kabi AG
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories
Whatman Papier	GE Healthcare
Zellsieb (70 µm)	Greiner Bio-One

Tabelle 2-16 Geräte und Software

Gerät/Software	Hersteller/Firma
Adobe Photoshop (CS2)	Adobe Systems Incorporate, San Jose, CA, USA
Intravitalmikroskopie (Axiovert 200)	Carl Zeiss AG
Axiovision Rel 4.8	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Biorad ELISA Plate Reader	Biorad
CO ₂ -Inkubator	SANYO, Panasonic
EndNote X8	Clarivate Analytics
FACSCalibur™ Durchflusszytometer	BD Biosciences
FlowJo	FlowJo, LLC Data Analysis Software, Ashland, OR, USA
Flusskammer (Thrombusformation)	Maastricht Instruments BV
Flusskammer (Monozyten / Leukozyten)	Provitro
GraphPad Prism 6	Graphpad Prism Software, La Jolla, CA, USA
ImageJ 1.47v	public domain
Nikon	Nikon
Odyssey® Infrarot Scanner	Li-Cor® Biosciences
SPSS Version 21	SPSS Inc.
Sterilbank Herasafe™, Type HS18	Thermo Fischer Scientific
Sysmex Hämatologie-System KX-21N	Sysmex Deutschland
Zeiss LSM5 EXCITER Confocal Laser Scanning Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Zen	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Tabelle 2-17 Sitz der Hersteller / Firma

Hersteller/Firma	Sitz
abcam	Cambridge, UK
Affymetrix eBiosciences	San Diego, CA, USA
Ancell	Bayport, MN, USA
Applichem	Darmstadt, Deutschland
Bayer AG	Leverkusen, Deutschland

BD Biosciences	Franklin Lakes, NJ, USA
Beckman Coulter	Brea, CA, USA
B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Carl Zeiss AG	Jena, Deutschland
Cell Signaling Technologies	Danvers, MA, USA
CellSystems	Trisdorf, Deutschland
Clarivate Analytics	Philadelphia, PA, USA
CuraMedPharma GmbH	Karlsruhe, Deutschland
cp-pharma	Burgdorf, Deutschland
Dako	Santa Clara, CA, USA
Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Feather Safety Razor	Osaka, Japan
Frisenius Kabi AG	Bad Homburg, Deutschland
Fluka	Gehört zu Sigma Aldrich
GE Healthcare	Gehört zu ThermoFisher Scientific
Gibco	Gehört zu ThermoFisher Scientific
Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Invitrogen	Gehört zu ThermoFisher Scientific
Li-Cor Odyssey	Lincoln, NE, USA
Life Technologies	Gehört zu ThermoFisher Scientific
Merck Millipore	Billerica, MA, USA
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Otto Fischar GmbH	Saarbrücken, Deutschland
Peprtech	Rocky Hill, NJ, USA
Pfizer GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Provitro	Berlin, Deutschland

Ratiopharm GmbH	Ulm, Deutschland
Roche	Basel, Schweiz
Karl Roth AG	Karlsruhe, Deutschland
Nikon	Tokio, Japan
Probe & Go	Lemgo, Deutschland
R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
Ratiolab	Dreieich, Deutschland
Santa Cruz Biotechnologies	Dallas, TX, USA
Serva	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
SPSS Inc.	Chicago, IL, USA
Southern Biotech	Birmingham, AL, USA
Takeda	Osaka, Japan
ThermoFisher Scientific	Waltham, MA, USA
VWR	Radnor, PA, USA

2.2. Zellbiologische Arbeiten

2.2.1. Isolation von humanen Thrombozyten

2.2.1.1. Isolation von gewaschenen Thrombozyten

In einer 20 ml Spritze wurden 4 ml ACD vorgelegt und auf Raumtemperatur (RT) erwärmt, damit die Thrombozyten nicht präaktiviert werden. Das humane venöse Blut wurde von gesunden Freiwilligen, durch langsames Aufziehen in die ACD Spritze, über einen Safety-Multifly 21G, abgenommen und anschließend auf 2 15 ml Reaktionsgefäße verteilt. Um das Thrombozytenreiches Plasma (PRP) zu gewinnen, wurde das Blut für 20 Minuten bei 209 x g ohne Bremse zentrifugiert. In einem 50 ml Reaktionsgefäß wurde ca. 5 ml 1x Tyrode (Human) pH 6,5 vorgelegt. Das PRP wurde mit einer Pasteurspipette in den vorgelegten Tyrode gegeben. Anschließend wurde das Volumen auf 35 ml mit 1x Tyrode (Human) pH 6,5 aufgefüllt. Danach wurden die Thrombozyten, bei 836 x g für 10 Minuten, zu einem Pellet zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Thrombozyten wurden in 1x Tyrode

(Human) pH 6,5 resuspendiert und dieselbe Menge an 1x Tyrode (Human) pH 7,4 wurde zur Neutralisation dazugegeben.

2.2.1.2. Isolation von Thrombozytenreichem Plasma

Für das Thrombozytenreiches Plasma (PRP) wurde das Blut in CDPA (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin) Monovetten abgenommen. Diese wurden dann für 20 Minuten bei 209 x g zentrifugiert und das PRP wurde anschließend in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt.

2.2.2. Isolation von humanen Monozyten aus Vollblut

Venöses humanes Blut wurde in 8,5 ml CPDA-Monovetten, mittels eines Safety-Multifly 21G, abgenommen. Zur Beseitigung der Thrombozyten wurde bei 209 x g für 10 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Das PRP wurde abgenommen und verworfen, das restliche Blut wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend wurde das Blut-DPBS-Gemisch über einen Ficoll Paque-Gradienten geschichtet und für 20 Minuten bei 922 x g ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die intermediäre Schicht in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt, mit DPBS auf 50 ml aufgefüllt und erneut für 10 Minuten bei 535 x g mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde danach verworfen und die Zellen wurden in Monozytenmedium resuspendiert. Für die Kultivierung wurden die Zellen über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ in eine Zellkulturflaschen gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium verworfen und die Monozyten mit DPBS gewaschen, um die nicht adhärenen Zellen zu entfernen. Danach wurden die adhärenen abtrypsinisiert bzw. mechanisch abgelöst, je nach Experiment.

2.2.3. Isolation von murinen Monozyten aus Knochenmark

Die Maus wurde mittels Isofluran oder CO₂ getötet, Femur und Tibia entnommen und in eine 6 Well Platte mit Leukozytenmedium überführt. In der 6 Well Platte wurden die Enden der Epiphyse mit einem Skalpell abgeschnitten und das Knochenmark wurde mit Leukozytenmedium aus dem Knochen in ein 50 ml Reaktionsgefäß gespült. Anschließend wurde das Leukozytenmedium-Knochenmark-Gemisch durch ein 70 µm Zellsieb gefiltert und bei 301 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die Erythrozyten mittels Ammoniumchloride für 5 Minuten lysiert. Zum Abstoppen des Ammoniumchlorids wurde Medium dazugegeben und danach bei 301 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in Leukozytenmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in 6 Well Platten kultiviert und für die Versuche mechanisch abgelöst.

2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.3.1. Detektion von Proteinen mittels Gelelektrophorese und Western Blot

2.3.1.1. Herstellung von Monozyten-und Thrombozytenlysate

Die Monozyten wurden isoliert, wie unter 2.2.2 beschrieben. Nach der Ablösung der Monozyten und der Zentrifugation zu einem Pellet bei 301 x g für 5 Minuten wurden die Monozyten in 300 µl RIPA Puffer + Proteinase Inhibitor resuspendiert und anschließend für 1 Stunde bei 4°C lysiert.

Die Thrombozyten wurden wie unter 2.2.1.1 beschrieben isoliert. Allerdings wurden die Thrombozyten nach der Zentrifugation zum Pellet in 300 µl RIPA Puffer + Proteinase Inhibitor resuspendiert und nicht in Tyrode.

Danach wurden die Lysate bei 20817 x g zentrifugiert und der Proteingehalt des Überstands ermittelt. Für den Western Blot wurden dann die Lysate auf 100 µg Protein pro Western Blot Tasche eingestellt, siehe Abschnitt 2.3.1.3 zur Durchführung der Proteinbestimmung, und zur Reduktion mit 5 % β-Mercaptoethanol versetzt. Die Proteine wurden für 10 Min bei 95°C denaturiert.

2.3.1.2. Herstellung von Thrombozytenüberstand für Western Blot

Die gewaschenen Thrombozyten wurden wie unter 2.2.1.1 beschrieben hergestellt, allerdings wurde ein modifizierter Tyrode nach Coppinger dafür verwendet, für die Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.1, Tabelle 2-10. Nach der Isolation wurden die Thrombozyten für 3 Minuten mit ADP stimuliert bzw blieben unstimuliert. Danach wurden die Thrombozyten zu einem Pellet zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen und mit RIPA Puffer inklusive 5 % β-Mercaptoethanol versetzt. Für die Denaturierung der Proteine wurden die Proben bei 95°C für 5 Minuten gekocht. (Durchgeführt von Frau Christina Flaum)

2.3.1.3. Proteinbestimmung

Bei der Proteinbestimmung wurde der Proteingehalt der Lysate bestimmt. Dafür wurde in einer 96 Well Platte eine Standardkurve von 0 mg/ml bis 1 mg/ml angelegt. Die Standardkurve wurde durch die Verdünnung eines Proteinstandards mit destilliertem Wasser, erzeugt. In die 96 Well Platte wurden je 10 µl von den Proben und dem Proteinstandard aufgetragen und in jedes Well wurde dann 200 µl der BioRad Proteinassay Detektionslösung gegeben. Der ELISA wurde bei 595 nm am BioRad ELISA Plate Reader ausgelesen. Für den Western Blot wurde dann anhand von der Proteinbestimmung die gewünschte Konzentration destilliertem Wasser eingestellt.

2.3.1.4. Herstellung der Gele für die Gelelektrophorese

Die Gele wurden in Gelkassetten gegossen. Zuerst wurde das Trenngel in einem 50 ml Reaktionsgefäß hergestellt. Dafür wurde H₂O, 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, Acrylamide/bis-acrylamide 30 % und 10 %iges SDS mit 10 %igem APS und TEMED vermischt und luftblasenfrei in die Gelkassette überführt. Damit es zu einem geraden Abschluss des Gels kommt, wurde das flüssige Gel mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 20 Minuten war das Trenngel polymerisiert und das Isopropanol konnte entfernt werden. Danach wurde das Sammelgel hergestellt, dabei wurde H₂O, 1 M Tris/HCl pH 6,8, Acrylamide/bis-acrylamide 30 % und 10 %iges SDS mit 10 %igem APS und TEMED vermengt und anschließend auf das Trenngel gegeben. Damit Taschen für das Protein entstehen, wurde ein Kamm auf die Gelkassette gesteckt. Anschließend wurde gewartet bis das Sammelgel ebenfalls polymerisiert war. Für die genaue Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels siehe Anhang 8.5.

2.3.1.5. Gelelektrophorese und Western Blot

Während der Gelelektrophorese wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dies geschieht durch die negative Ladung der Proteine, diese wurden durch das elektrische Feld aufgetrennt. Die Gelelektrophorese erfolgt bei 80 Volt und 400 Milliampere. Nachdem die Gelelektrophorese die Proteine aufgetrennt hatte, wurden die Proteine auf eine PVDF Membran mittels Elektrontransfer übertragen. Dabei wurde der Western Blot folgendermaßen zusammengebaut (von negativ zur positiv geladenen Seite): Filterpapier, PVDF Membran, SDS Gel, Filterpapier. Das Blotting des Gels fand bei einer Spannung von 10 Volt und 70 Milliampere statt. Bei mehr als einem Gel wurde die Spannung entsprechend der Anzahl der Gele multipliziert. Die Proteine auf der Membran wurden anschließend durch eine Immundetektion, siehe 2.3.1.6, nachgewiesen.

2.3.1.6. Immundetektion

Bei der Immundetektion wurden die Proteine, welche sich auf der Membran befinden, gezielt durch primäre Antikörper angefärbt.

Zuerst wurde die Membran mit einer 5 %igen BSA Lösung blockiert, um die unspezifischen Bindungen zu reduzieren. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper, siehe Tabelle 2-2 und Tabelle 2-3, über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran gewaschen, um überschüssige Reste des primären Antikörpers zu entfernen. Danach wurde die Membran für 1 Stunde mit einem sekundären Antikörper, siehe Tabelle 2-4, inkubiert und anschließend wieder gewaschen, um die ungebundenen sekundär Antikörper zu entfernen. Die Detektion erfolgt mit dem Licor Odyssey Infrarot Imaging Scanner und die Bestimmung der Bandenhöhe erfolgte über die Markerbanden.

2.3.2. Konfokale Aufnahmen

2.3.2.1. Konfokale Aufnahmen von Monozyten

2.3.2.1.1. Vorbereitung der Deckgläser für die Monozyten

Runde Deckgläser mit einem Durchmesser von 15,6 mm wurden in 70 %igem Alkohol gereinigt und anschließend getrocknet. Damit die Monozyten auf den Deckgläsern adhären konnten, wurden die Deckgläser mit Poly-Lysin beschichtet und für 2 Stunden bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser in eine 24 Well Platte gegeben.

2.3.2.1.2. Vorbereitung der Monozyten

Für die Konfokalen Aufnahmen wurden Monozyten aus humanem Vollblut isoliert und über Nacht kultiviert, siehe 2.2.2. Am folgenden Tag wurden die Monozyten mechanisch aus der Kulturflasche gelöst und gezählt. Dann wurden die Monozyten auf die vorbereiteten Deckgläser gegeben und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.3.2.1.3. Färbung der Monozyten und konfokale Aufnahmen

Nachdem die Monozyten sich über Nacht auf den Deckgläsern absetzen konnten, wurden sie für 15 Minuten mit 200 nM CyPA stimuliert und anschließend mit 2 %igem Formaldehyde für 15 Minuten fixiert. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren wurde die Monozyten für 1 Stunde mit 1 %igem BSA blockiert. Danach wurden die Monozyten über Nacht mit den primären Antikörpern, siehe Tabelle 2-6, inkubiert und danach für 1 Stunde mit den sekundären Antikörpern, siehe Tabelle 2-7. Für die Zellkernfärbung wurden die Monozyten für 30 Minuten mit To-Pro3 Iodine inkubiert. Für die Aufnahmen von den Monozyten wurden die Deckgläser aus der 24 Well Platte geholt und mit Fluoreszenz Eindeckelmedium auf Objektträgern eingedeckelt. Die gefärbten Monozyten wurden mit einem Zeiss LSM5 EXCITER Confocal Laser Scanning Mikroskop aufgenommen.

2.3.2.2. Konfokale Aufnahmen von Thrombozyten

2.3.2.2.1. Beschichtung der Deckgläser für die Thrombozyten

Die Deckgläser für die Thrombozyten wurden mit 20 µg/ml Fibrinogen beschichtet. Dafür wurde das Fibrinogen in 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween-20, pH 7,5 verdünnt und auf den Deckgläsern verteilt.⁷¹ Das Fibrinogen wurde für 2 Stunden bei 37°C auf den

Deckgläsern inkubiert und anschließend wurden die vorbereiteten Thrombozyten auf die Deckgläser gegeben.

2.3.2.2.2. Vorbereitung, Färbung und konfokale Aufnahmen der Thrombozyten

Die Thrombozyten wurden in einem modifizierten Tyrode Puffer nach Coppinger et al⁷¹ zu gewaschenen Thrombozyten isoliert. Zuerst wurden 4×10^6 Thrombozyten zur Adhäsion auf die Deckgläser gegeben und für 1 Stunde mit 50 μ M ADP stimuliert bzw. blieben unstimuliert. Danach wurden die Thrombozyten 15 Minuten fixiert (1 % Formaldehyde) und mit Triton X-100 für 10 Minuten permeabilisiert. Anschließend wurden die Thrombozyten mit 1 %igem BSA über Nacht blockiert und mit einem Anti-CyPA Antikörper bzw. der IgG Kontrolle für 2 Stunden inkubiert und anschließend mit einem sekundär Antikörper (Ziege gegen Maus, Alexa Fluor 568) 1 Stunde gefärbt. Zum Schluss wurden die Deckgläser mit Eindeckelmedium auf Objektträgern eingedeckelt. Die gefärbten Thrombozyten wurden mit einem Zeiss LSM5 EXCITER Confocal Laser Scanning Mikroskop aufgenommen.

2.3.3. Bindungs-ELISA

2.3.3.1. CyPA-8H7-mAk/IgG-Bindungs-ELISA

2.3.3.1.1. Beschichtung der Platte

Eine 96 Well Platte wurde mit 200 nM rekombinantem CyPA beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das rekombinante Protein entfernt und die Platte mit 0,1 % Tween 20 in PBS (PBST) gewaschen. Anschließend wurde die Platte mit 4 % BSA über Nacht blockiert.

2.3.3.1.2. Konzentrationsreihe

Die Bindung zwischen CyPA und 8H7-mAk bzw. IgG wurde in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe bestimmt. Dafür wurden folgende Konzentrationen von 8H7-mAk und IgG hergestellt: 0; 5; 20; 50; 100 μ g/ml und auf die CyPA beschichtete Platte aufgetragen. Die Platte wurde für 3 Stunden bei RT mit dem Antikörper 8H7-mAk bzw. der IgG inkubiert und anschließend mit PBST gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen.

2.3.3.1.3. Detektion der Bindung

Für die anschließende Detektion der Bindung wurde die Platte erst mit einem biotinylierter SAK (anti-Ratte, 2 mg / Well) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBST wurde ein Streptavidin-HRP Komplex auf die Platte gegeben und ebenfalls für 1 Stunde inkubiert. Für

die Farbreaktion wurde der Streptavidin-HRP Komplex entfernt, die Platte gewaschen und 100 µl vom Detektionsreagens TMB in jedes Well gegeben. Nach 1 ½ Minuten wurde die Farbreaktion durch die Hinzugabe von 100 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt und die Farbreaktion in einer Wellenlänge von 450 nm, mit einem Referenzwert von 570 nm gemessen.

2.3.3.2. CyPA-RAGE-Fc/Fc-Bindungs-ELISA

2.3.3.2.1. Beschichtung der Platte

Eine 96 Well Platte wurde mit 10 µg/ml rekombinatem RAGE-Fc bzw. rekombinatem Fc beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das überschüssige rekombinante Protein verworfen und die Platte mit 5 % BSA für 1 Stunde blockiert.

2.3.3.2.2. Konzentrationsreihe

Um die Bindung zwischen CyPA und RAGE-Fc bzw. Fc nachzuweisen wurden rekombinantes CyPA in einer aufsteigenden Konzentrationskurve auf das rekombinante RAGE-Fc bzw. Fc gegeben. Dafür wurde das CyPA mit PBS verdünnt und in folgenden Konzentrationen auf die beschichtete Platte gegeben: 0; 0,4688; 0,9375; 1,875; 3,75; 7,5 µg/ml und für 3 Stunden bei RT inkubiert und anschließend mit PBST gewaschen um das ungebundene Protein zu entfernen.

2.3.3.2.3. Detektion der Bindung

Um die Bindung der zwei rekombinanten Proteine detektieren zu können wurde die Platte für 1 Stunde RT mit einem anti-CyPA Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation wurde der ungebundene Antikörper durch waschen mit PBST entfernt und mit einem biotinylierten sekundär Antikörper (anti-Ratte, 2 mg / Well) für 45 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBST wurde ein Streptavidin-HRP Komplex auf die Platte gegeben und ebenfalls für 45 Minuten inkubiert. Für die Farbreaktion wurde der Streptavidin-HRP Komplex entfernt, die Platte gewaschen und 100 µl vom Detektionsreagens TMB in jedes Well gegeben. Nach 1 ½ Minuten wurde die Farbreaktion durch die Hinzugabe von 100 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt und die Farbreaktion in einer Wellenlänge von 450 nm, mit einem Referenzwert von 570 nm gemessen.

2.4. Funktionelle Assays

2.4.1. Statischer Adhäsions-Assay

2.4.1.1. Ablösung und Vorbereitung der Zellen

Die Monozyten wurden mit Hilfe von einem Zellschaber abgelöst, bei 535 x g zentrifugiert, in 1 ml Monozytenmedium resuspendiert und in einer Neubauerkammer gezählt, dafür wurden die Zellen mit Türkslösung 1:10 verdünnt. Danach wurden die Zellen auf eine Konzentration von 2×10^4 Monozyten/Leukozyten pro 50 μ l Medium eingestellt. Die humanen Monozyten wurden zusätzlich mit den rezeptorblockierenden Antikörpern anti-CD147, anti-RAGE, und beiden Antikörpern zusammen bzw. der dazugehörigen IgG vorbehandelt. Die murinen Leukozyten wurden nicht vorbehandelt.

2.4.1.2. Aufbau des Adhäsions-Assay

Eine 96-Well Platte wurde mit 200 nM CyPA bzw. BSA beschichtet und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die Beschichtung abgesaugt und die Platte konnte 30 Minuten trocknen. Danach wurde die Platte mit 4% BSA für 1 Stunde blockiert und mit DPBS nachgewaschen. Anschließend wurden 2×10^4 vorbereiteten Monozyten/Leukozyten, zur Vorbereitung siehe 2.4.1.1, in jedes Well gegeben und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Die nicht adhärenen Zellen wurden abgesaugt und die restlichen losen Zellen durch leichtes Waschen mit DPBS entfernt. Zur Auswertung wurden von jeden Well 5 Bilder mit einer 20-fachen Vergrößerung aufgenommen und die adhärenen Zellen gezählt.

2.4.2. Migration

2.4.2.1. Ablösen der Zellen

Für die Migration wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und bei 535 x g zu einem Pellet zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Monozytenmedium oder Leukozytenmedium resuspendiert und in einer Neubauerkammer gezählt. Die humanen Monozyten wurden dazu 1:10 und die murinen Leukozyten 1:2 mit Türkslösung verdünnt.

2.4.2.2. Aufbau der Migrationskammer

Die Migration wurde in einer 48 Well Boyden Kammer durchgeführt. Die Kammer besteht aus 4 verschiedenen Teilen. In die untere Kammer wurden die chemotaktischen Substanzen, wie CyPA (200 nM), gegeben und jene Stoffe, die mit diesen direkt interagieren. Diese wurden durch einen Filter (5 μ m Poren für humane Monozyten oder 3 μ m Poren für murine Leukozyten) und einer Gummimatte von der oberen Kammer getrennt. In der oberen Kammer

wurden 2×10^4 Monozyten bzw. Leukozyten zur Migration eingesetzt. In der Tabelle 2-18 angegeben in welche Kammer die Substanzen gegeben wurden.

2.4.2.3. Migration und Färbung der Zellen

Für die Migration wurden die Zellen für 4 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Die Monozyten und Leukozyten wandern durch den Filter in Richtung der chemotaktischen Substanzen in der unteren Kammer in diese Richtung und bleiben auf dem Filter hängen.

Am Ende der Migration wurden die nicht-migrierten Zellen aus der oberen Kammer verworfen und der Filter wurde mit 100 %igem Methanol fixiert. Die sich auf dem Filter hängenden Zellen wurden anschließend mit einer May-Grünwald/Giemsa Lösung gefärbt. Nach der Färbung wurde die überschüssige Farblösung mit destilliertem Wasser abgespült und der Filter zum Trocknen mit Rothi-Histol Eindeckmedium eingedeckt. Die Zellen auf dem getrockneten Filter wurden dann unter dem Mikroskop ausgewertet.

Tabelle 2-18 Antikörper in der Migrationskammer

Substanz	Untere Kammer	Obere Kammer
7C2 (20 µg/ml)	√	
5A11 (20 µg/ml)	√	
1B7 (20 µg/ml)	√	
8E6 (20 µg/ml)	√	
8H7 (20 µg/ml)	√	
Anti-CD147 (20 µg/ml)		√
Anti-Rage (20 µg/ml)		√
IgG	Bei TAKTE Antikörpern	Bei anti-Rage, anti-CD147 Antikörpern

2.4.3. Dynamische Adhäsion mit humanen Monozyten und murinen Leukozyten (Flusskammer)

2.4.3.1. Beschichtung der Deckgläser

2.4.3.1.1. Beschichtung mit rekombinantem CyPA

Deckgläser mit einem Durchmesser von 24 mm wurden in 70 %igem Ethanol gereinigt und in einer 6 Well Platte getrocknet. Danach wurden die Deckgläser mit 0,2 %iger Gelatine beschichtet und für 10 Minuten bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser mit rekombinantem CyPA (200 nM) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.4.3.1.2. Beschichtung mit HUVECs und Aktivierung der HUVECs

Die Deckgläser wurden in 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und mit 0,2 %iger Gelatine beschichtet. Anschließend wurden die Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) auf die Deckgläser gegeben und bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert bis die Zellen konfluent waren.

Für den Versuch wurden die HUVECs mit 50 µg/ml TNF α und 20 µg/ml INF γ für 4 Stunden inkubiert, um eine Stimulation der Zellen zu erreichen.

2.4.3.2. Vorbereitung der Monozyten und Leukozyten

Monozyten wurden, wie unter 2.2.2 beschrieben, isoliert und mit Trypsin abgelöst und murine Leukozyten, wie unter 2.2.3 beschrieben isoliert und mechanisch abgelöst. Die Monozyten/Leukozyten wurden zu einem Pellet zentrifugiert, in dem jeweiligen Zellkulturmedium resuspendiert und auf eine Konzentration von 1×10^6 Monozyten pro 10 ml Volumen eingestellt.

2.4.3.2.1. Murine Leukozyten über rekombinantes CyPA

Die murinen Leukozyten wurden für 2 Stunden bei RT mit 1 µg/ml LPS stimuliert und anschließend über rekombinantes CyPA perfundiert. Für die Durchführung der Flusskammer siehe 2.4.3.3.

2.4.3.2.2. Humane Monozyten über HUVEC

Die humanen Monozyten wurden für 30 Minuten mit 200 nM CyPA stimuliert und gleichzeitig mit 20 µg/ml 8H7-mAk oder der dazugehörigen IgG Kontrolle, in derselben

Konzentration wie der Antikörper, behandelt. Anschließend wurden die Monozyten über die aktivierten HUVECs perfundiert. Für die Aktivierung der HUVECs siehe 2.4.3.1.2 und für die Durchführung der Flusskammer siehe 2.4.3.3.

2.4.3.2.3. Humane Monozyten über rekombinantes CyPA

Die humanen Monozyten wurden für 2 Stunden mit 1 µg/ml LPS bei RT stimuliert. Vor der Stimulation wurden die Monozyten mit 20 µg/ml anti-RAGE, anti-CD147 bzw. der passenden IgG Kontrolle inkubiert. Für die Durchführung der Flusskammer siehe 2.4.3.3.

2.4.3.3. Durchführung der Flusskammer

Mit einer Flussgeschwindigkeit von 15 ml/Stunde wurden die Monozyten/Leukozyten über rekombinantes CyPA oder aktivierte HUVECs perfundiert. Für die Auswertung wurden die Monozyten/Leukozyten erst 10 Minuten über die Deckgläser perfundiert, dies dient als Vorlaufzeit. Danach wurden 4 x 40 Sekunden Tracks aufgenommen und diese anschließend off-Line ausgewertet. Dafür wurden die adhärenen und rollenden Monozyten/Leukozyten, per Gesichtsfeld, gezählt.

2.4.4. Thrombozytenaktivierung

2.4.4.1. Stimulation der Thrombozyten

Das PRP wurde aus humanem Vollblut isoliert, siehe 2.2.1.2. Die Thrombozyten wurden für 1 Stunde mit 200 nM CyPA stimuliert und gleichzeitig mit 200 nM NIM811, 200 nM MM284, 20 µg/ml 8H7-mAk oder 20 µg/ml IgG behandelt bzw. blieben unstimuliert.

2.4.4.2. CD62P Färbung für Durchflusszytometry

Nach der Stimulation wurde die CD62P (P-Selectin) Expression auf der Oberfläche angefärbt. Dafür wurden die stimulierten Thrombozyten mit einem anti-CD62P-FITC Antikörper für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Thrombozyten mit 0,5 %igem Formaldehyde fixiert. Die CD62P Expression wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.4.5. Thrombusformation

2.4.5.1. Beschichtung der Deckgläser

60 x 24 mm Deckgläser wurden mit 100 µg/ml Typ I Kollagen beschichtet und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Kollagen abgekipppt und die Deckgläser für mindestens 1 Stunde mit 1 %igem BSA bei RT blockiert.

2.4.5.2. Vorbereitung der humanen Blutproben

Das humane Blut wurde in CPDA-Monovetten abgenommen. Für die einzelnen Ansätze wurden je 800 µl Blut in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben. Das Blut wurde 1 Stunde mit 200 nM CyPA stimuliert und je nach Versuch wurden die CyPA-Inhibitoren 8H7-mAk, IgG (beide 20 µg/ml), MM284, oder NIM811 (beide 200 nM) dazugegeben. Bei den Versuchen mit den rezeptorblockierenden Antikörpern wurde das Blut erst für 30 Minuten mit Antikörpern anti-RAGE oder anti-CD147 oder der IgG Kontrolle (alle 20 µg/ml) vorbehandelt und anschließend mit 200 nM CyPA für 1 Stunde stimuliert, siehe Tabelle 2-19. Als negative Kontrolle wurde unstimuliertes Blut genommen.

Um ein einheitliches Volumen in allen 1,5 ml mikroreaktionsgefäßen zu haben, wurde das Volumen mit DPBS + Ca²⁺ + Mg²⁺ auf 1 ml eingestellt.

2.4.5.3. Vorbereitung der murinen Blutproben

Das murine Blut wurde aus dem retrobulbären Venenkomplex hinter dem Auge entnommen. Dafür wurde 210 µl Heparin in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß vorgelegt. Der Maus wurde mit einer Kapillare in den retrobulbären Venenkomplex gestochen und das Blut konnte durch die Kapillare in das 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß tropfen. Für die Flusskammer wurde das Blut-Heparin Gemisch auf 2 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße verteilt, je 500 µl pro Reaktionsgefäß. Je nach Versuch wurde das Blut mit 200 nM CyPA für 1 Stunde stimuliert und zusätzlich mit den CyPA-Inhibitoren NIM811 (200 nM) oder MM284 (200 nM) behandelt, siehe Tabelle 2-19, bzw. nicht stimuliert als negativ Kontrolle. Nach der Stimulation wurde 500 µl 1x Tyrode (Murin) zu dem Blut gegeben, um ein Endvolumen vom 1 ml zu erreichen.

Tabelle 2-19 Inkubationszeiten der Thrombusformation

Inhibitor / Antikörper	Präinkubation des Blutes für 30 min	Zugabe zum Blut zusammen mit CyPA
8H7 (20 µg/ml)		√

IgG (20 µg/ml)	Bei anti-Rage und anti-CD147	Bei 8H7
MM284 (200 nM)		√
NIM811 (200 nM)		√
Anti-Rage (20 µg/ml)	√	
Anti-CD147 (20 µg/ml)	√	

2.4.5.4. Thrombusformation unter Flussbedingungen und Auswertung

Bei der Thrombusformation wird Vollblut über ein beschichtetes Deckglas perfundiert. Durch die Aktivierung des Blutes bleiben die Thrombozyten auf der Beschichtung hängen und ein Thrombus entsteht.

Nach der Inkubationszeit wurde das Blut in eine 1 ml Spritze aufgezogen und mit einer Flussgeschwindigkeit von 1000 Sekunden⁻¹ über ein mit Typ I Kollagen-beschichtetes oder CyPA-beschichtetes Deckglas perfundiert. Anschließend wurde mit DPBS + Ca²⁺ + Mg²⁺ bei humanem Blut oder 1x Tyrodes (Murin) bei murinem Blut nachgespült, damit das Blut, das sich noch im Schlauch befindet, ebenfalls über das beschichtete Deckglas perfundiert wurde. Nachdem alles Blut über das Deckglas gelaufen war, wurden unter denselben Flussbedingungen Bilder von den Thromben gemacht. Die Auswertung der Thrombusformation erfolgt durch die Auswertung der Bilder. Die Bilder wurden mit einer 20-fachen Vergrößerung aufgenommen und die mit Thromben bedeckte Fläche wird prozentual zur Gesamtfläche berechnet.

2.5. In vivo Versuche an der Maus

2.5.1. Versuchstiere

Für alle Tierversuche wurden spezifisch pathogen freie Mäuse, der Linien C57Bl/6J, 129.Cg-Ppia^{tm1Lubn}/J (CyPA^{-/-} und CyPA^{+/+}), RAGE (RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-}) und B6.129P2(SJL)-Myd88^{tm1.1Defi}/J (MyD88^{+/+} und Myd88^{-/-}) verwendet. Alle Mäuse wurden speziell für diese Versuche gezüchtet.

2.5.2. Peritonitis

2.5.2.1. Induktion der Peritonitis

Bei der Peritonitis wird die *in vivo* Infiltration von verschiedenen pro-inflammatorischen Zellen analysiert. Um eine Kontamination durch die Injektion zu vermeiden, wurde das Fell der Mäuse mit Desinfektionsmittel desinfiziert, nachdem die Maus mit Isofluran betäubt war. Danach wurden den Mäusen intraperitoneal 10 µg CyPA in einem Volumen von 1 ml injiziert. Zur Schmerzlinderung wurden den Tieren subkutan Buprenorphin injiziert. Die Buprenorphin Injektion wurde alle 12 Stunden bis zum Ende des Versuchs wiederholt.

Der CyPA-Antikörper 8H7-mAk und die dazugehörige IgG Kontrolle wurde den Mäusen, in einer Konzentration von 10 mg/kg Körpergewicht, zusammen mit dem CyPA appliziert.

2.5.2.2. Peritoneallavage

Nach 24 Stunden bzw. 48 Stunden wurden die Mäuse mittels Isofluran bzw. CO₂ getötet. Die infiltrierten Zellen wurden durch eine Lavage des Bauchraumes gewonnen. Für die Lavage wurde in den Bauchraum der Maus ein PBS/Luft Gemisch (3 ml PBS und 2 ml Luft) injiziert und die Maus anschließend gerollt, damit sich das Gemisch verteilen kann. Danach wurde die Maus auf einer Unterlage, mittels Kanülen, festgesteckt und das Fell von der Bauchwand abgelöst, damit möglichst keine Fellhaare in die Lavage kommen. Mit einer Schere wurde ein kleiner Schnitt in die Bauchwand gemacht und die Flüssigkeit mittels einer Pasteurpipette aus dem Bauchraum entfernt und in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben. Um die noch verbleibenden Zellen zu gewinnen wurde der Bauchraum mit 6 ml PBS nachgespült und ebenfalls mittels einer Pasteurpipette in das Reaktionsgefäß überführt.

2.5.2.3. Durchflusszytometrie Färbung

Die Lavage wird in einem 15 ml Reaktionsgefäß bei 301 x g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend mit 1 ml FACS Lyselösung (englisch: FACS Lysis Solution) fixiert. Die Zellen wurden in der Neubauerkammer gezählt und je 0,5 x 10⁶ Zellen wurden auf die verschiedenen FACS Röhrchen verteilt. Die Zellen wurden mit CD11b-APC, F4/80-APC oder CD3-APC gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurden dann je Röhrchen 2 x 10⁴ Zellen gemessen. Für die Analyse wurde bestimmt wieviel Prozent der Zellen positiv für die gemessenen Oberflächenmarker sind und anhand der Gesamtzellzahl in der Lavage berechnet.

2.5.3. Intravital Mikroskopie – Ligatur an der Karotis – in vivo Adhäsion von Thrombozyten

2.5.3.1. Vorbereitung der Thrombozyten

CyPA^{-/-} oder CyPA^{+/+} Mäusen wurde kardial das Blut in einer mit Citrat vorgelegten Spritze entnommen. Das Vollblut wurde anschließend bei 120 x g für 20 Minuten zentrifugiert und das PRP wurde abgenommen und die Thrombozyten mit 200 nM CyPA für 1 Stunde stimuliert bzw. blieben unstimuliert. Danach wurden die Thrombozyten für 4 Minuten mit DCF-labeled [(5-(and-6)-carboxyfluoresceindiacetate succinimidyl ester] gefärbt. Nach dem Färben wurden die Thrombozyten zu einem Pellet zentrifugiert und dann in Tyrode pH 7,4 resuspendiert. Pro Maus wurden intravenös 8×10^6 Thrombozyten appliziert.

2.5.3.2. Vorbereitung der Tiere für den Versuch

Für die Karotisligatur wurden Männliche und weibliche CyPA^{-/-} und CyPA^{+/+} Mäuse verwendet. Vor dem Beginn des Versuchs wurden die Mäuse mittels intraperitoneal applizierter Injektionsnarkose narkotisiert. Die Zusammensetzung der Injektionsnarkose ist, 5 mg/kg Körpergewicht Midazolam, 0,5 mg/kg Körpergewicht Medetomidin und 0,05 mg/kg Körpergewicht Fentanyl. Während des Versuchs wurde die Narkose mittels einer 1 %igen Isofluraninhalationsnarkose aufrechterhalten. Nachdem die Wirkung der Narkose eingesetzt hatte, wurde die Tiere auf eine Wärmematte gelegt um ein auskühlen zu vermeiden und die Karotis Communis wurde freigelegt und mit einem Faden für 5 Minuten abgebunden, um eine Verletzung des Gefäßes zu erreichen. (Durchgeführt von Frau Katja Metzger).

2.5.3.3. Durchführung des Versuchs

Zu Beginn des Versuchs wurden den Tieren intravenös die Thrombozyten der Spendertiere injiziert, CyPA^{-/-} Thrombozyten wurden CyPA^{+/+} Mäusen injiziert und CyPA^{+/+} Thrombozyten wurden intravenös CyPA^{-/-} Mäusen injiziert. (Durchgeführt von Frau Katja Metzger).

2.5.3.4. Auswertung der adhärenen Thrombozyten

Vor der Ligatur und nach der Ligatur wurden 30 Sekunden Filme von dem beschädigten Bereich der Karotis Communis gemacht und die Interaktion der Thrombozyten mit dem Endothel ausgewertet. Die Adhärenen Thrombozyten wurden durch die anschließende Auswertung der Filme analysiert.

2.5.4. Intravital Mikroskopie - FeCl₃ (Eisen(III)Chlorid Modell in Mesenterialgefäßen – in vivo Thrombusbildung

2.5.4.1. Vorbereitung der Mäuse

Männlichen und weiblichen C57Bl/6J Mäusen wurden vor dem Beginn des Versuchs mittels intraperitoneal applizierter Injektionsnarkose narkotisiert. Für die Zusammensetzung siehe 2.5.3. Die Mäuse wurden auf einer Wärmematte bei 37°C gehalten, um ein Auskühlen zu vermeiden. Während des Versuchs wurde die Narkose mittels einer 1 %igen Isofluraninhalationsnarkose aufrechterhalten. 30 Minuten vor der Verletzung des Gefäßes wurde den Mäusen 8H7-mAk bzw. eine IgG Kontrolle (10 mg/kg Körpergewicht) intravenös appliziert. In der Zwischenzeit wird durch einen Bauchschnitt das Mesenterium freigelegt und eine Arteriole wird von Fett und Gewebe befreit.

2.5.4.2. Durchführung der FeCl₃-induzierten Thrombusbildung

Diese Arteriole wird nach Ablauf der 30 Minuten mittels in einer 20 %igen FeCl₃ Lösung - getränktem Filterpapier für 10 Sekunden verletzt. Die Thrombusbildung in der Arteriole wurde mittels Intravitalmikroskopie bis zum Eintritt einer Okklusion, welche länger als 1 Minute anhält, oder für maximal 40 Minuten, beobachtet. Danach wurde die Maus noch vor dem Erwachen aus der Narkose durch einen Genickbruch getötet. (Durchgeführt von Frau Britta Walker-Allgaier).

2.5.5. Blutungszeit - Schwanzspitzensektion

2.5.5.1. Messung der Blutungszeit

Für die Schwanzspitzensektion wurden C57Bl/6J Mäuse mit einer 3-fachen Narkose betäubt (Midazolam, Medetomidin und Fentanyl) und 8H7-mAk bzw. die IgG Kontrolle, beides 10 mg/kg Körpergewicht, intravenös appliziert. Nach 30 Minuten wurden 3 mm von der Schwanzspitze mit einem Skalpell abgeschnitten. Alle 20 Sekunden wurde der Blutstropfen mit einem Wortmannpapier aufgesaugt, ohne den Schwanz zu berühren, bis es aufgehört hat zu bluten. Sollte nach 20 Minuten die Blutung nicht gestoppt sein, wurde der Versuch abgebrochen.

Nach dem Stoppen der Blutung, spätestens nach 20 Minuten, wurde den Mäusen retrobulbär das Blut entnommen und anschließend getötet. Die Anzahl der Thrombozyten wurde hämatologisch bestimmt.

2.5.5.2. *Bestimmung der Thrombozytenanzahl*

Damit die gemessene Thrombozyten Anzahl vergleichbar ist, werden 5-6 Blutstropfen in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß geblutet und anschließend 90 µl Blut in ein EDTA-Monovette überführt. Das Blut wurde im hämatologisch analysiert.

2.5.6. *Ethische Vertretbarkeit der Tierversuche*

Alle Tierversuche wurden nach dem deutschen Tierschutzgesetz und nach erteilter Genehmigung durch das Regierungspräsidium Tübingen (Tierversuchsanträge M2/09, M7/14 und M1/16, §8a Anzeige vom 06.05.2014 und §4 Tötungsanzeige vom 24.03.2015) und der Regierung von Oberbayern (55.2-1-54-2531.6-4-99) durchgeführt.

2.6. Statistische Auswertung

Die statische Auswertung wurde mit den Computerprogrammen Graphpad Prism 6 und SPSS 21 durchgeführt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler (S.E.M.) angegeben. Je nach Versuchsaufbau wurde ein Student's t-test oder eine Dunnet's One-Way ANOVA durchgeführt. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als signifikant erachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss von extrazellulärem CyPA auf Thrombozyten

3.1.1. Wirkung von extrazellulärem CyPA auf humane Thrombozyten

Als erstes wurde untersucht, ob Thrombozyten in der Lage sind nach Stimulation CyPA freizusetzen. Dafür wurden humane Thrombozyten mit ADP stimuliert. Innerhalb weniger Minuten konnte CyPA im Überstand der aktivierten Thrombozyten via Western Blot nachgewiesen werden. Dagegen sezernieren unstimulierte Thrombozyten kein CyPA (Abbildung 3-1A). Darüber hinaus konnte via konfokaler Mikroskopie nachgewiesen werden, dass es durch die Stimulation von Thrombozyten mit ADP zu einer Verteilungsveränderung von CyPA im Thrombozyten kommt. Bei den unstimulierten Thrombozyten ist das CyPA gleichmäßig in der Zelle verteilt, dagegen ist das CyPA bei den aktivierten Thrombozyten eher im Randbereich als in der Zellmitte zu finden (Abbildung 3-1B).

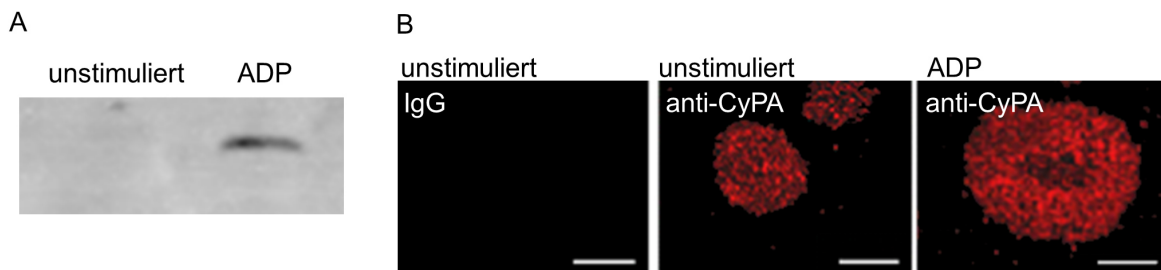


Abbildung 3-1 Sekretion von CyPA. Im Western Blot wurde nachgewiesen, dass Thrombozyten sind in der Lage nach der Stimulation mit ADP CyPA in den Überstand abzugeben (A). Die Konfokalen Bilder zeigen die CyPA Verteilung von CyPA bei unstimulierten und ADP stimulierten Thrombozyten (B). Maßbalken = 5 μ m. (modifiziert nach Seizer, von Ungern-Sternberg et al.)²¹

Als nächstes wurde der Effekt vom extrazellulären CyPA auf die Thrombozytenaktivierung untersucht. Dafür wurden Thrombozyten aus humanem Blut isoliert und mit rekombinanten CyPA stimuliert. Anschließend wurde die Expression des Thrombozytenaktivierungsmarkers CD62P mittels Durchflusszytometrie analysiert. Wie in Abbildung 3-2A und B gezeigt, kam es durch die Stimulierung mit rekombinanten CyPA zu einer vermehrten Expression des von CD62P auf der Thrombozytenoberfläche. Durch eine Antagonisierung mit CyPA-bindenden CsA Derivaten, wie dem zellgängigen NIM811, konnte dieser Effekt konzentrationsabhängig inhibiert werden. Bei einer äquimolaren Konzentration von CyPA und den Inhibitoren war der CyPA-Effekt komplett aufgehoben und konnte durch eine höhere Dosis des Inhibitors nicht weiter reduziert werden (Abbildung 3-2A). Zudem zeigte auch der rein extrazellulär wirkende CyPA-Inhibitor MM284 eine ähnliche inhibitorische Eigenschaft, was unspezifische intrazelluläre CyPA-Effekte im Thrombozyten nahezu ausschließt (Abbildung 3-2B).

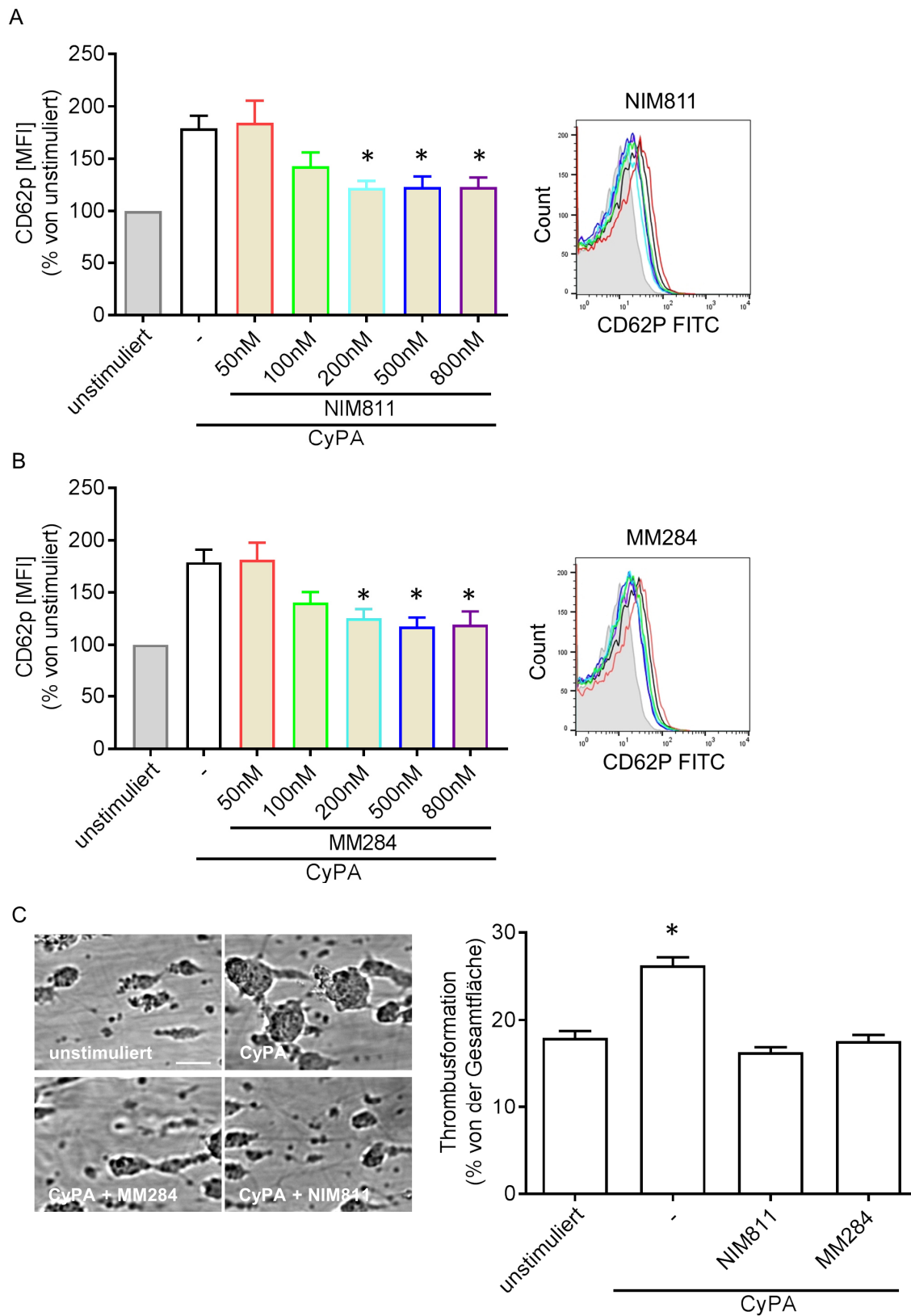


Abbildung 3-2 Einfluss von CyPA auf die Thrombozyten Aktivierung und Thrombusbildung *in vitro*. CyPA führt zur Aktivierung (CD62p Expression) auf humanen Thrombozyten, NIM811 und MM284 können diese Aktivierung hemmen, mit repräsentativen Abbildung (A). Darüber

hinaus bildete humanes Vollblut, welches mit CyPA stimulierte ist Thromben auf einer Kollagenmatrix. Dieses konnte durch die Zugabe von NIM811 und MM284 verhindert werden, mit repräsentativen Abbildung (B). Maßstabballen = 20 μm (modifiziert nach Seizer, von Ungern-Sternberg et al.)²¹

Nachdem ein klarer Effekt von extrazellulärem CyPA auf thrombozytäre Aktivierungsmarker wie CD62P gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob die gefundenen Effekte auch funktionelle Relevanz für die Thrombozytenfunktion bedeuten. Dazu wurde der Einfluss von extrazellulärem CyPA auf die *in vitro* Thrombusbildung mit humanem Blut in einem Flusskammermodell wie unter Abschnitt 2.4.5 beschrieben untersucht. Dafür wurde humanes Vollblut mit CyPA stimuliert und mit der äquivalenten Konzentration an NIM811 bzw. MM284 neutralisiert. Anschließend wurde das Blut über Kollagen perfundiert. Dabei zeigte sich, wie in Abbildung 3-2C zu sehen, dass es zu einer CyPA-vermittelten Erhöhung der Thrombusbildung kommt. Die erhöhte Thrombusbildung konnte durch NIM811 sowie MM284 auf das Level der unstimulierten Thrombozyten gesenkt werden ($26,27 \pm 0,91$ vs. $16,33 \pm 0,59$ vs. $17,62 \pm 0,69$). Dies zeigt, dass es ohne den Einfluss vom intrazellulären CyPA zur Thrombusformation auf Kollagen kommt.

3.1.2. Einfluss von extrazellulärem CyPA auf murine Thrombozyten

Nachdem wir zeigen konnten, dass extrazelluläre CyPA einen Einfluss auf die Thrombusformation im humanen Blut hat, wurde der Einfluss von extrazellulären CyPA auf das murine Blut untersucht. Dies sollte als Basis dienen, um *in vivo* Untersuchungen vornehmen zu können. Dafür wurde zuerst CyPA^{+/+} Mäusen Blut entnommen und die Thrombozyten isoliert. Anschließend wurden die Thrombozyten auf ihre CyPA-abhängige Aktivierung, mittels des aktivierungsabhängigen Oberflächenmarkers CD62P in der Durchflusszytometry untersucht. Wie Abbildung 3-4A zeigt, kam es durch die Aktivierung mit rekombinantem CyPA zu einer Degranulation der α -Granula in den Thrombozyten, wodurch CD62P auf der Oberfläche exprimiert wurde. Die CD62P Expression der Thrombozyten konnte durch die CsA Derivate NIM811 und MM284 in einer CyPA äquivalenten Konzentration aufgehoben werden.

Nachdem nachgewiesen wurde, dass es durch extrazelluläres CyPA zu einer Aktivierung der Thrombozyten kommt, wurde geschaut, ob dies auch *in vivo* eine Relevanz hat. Dafür wurden die Thrombozyten von C57BL/6J Mäusen *ex vivo* mit CyPA aktiviert und anschließend einer anderen C57BL/6J Maus i.v. appliziert. Nach der Applikation wurde die Karotis Communis der Maus ligiert und die adhärenen Thrombozyten via Videoaufnahmen analysiert. Dabei kam es zu einer signifikanten Erhöhung der adhärenen Thrombozyten an dem durch die Ligatur beschädigten Endothel. Ein signifikanter Unterschied konnte bereits nach 5 Minuten nachgewiesen werden ($344,5 \pm 62,75$ vs. $608,2 \pm 77,18$) und blieb bis zum Ende der Messung

nach 60 Minuten signifikant ($226 \pm 40,27$ vs. $592,3 \pm 18,9$), im Vergleich zu den unstimulierten Thrombozyten (Abbildung 3-3B).

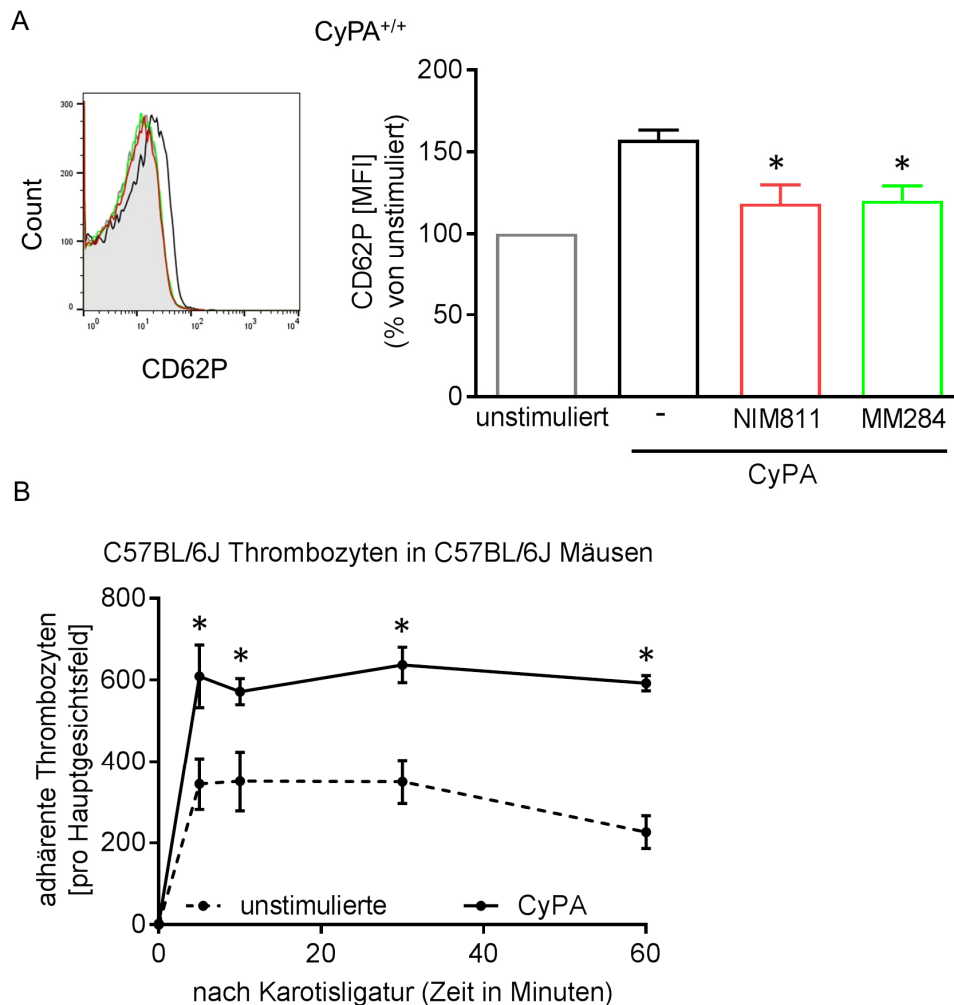


Abbildung 3-3 Extrazelluläres CyPA führt zur Aktivierung und Adhäsion von murinen Thrombozyten *in vitro*. Extrazelluläres CyPA führt zur Aktivierung von CyPA^{+/+} Thrombozyten. Die CyPA-abhängige Aktivierung kann durch die CsA-Derivate NIM811 und MM284 aufgehoben werden (A). CyPA aktivierte Thrombozyten von C57BL/6J Mäusen adhäreren vermehrt auf beschädigtem Endothel im Vergleich zu nicht aktivierten Thrombozyten (B). (modifiziert nach Seizer, von Ungern-Sternberg et al.)²¹

3.1.3. Einfluss von intrazellulärem CyPA auf die Aktivierung von murinen Thrombozyten

Wie in Abbildung 3-3 nachgewiesen kommt es durch extrazelluläres CyPA zu einer Aktivierung und Adhärenz von Thrombozyten. Dementsprechend wurde als nächstes untersucht, ob dieser Effekt unabhängig vom intrazellulären CyPA ist. Dafür wurden die Thrombozyten von CyPA^{-/-} Mäusen *ex vivo* mit CyPA aktiviert und anschließend in der

Durchflusszytometrie auf ihre CD62P Expression analysiert. Dabei kam es zu einer signifikanten Erhöhung der CD62P Expression auf den CyPA stimulierten Thrombozyten im Vergleich zu den unstimulierten Thrombozyten. Durch die CsA Derivate NIM811 und MM284 wurde die CyPA-abhängige Aktivierung der Thrombozyten signifikant reduziert. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen den zellgängigen NIM811 und dem nicht-zellgängigen MM284 (Abbildung 3-4A).

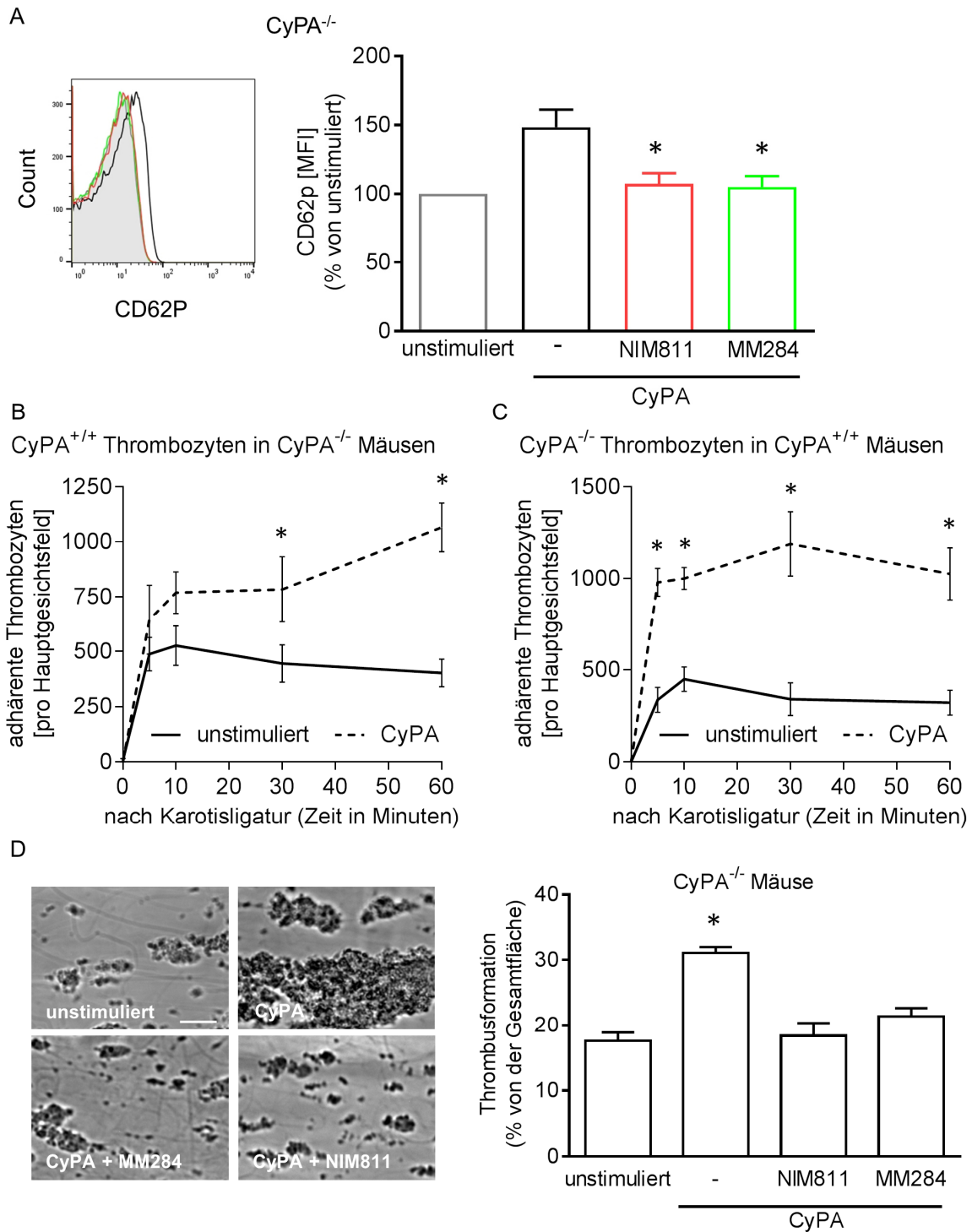


Abbildung 3-4 Extrazelluläres CyPA führt zur Aktivierung und Thrombusformation von murinen Thrombozyten *in vitro* und *in vivo*. Extrazelluläres CyPA führt zur Aktivierung von CyPA^{-/-} Thrombozyten. Die CyPA-abhängige Aktivierung kann durch die CsA-Derivate NIM811 und MM284 aufgehoben werden (A). Um zu zeigen, dass das intrazelluläre CyPA keine Rolle bei der Adhäsion von Thrombozyten spielt, wurde die Adhäsion von CyPA^{-/-} Thrombozyten in CyPA^{+/+} Mäusen (B) sowie die Adhäsion von CyPA^{+/+} Thrombozyten in CyPA^{-/-} Mäusen (C) in der Karotisligatur untersucht. Anschließend wurde die Thrombusformation von CyPA stimulierten CyPA^{-/-} auf Kollagen untersucht. Dabei kommt es zu einer vermehrten Thrombusbildung unter CyPA Einfluss, welches durch NIM811 und MM284 reduziert wird (D). Maßstab balken = 20 µm (modifiziert nach Seizer, von Ungern-Sternberg et al.)²¹

Nachdem der Effekt von extrazellulärem CyPA *in vitro* untersucht wurde, wurde der Effekt *in vivo* im Karotisligaturmodell analysiert. Dafür wurden zuerst die Thrombozyten von CyPA^{+/+} Mäusen *ex vivo* mit CyPA stimuliert und anschließend in eine CyPA^{-/-} Maus i.v. injiziert. Die stimulierten Thrombozyten haften vermehrt in dem durch die Ligatur beschädigten Bereich des Endothels im Vergleich zu unstimulierten Thrombozyten (Abbildung 3-4B). Wodurch davon auszugehen war, dass es durch das freigesetzte extrazelluläre CyPA zur Stimulation und Adhärenz von Thrombozyten kam und das endotheliale CyPA keine Rolle bei der Adhärenz der Thrombozyten spielt. Anschließend wurde der Einfluss von intrazellulären CyPA auf die Adhäsion von Thrombozyten in der Karotisligatur untersucht. Dabei wurden die Thrombozyten von CyPA^{-/-} Mäusen mit CyPA *ex vivo* stimuliert und CyPA^{+/+} Mäusen injiziert. Danach wurde die Karotis Communis ligiert und die adhärennten Thrombozyten auf dem beschädigten Endothel analysiert. Durch die Stimulation der Thrombozyten mit CyPA kam es zu einer signifikant erhöhten Adhärenz der Thrombozyten im Vergleich zu unstimulierten Thrombozyten (Abbildung 3-4C). Die *in vivo* Versuche zeigen, dass extrazelluläres CyPA Thrombozyten aktiviert und diese vermehrt auf beschädigtem Endothel haften. Dieser Prozess ist sowohl unabhängig vom intrazellulären CyPA als auch vom endotheliale intrazellulären CyPA.

Zuletzt wurde untersucht welche Rolle das extra- und intrazelluläres CyPA bei der *in vitro* Thrombusbildung hat. Dafür wurde CyPA^{-/-} Blut entnommen und dieses mit rekombinantem CyPA stimuliert. Anschließend wurde das Blut über eine Kollagenmatrix perfundiert. Dabei hat sich gezeigt, dass das Blut von CyPA^{-/-} Mäusen vermehrt Thromben auf einer Kollagenoberfläche bilden, wenn das Blut mit rekombinantem CyPA stimuliert wurde, im Vergleich zu unstimuliertem Blut. Dieser Effekt konnte durch eine Zugabe der CsA Derivate NIM811 und MM284 verhindert werden (Abbildung 3-4D).

3.2. Entwicklung eines spezifischen CyPA Antikörpers

3.2.1. Screening nach einem spezifischen CyPA Antikörper

In Abschnitt 3.1 wurde gezeigt, dass vor allem das extrazelluläre CyPA für die pro-thrombotischen Effekte verantwortlich ist. Diese pro-thrombotischen Effekte konnten durch die CsA Derivate aufgehoben werden. Daher war das nächste Ziel die Entwicklung eines spezifischen CyPA Antikörpers. Die Antikörper sollten an CyPA an der EMMPRIN-Bindungsstelle binden und damit die Bindung von CyPA an EMMPRIN verhindern. Die Bindungssequenz zwischen CyPA und EMMPRIN beginnt mit der TAKTE-Sequenz, also den Aminosäuren Threonin-Alanin-Lysin-Threonin-Glutaminsäure. Die dreidimensionale Struktur von CyPA wurde bereits im Jahr 1991 beschrieben^{54, 55}. Die erwartete Bindungsstelle von CyPA und EMMPRIN ist in blau hervorgehoben (Abbildung 3-5A). In Abbildung 3-5B wurde die Aminosäuresequenz von CyPA angegeben.

Um das Ziel zu erreichen einen spezifischen Antikörper gegen die CyPA-EMMPRIN Bindungssequenz zu entwickeln, wurden fünf verschiedene monoklonale CyPA Antikörper (TAKTE-monoklonale Antikörper; 7C2, 5A11, 1B7, 8E6, generiert in der Maus, und 8H7, generiert in der Ratte) generiert und auf ihre Bindungseigenschaften an rekombinantem CyPA im Western Blot getestet. Dafür wurde rekombinantes CyPA im Western Blot aufgetragen und anschließend mit den generierten Antikörpern detektiert. Alle Antikörper waren in der Lage rekombinantes CyPA zu detektieren (Abbildung 3-5C, obere Reihe). Im Anschluss wurde die Bindung der TAKTE Antikörper mit einem käuflichen CyPA-Antikörper bestätigt (Abbildung 3-5C, untere Reihe).

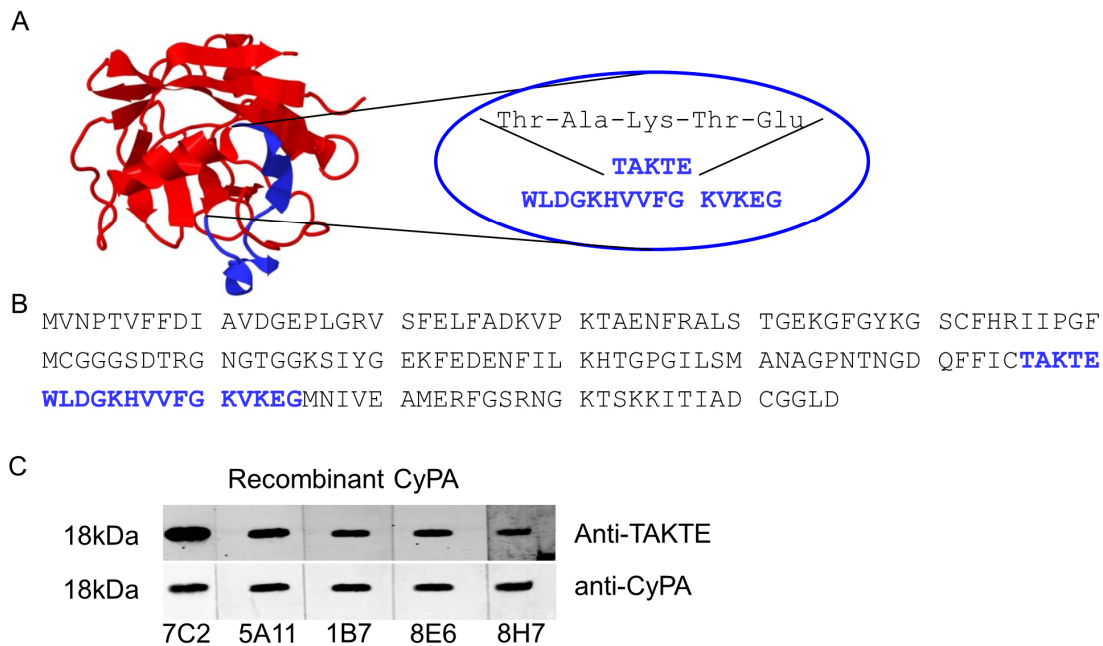


Abbildung 3-5 Entwicklung und Screening nach einem spezifischen CyPA Antikörper. Für die Generierung des Antikörpers wurde Mäusen und Ratten ein Peptid injiziert, welches an die

TAKTE-Sequenz auf CyPA (blau hervorgehoben) bindet (A). Der Bindungsbereich der Antikörper an die CyPA Sequenz wurde in Blau markiert. Alle TAKTE Antikörper wurde im Western Blot auf ihre Bindungseigenschaften auf rekombinantes CyPA getestet (C, obere Reihe) und die Bindung mit einem gekauften anti-CyPA Antikörper überprüft (C, untere Reihe). (publiziert in von Ungern-Sternberg et al.)⁵⁶

3.2.2. Funktionstest der CyPA Antikörper

Nachdem nachgewiesen wurde, dass alle Antikörper CyPA detektieren können, wurden die inhibitorischen Effekte der TAKTE-Antikörper in der Monozytenmigration getestet. Dafür wurden humane Monozyten isoliert und in die obere Kammer einer Boyden Chamber gegeben. CyPA und die Antikörper wurden in die untere Kammer gegeben. Wie Abbildung 3-6A zeigt, induzierte CyPA die Migration von Monozyten. Darüber hinaus waren alle getesteten Antikörper in der Lage die CyPA-induzierte Migration signifikant zu verringern.

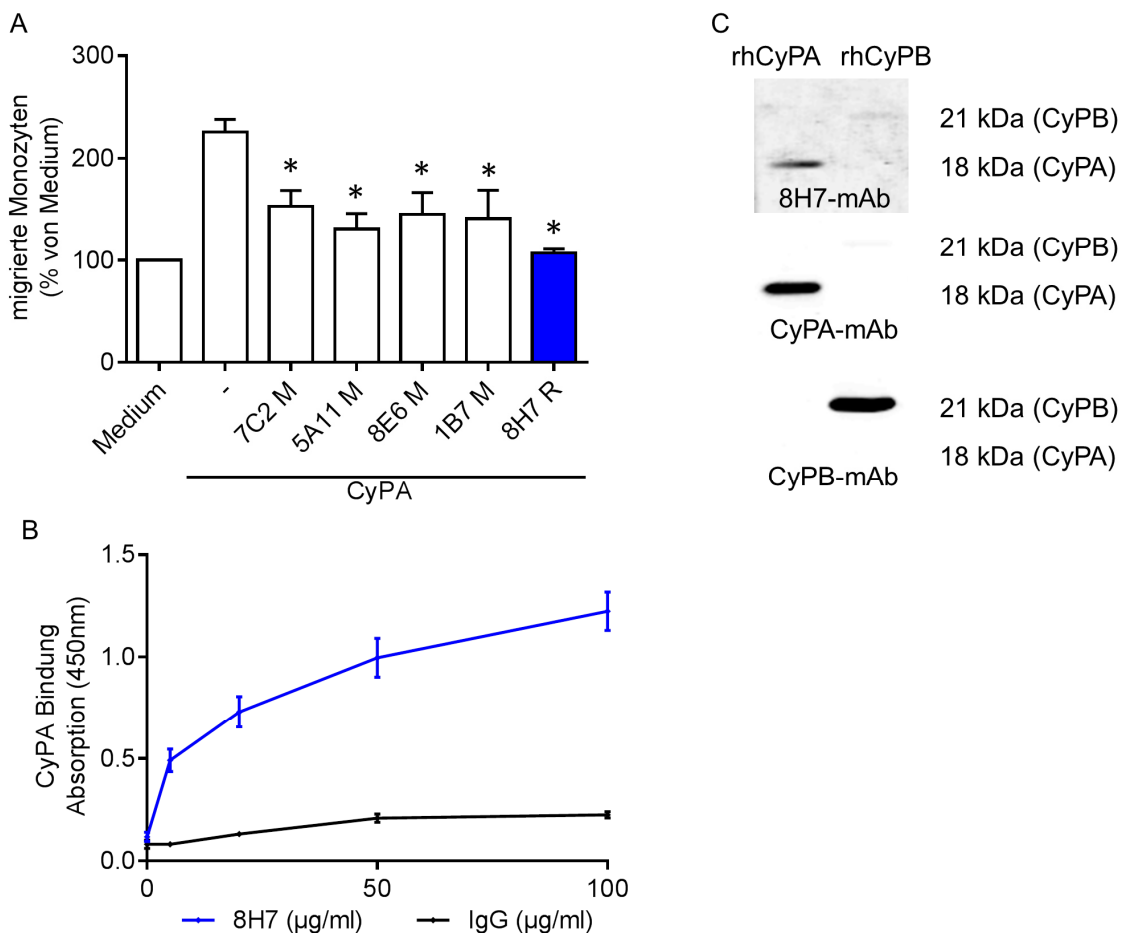


Abbildung 3-6 Funktionstest und Bindungsspezifität für die neu generierten CyPA Antikörper. (A) Die CyPA-abhängige Monozytenmigration konnte von allen Antikörpern signifikant reduziert werden. (B) In einem Bindungs-ELISA konnte gezeigt werden, dass 8H7-mAk an

CyPA bindet. Zwischen CyPA und der IgG fand keine Bindung statt. (C) 8H7-mAk bindet spezifisch an CyPA und kann rekombinantes CyPB im Western Blot nicht detektieren (oberste Reihe). Mit käuflich erwerbbaaren Antikörpern gegen CyPA und CyPB wurde die Anwesenheit CyPA/B auf der Western Blot Membran bestätigt (mittlere und untere Reihe). (modifiziert nach von Ungern-Sternberg et al.)⁵⁶

Da der Antikörper 8H7-mAk am besten im funktionellen Assay abgeschnitten hatte, wurde er für die weiteren Versuche ausgewählt. Als erstes wurde die spezifische Bindung an CyPA in einem Bindungs-ELISA überprüft. Dafür wurde eine Platte mit rekombinantem CyPA beschichtet und 8H7-mAk in einer Konzentrationsreihe darauf gegeben. Dadurch wurde eine konzentrationsabhängige Bindung von 8H7-mAk an rekombinantes CyPA nachgewiesen. Dagegen konnte keine Bindung zwischen CyPA und der IgG Kontrolle detektiert werden (Abbildung 3-6B). Um zu überprüfen ob 8H7-mAk auch an CyPB bindet, wurde die Bindung von 8H7-mAk an rekombinantes CyPA und CyPB im Western Blot überprüft. Dabei hat sich gezeigt, dass 8H7-mAk CyPA aber nicht CyPB detektieren konnte (Abbildung 3-6C, oberste Reihe). Die Anwesenheit von beiden Proteinen wurde durch einen käuflichen anti-CyPA (Abbildung 3-6C, mittlere Reihe) und anti-CyPB (Abbildung 3-6C, untere Reihe) Antikörper bestätigt.

3.2.3. Entzündungshemmende Effekt von 8H7-mAk in vitro

Im weiteren Verlauf der wurden die entzündungshemmenden Eigenschaften von 8H7-mAk *in vitro* und *in vivo* untersucht. Zuerst wurde das anti-inflammatorische Potenzial von 8H7-mAk untersucht. Dafür wurden humane Monozyten isoliert über mit aktivierten HUVECs beschichtete Deckgläser unter arterieller Geschwindigkeit perfundiert. Dabei kam es zu einem signifikanten Anstieg der adhärenen Monozyten durch eine Stimulation mit CyPA im Vergleich zu den unstimulierten Monozyten. Kein signifikanter Anstieg konnte dagegen bei den 8H7-mAk behandelten Monozyten im Vergleich zu den unstimulierten Monozyten festgestellt werden (Abbildung 3-7A).

Nachdem Nachweis das 8H7-mAk zu einer verminderten Adhärenz von Monozyten auf aktiviertem Endothel führt, wurde der Einfluss von 8H7-mAk auf die Migration von Monozyten untersucht. Dafür wurde erneut die Boyden Chamber verwendet und das CyPA in die untere Kammer gegeben sowie die Monozyten in die obere Kammer. Vor kurzem wurde gezeigt, das CyPA zur *in vitro* Migration von Monozyten führt¹³¹. Die bereits zuvor beschrieben kam es durch CyPA zu einer vermehrten Migration der Monozyten. Durch die Zugabe von 20µg/ml 8H7-mAk zum CyPA in die untere Kammer konnte die Migration der Monozyten verhindert werden. Es kam zu keinem signifikanten Anstieg der migrierten Monozyten im Vergleich zur Mediumkontrolle (Abbildung 3-7B).

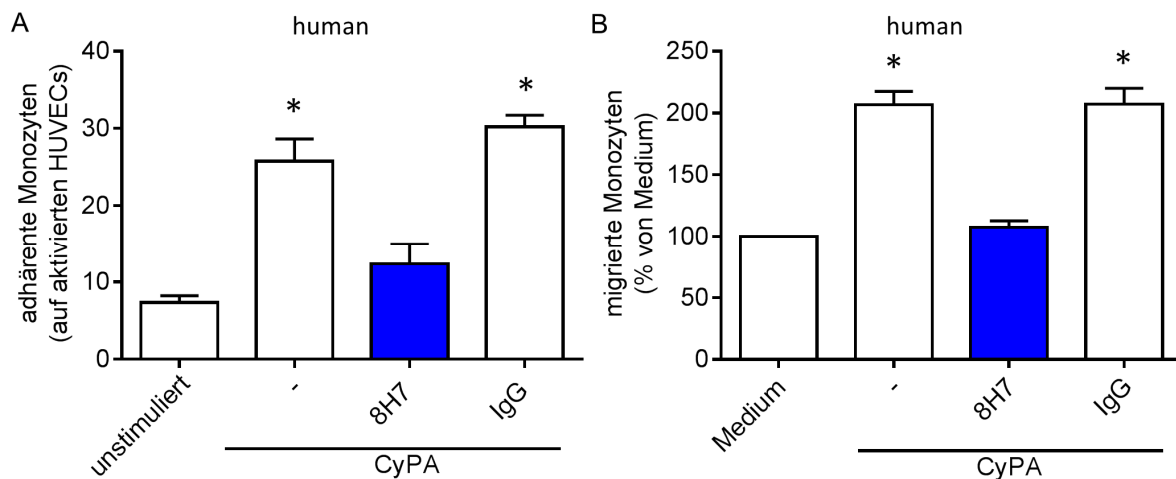


Abbildung 3-7 8H7-mAk hat einen entzündungshemmenden Effekt auf Monozyten *in vitro*. CyPA-aktivierte Monozyten adhären auf aktivierten HUVECs. Durch die Zugabe von 8H7-mAk findet keine signifikant erhöhte Bindung von Monozyten auf HUVECs statt (A). CyPA induziert die Migration von Monozyten *in vitro*, diese wird durch 8H7-mAk aufgehoben (B). (modifiziert nach von Ungern-Sternberg et al.)⁵⁶

3.2.4. 8H7-mAk hemmt die Infiltration von Zellen *in vivo*

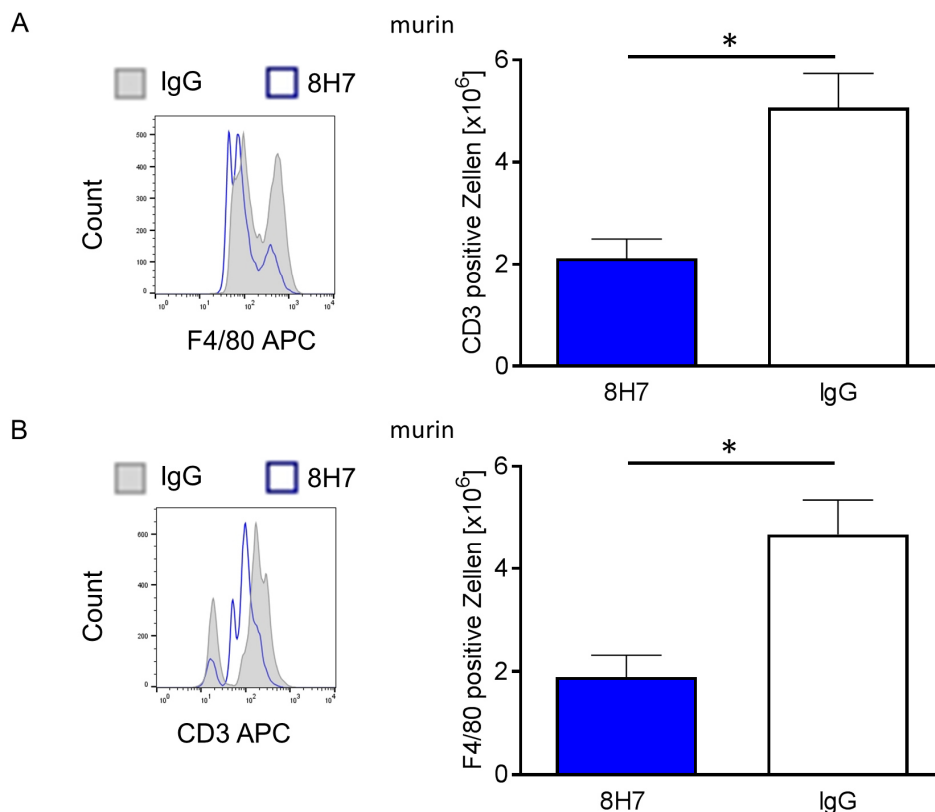


Abbildung 3-8 8H7-mAk hat einen entzündungshemmenden Effekt auf Monozyten *in vivo*. Im CyPA-vermittelten Peritonitismodell wurde die *in vivo* Migration untersucht. 8H7-mAk

behandelte Mäuse zeigen eine verringerte Infiltration von F4/80⁺ (A) und CD3⁺ (B) Zellen ins Peritoneum im Vergleich zu IgG behandelten Mäusen, mit repräsentativen Abbildungen. (modifiziert nach von Ungern-Sternberg et al.)⁵⁶

Nach der *in vitro* Migration wurde der Einfluss von 8H7-mAk auf die *in vivo* Migration bzw. Infiltration, im CyPA-induzierten Peritonitismodell untersucht. Dafür wurden bei den Mäusen durch eine i.p. Injektion mit CyPA eine Peritonitis ausgelöst. Durch die Injektion von 8H7-mAk zusammen mit dem CyPA kam es zu einer signifikanten Reduktion der F4/80⁺ Zellen im Vergleich zur IgG Kontrolle (4,7±0,67 vs. 1,9±0,43; Abbildung 3-8A). Darüber hinaus konnte auch die Infiltration von CD3⁺ Zellen ins Peritoneum durch 8H7-mAk signifikant verringert werden im Vergleich zur IgG behandelten Gruppe (5,1±0,67 vs. 2,1±0,37; Abbildung 3-8B). Dies deutet darauf hin, dass 8H7-mAk die CyPA-induzierten inflammatorischen Effekte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aufheben bzw. reduzieren kann.

3.2.5. 8H7-mAk reduziert die CyPA-vermittelte Thrombozytenaktivierung

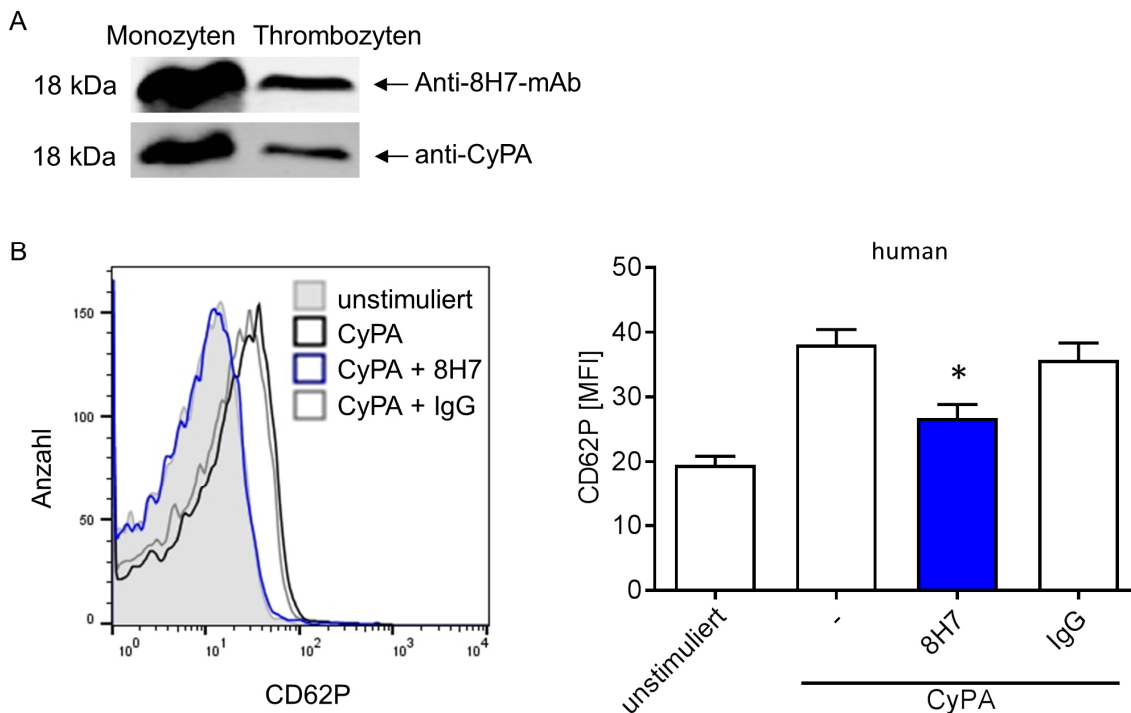


Abbildung 3-9 Die CyPA-abhängige Thrombozytenaktivierung wird durch 8H7-mAk gehemmt. Der Antikörper 8H7-mAk ist in der Lage CyPA sowohl im Monozyten- als auch im Thrombozytenlysat zu detektieren (A, obere Reihe). Mit einem gekauften anti-CyPA Antikörper wurde die Bindung bestätigt (A, untere Reihe). Die CyPA-abhängige Aktivierung von Thrombozyten wurde in der Durchflusszytometrie analysiert. Durch die Vorbehandlung

der Thrombozyten mit 8H7-mAk wird die CD62P Expression signifikant reduziert, mit repräsentativen Abbildungen (B). (modifiziert nach von Ungern-Sternberg et al.)⁵⁶

Da 8H7-mAk die CyPA-vermittelten Effekte von Monozyten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* reduzieren bzw. aufheben konnte, wurde im Western Blot überprüft, ob 8H7-mAk in der Lage ist sowohl das monozytäre als auch das thrombozytäre CyPA, im jeweiligen Lysat, zu detektieren. Dabei zeigte sich, dass 8H7-mAk nicht nur das rekombinante CyPA, wie in Abbildung 3-6 gezeigt, sondern auch CyPA im Thrombozyten- und Monozytenlysat detektieren kann (Abbildung 3-9A, obere Reihe). Die spezifische Bindung wurde mit einem käuflichen anti-CyPA Antikörper nachgewiesen (Abbildung 3-9A, untere Reihe). Durch den Nachweis der Interaktion von 8H7-mAk mit thrombozytärem CyPA wurde als nächstes der Einfluss von 8H7-mAk auf die CyPA-abhängige Thrombozytenaktivierung untersucht. Dafür wurden humane Thrombozyten isoliert und mit rekombinantem CyPA stimuliert. Anschließend wurde die CD62P Expression in der Durchflusszytometrie gemessen. Die Stimulation mit CyPA führt zu einem Anstieg der CD62P Expression auf der Thrombozytenoberfläche. 8H7-mAk reduziert die CyPA-abhängige CD62P Expression auf Thrombozyten signifikant im Vergleich zur IgG Kontrolle ($35,72 \pm 2,65$ vs. $26,76 \pm 2,1$; Abbildung 3-9B).

3.2.6. 8H7-mAk hat anti-thrombotische Effekte

Da die Aktivierung von Thrombozyten mit CyPA zur Bildung von Thromben führte, wurde als nächstes der Einfluss von 8H7-mAk in der CyPA-induzierten Thrombusformation untersucht. Wie bereits in Abschnitt 3.1 Abbildung 3-4 gezeigt führt extrazelluläres CyPA zur Bildung von Thromben auf einer Kollagenbeschichtung *in vitro*.

Nachdem gezeigt wurde, dass 8H7-mAk die Thrombozytenaktivierung inhibiert, wurde als nächstes untersucht, ob 8H7-mAk auch die Thrombusformation reduzieren kann. Um den Einfluss von 8H7-mAk auf die Entwicklung von Thromben *in vitro* zu untersuchen, wurde humanes Vollblut mit rekombinantem CyPA stimuliert und 8H7-mAk oder die IgG Kontrolle dazugegeben. Anschließend wurde das Blut über kollagenbeschichtete Deckgläser perfundiert. Wie auch schon in Abschnitt 3.1.1 und Abschnitt 3.1.3 beschrieben, kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Thrombusformation durch CyPA ($22,17 \pm 1,05$) bei einer Flussgeschwindigkeit von $1000 \text{ Sekunden}^{-1}$. Durch die Zugabe von 8H7-mAk ($16,4 \pm 0,51$) zu dem Blut kam es zu keinem Anstieg der Thrombusbildung auf Kollagen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ($16,41 \pm 0,89$; Abbildung 3-10A). Auch bei einer höheren Flussgeschwindigkeit von $1700 \text{ Sekunden}^{-1}$ kam es zu einem CyPA-vermittelten Anstieg in der Thrombusformation ($10,96 \pm 1,76$) im Vergleich zur unbehandelten Gruppe. Dagegen kam es durch eine Behandlung mit 8H7-mAk nicht zu einem Anstieg der CyPA-induzierte Thrombusformation. ($6,7 \pm 1,5$; Abbildung 3-10B).

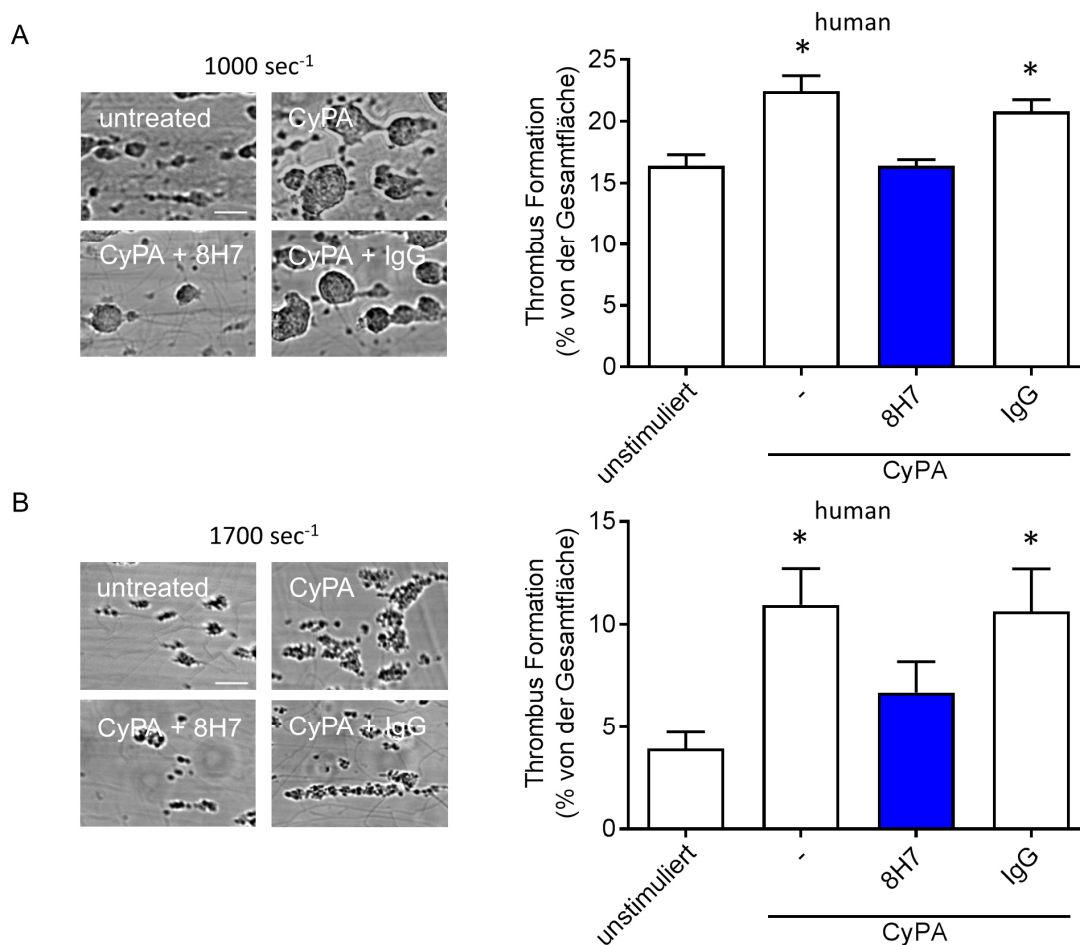


Abbildung 3-10 8H7-mAk verringert die Entstehung von Thromben. Humanes Vollblut wird über eine Kollagenmatrix gegeben. CyPA induziert dabei eine vermehrte Thrombusformation bei einer Flussgeschwindigkeit von 1000 Sekunden⁻¹. Bei der mit 8H7-mAk behandelten Gruppe ist dieser Effekt nicht zu sehen (A mit repräsentativen Abbildungen). Bei der höheren Flussgeschwindigkeit von 1700 Sekunden⁻¹ ist derselbe Effekt zu beobachten wie bei 1000 Sekunden⁻¹. Die CyPA-induzierte Thrombusformation wird durch 8H7-mAk reduziert (B mit repräsentativen Abbildungen). Maßstabbaken = 20 µm (modifiziert nach von Ungern-Sternberg et al.)⁵⁶

3.2.7. 8H7-mAk reduziert die Thrombusbildung *in vivo*

Da 8H7-mAk in der Lage ist die CyPA-induzierte Thrombusformation *in vitro* zu unterbinden. Wie es bereits in Abschnitt 3.1.3 gezeigt sowie in der Literatur beschrieben wurde, ist CyPA bei der Thrombusformation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beteiligt ist²¹. Aus diesem Grund wurde als nächstes der Einfluss von 8H7-mAk *in vivo* im FeCl₃ Modell untersucht. Dafür wurde das Mesenterium der Maus freigelegt und vom Fettgewebe befreit. Anschließend wurde ein mit FeCl₃ Lösung - getränktes Filterpapier auf die Arteriole gelegt um eine Verletzung des Gefäßes hervorzurufen. Durch ein Mikroskop wurde dann die Zeit bis

zum Verschluss des Gefäßes ermittelt. Durch die Behandlung mit 8H7-mAk erhöht sich die Zeit bis zum Verschluss des Gefäßes signifikant im Vergleich zur IgG Kontrolle bzw. es bildete sich kein Thrombus im Gefäß und der Blutfluss wurde bis zum Ende der Messzeit nach 40 Minuten nicht unterbrochen (1948±183,9 vs. 775.4±67,63 Sekunden; Abbildung 3-11C). Dagegen kam es bei jeder mit IgG behandelten Maus zu einem Verschluss des Gefäßes.

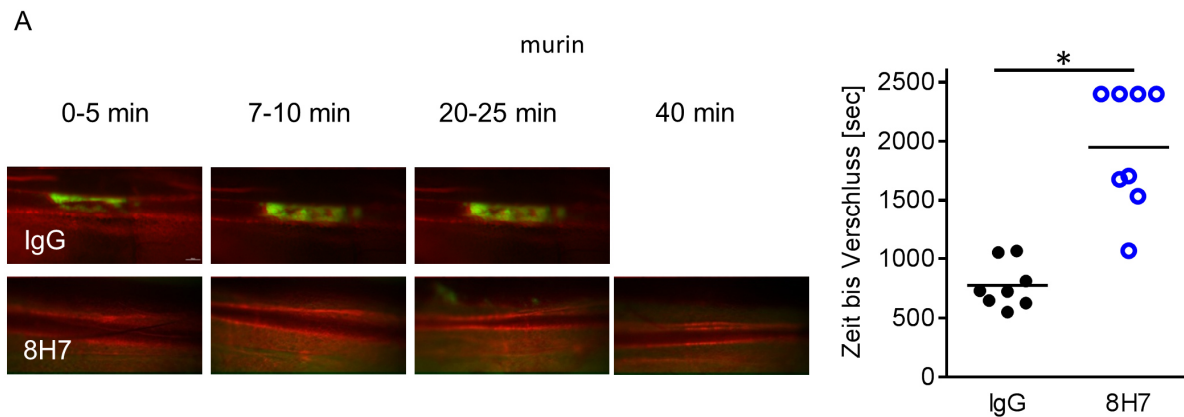


Abbildung 3-11 8H7-mAk verringert den Gefäßverschluss in vivo. (A) Neben der in vitro Thrombusformation wurde die Thrombusbildung auch in vivo im FeCl₃ Modell getestet, dabei entwickeln die IgG behandelten Mäuse schneller einen Gefäßverschluss als die mit 8H7-mAk behandelten Mäuse (mit repräsentativen Abbildungen). Maßstabballen = 50 µm (modifiziert nach von Ungern-Sternberg et al.)⁵⁶

3.2.8. 8H7-mAk hat keinen Einfluss auf Hämostaseparameter von Thrombozyten

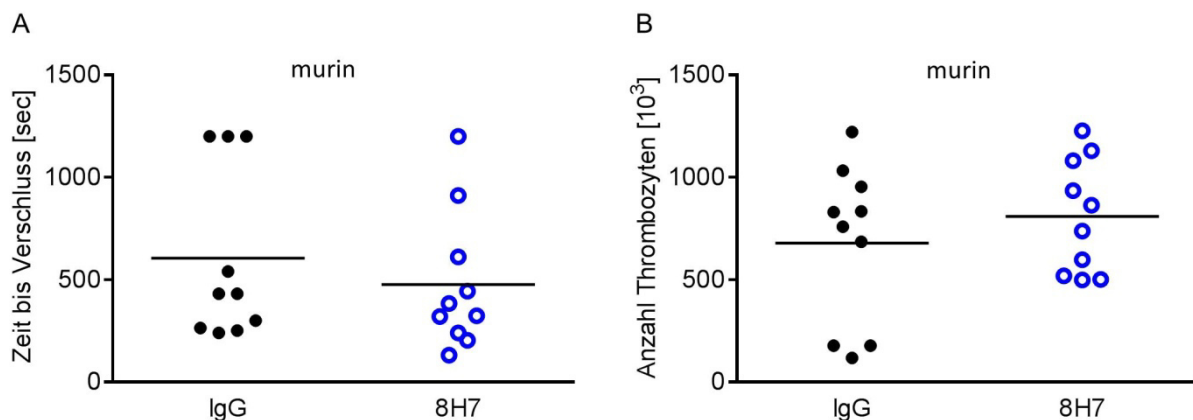


Abbildung 3-12 8H7-mAk hat keinen Einfluss Thrombozytenaktivität. Als nächstes wurde der Einfluss von 8H7-mAk auf die Thrombozytenhämostase getestet. Dafür wurde den Mäusen 8H7-mAk oder eine IgG Kontrolle i.v. appliziert und die Blutungszeit durch eine Schwanzspitzenresektion untersucht. Zwischen den Gruppen konnte weder ein Unterschied in

der Verschlusszeit (A) noch in der Anzahl der Thrombozyten (B) detektiert werden. (modifiziert nach von Ungern-Sternberg et al.)⁵⁶

Da in der Thrombusformation durch 8H7-mAk sowohl *in vitro* als auch *in vivo* signifikant reduziert wurde, wurde als nächstes der Einfluss von 8H7-mAk auf die Hämostase getestet. Dafür wurde die Schwanzblutungszeit von Mäusen nach der Injektion von 8H7-mAk oder der IgG Kontrolle untersucht. Für diesen Versuch wurden den Mäusen 3 mm der Schwanzspitze abgeschnitten und die Zeit, bis die Blutung stoppte, analysiert. Trotz des anti-thrombotischen Effekts in der Thrombusbildung schien 8H7-mAk keinen Einfluss auf die Blutungszeit, im Vergleich zur IgG Kontrolle, zu haben ($606 \pm 133,1$ vs. $477,2 \pm 107,4$; Abbildung 3-12A). Darüber hinaus wurde den Mäusen nach der i.v. Injektion von 8H7-mAk retrobulbär Blut entnommen und die Anzahl der Thrombozyten bestimmt. Dabei konnte kein Unterschied in der Anzahl der Thrombozyten zwischen der IgG und der 8H7-mAk Gruppe festgestellt werden ($679,1 \pm 123,2$ vs. $809,7 \pm 88$; Abbildung 3-12B).

3.3. CyPA ist ein neuer Ligand des „Receptor for advanced glycation endproducts“ (RAGE)

3.3.1. RAGE und CD147 / CyPA sind auf der Oberfläche von Monozyten kolokalisiert

Hibino et al haben 2012 nachgewiesen, dass S100A9 als Bindungspartner von CD147 agieren kann¹⁰¹. S100A9 gehört zu den DAMPs, zu denen auch CyPA gezählt werden kann. Einer der Bindungspartner von S100A9 ist der Rezeptor RAGE. Daher wurde zunächst nach einer Kolokalisation der Rezeptoren RAGE und CD147 sowie einer möglichen Bindung zwischen CyPA und RAGE, mittels konfokaler Mikroskopie, geschaut. Dafür wurden humane Monozyten mit CyPA stimuliert und anschließend auf RAGE (grün) und CD147 (rot) gefärbt. Die Überlagerung der Farben zeigt, dass die Rezeptoren kolokalisiert sein könnten (Abbildung 3-13A). CD147 ist der bis jetzt einzige bekannte Rezeptor für extrazelluläres CyPA. Da es eine Kolokalisation zwischen RAGE und CD147 zu geben schien, wurde als nächstes, ebenfalls mittels konfokaler Mikroskopie, untersucht, ob es auch eine Kolokalisation zwischen extrazellulärem CyPA und RAGE gibt. Da sich die Farben überlagern, schien dies der Fall zu sein (Abbildung 3-13B; CyPA: rot, RAGE: grün). Nachdem eine mögliche Interaktion von RAGE und CyPA, mittels Mikroskopie, nachgewiesen wurde, wurde als nächstes die direkte Interaktion von RAGE und CyPA mit einem modifizierten CyPA-RAGE-Bindungs-ELISA überprüft. Dafür wurde eine 96-Well Platte mit RAGE-Fc und Fc beschichtet und anschließend CyPA in verschiedenen Konzentrationen auf das RAGE-Fc und Fc gegeben. Dabei zeigt sich, dass es eine Konzentrationsabhängige Bindung von CyPA an RAGE-Fc gibt (Abbildung 3-13C, rote Kurve). Dagegen konnte keine Bindung von CyPA an Fc detektiert werden (Abbildung 3-13C, schwarze Kurve). Nach dem Nachweis der Interaktion von CyPA und RAGE wurde nun die Interaktion mit RAGE CHO Zellen überprüft. Dafür wurden RAGE CHO und Neo CHO Zellen auf ihre RAGE Expression im Western Blot untersucht. Dabei zeigte sich, dass die RAGE CHO Zellen RAGE auf ihrer Oberfläche exprimieren (Abbildung 3-13D, linke Bande) wogegen dies bei den Neo CHO Zellen nicht der Fall war (Abbildung 3-13D, rechte Bande). Als nächstes wurde mit den CHO Zellen die Interaktion mit CyPA überprüft. Dafür wurden Deckgläser mit CyPA bzw. BSA beschichtet und die RAGE CHO und Neo CHO Zellen unter Flussgeschwindigkeiten darüber perfundiert. Dabei zeigte sich, dass die RAGE CHO Zellen signifikant höher über die CyPA beschichteten Deckgläser rollen im Vergleich zu den mit BSA beschichteten Deckgläsern. Durch eine Inhibierung des CyPA durch das CsA MM284 auf den Deckgläsern kam es ebenfalls zu einer signifikanten Verringerung der rollenden RAGE CHO Zellen auf den Deckgläsern im Vergleich zu den CyPA beschichteten Deckgläsern (Abbildung 3-13E, graue Balken). Im Gegensatz mit den RAGE CHO Zellen kam es bei den Neo CHO Zellen nicht zu einem signifikanten Anstieg der rollenden Zellen auf den CyPA beschichteten Deckgläsern im Vergleich zu den BSA beschichteten Deckgläsern. Dementsprechend zeigte auch eine Blockierung von CyPA mit MM284 keinen Effekt auf die Anzahl der rollenden Neo CHO Zellen (Abbildung 3-13E, weiße Balken).

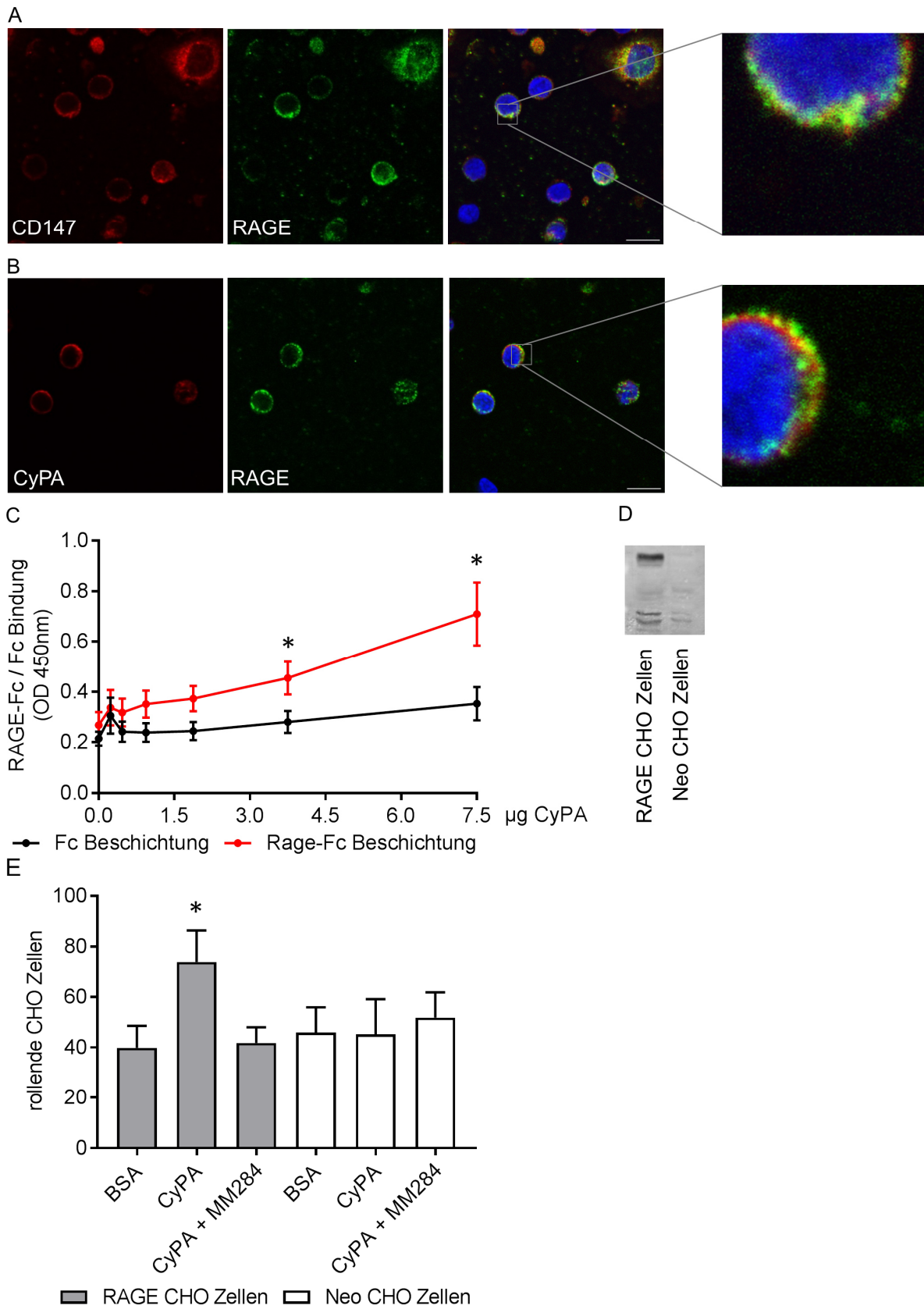


Abbildung 3-13 Kolokalisation und Bindung von CyPA / CD147 an RAGE. (A) Die Fluoreszenzbilder zeigten, dass CD147 und RAGE kolokalisiert sind. CD147 wurde in rot

angefärbt und RAGE in grün. (B) Darüber hinaus schien auch CyPA mit RAGE Co-lokalisiert zu sein. CyPA ist in rot angefärbt und RAGE in grün. (C) Als nächstes wurde die Bindung von CyPA und RAGE in einem Bindungs-ELISA nachgewiesen. Die rote Linie zeigt die Bindung von CyPA und RAGE-Fc und die schwarze Linie zeigt die Bindung von CyPA and Fc. (D) Im Western Blot wurde die Anwesenheit von RAGE in RAGE CHO Zellen und Neo CHO Zellen überprüft. (E) Danach wurde in der Flusskammer die Interaktion von CyPA und RAGE unter Flussbedingungen untersucht. Die grauen Balken zeigen die Interaktion der RAGE CHO Zellen an die CyPA bzw. BSA beschichteten Deckgläser und die weißen Balken zeigen die Interaktion der Neo CHO Zellen mit den beschichteten Deckgläsern. Maßstab Balken = 10 μ m

3.3.2. Die CyPA-vermittelten Adhärenz und Migration von Monozyten geht über die Rezeptoren RAGE und CD147

Nachdem gezeigt wurde, dass es eine Kolo-kalisation zwischen CyPA und RAGE gibt, wurde als nächstes geschaut ob CyPA auch funktionell mit RAGE interagiert. Zuerst wurde dafür die Adhärenz von Monozyten in der statischen Adhäsion auf rekombinalem CyPA getestet. Dafür wurden zuerst die humanen Monozyten aus Vollblut isoliert. Danach wurden die Monozyten mit den neutralisierenden Antikörpern gegen CD147 und RAGE vorbehandelt. Anschließend durften die Monozyten auf CyPA adhären. Die Monozyten adhärten vermehrt auf CyPA, durch die Neutralisierung der Rezeptoren CD147 und RAGE wird die Anzahl der adhärenen Monozyten signifikant reduziert, im Vergleich zur IgG Kontrolle ($20,72 \pm 2,59$ vs. $8,56 \pm 0,77$ vs. $8,63 \pm 0,82$). Eine Neutralisierung von beiden Rezeptoren ($7,93 \pm 0,55$) führte zu keiner weiteren Reduktion der adhärenen Monozyten auf rekombinalem CyPA (Abbildung 3-14A). Nachdem nachgewiesen wurde, dass CyPA über RAGE zu einer erhöhten Adhärenz von Monozyten führte, wurde als nächstes geschaut, ob die Interaktion von CyPA und RAGE auch in der dynamischen Adhäsion von Monozyten, also unter Flussgeschwindigkeit, eine Rolle spielt. Dafür wurden humane Monozyten isoliert und mit LPS stimuliert bzw. zusätzlich mit neutralisierenden Antikörpern gegen CD147 und RAGE behandelt. Danach wurden die Monozyten unter Flussgeschwindigkeit über rekombinantes CyPA perfundiert. Durch eine Neutralisation der Rezeptoren CD147 und RAGE kam es zu einer signifikanten Reduktion von adhärenen Monozyten im Vergleich zur IgG Kontrolle ($2,1 \pm 0,32$ vs. $0,72 \pm 0,13$ vs. $0,64 \pm 0,14$; Abbildung 3-14B). Als nächstes wurde untersucht, ob CyPA stimulierte Monozyten eine höhere Adhäsion auf aktiviertem Endothel zeigen und dieser Effekt durch eine Neutralisierung der Rezeptor RAGE und CD147 reduziert werden kann. Zuerst wurden dafür die humanen Monozyten aus Vollblut isoliert und mit neutralisierenden Antikörpern gegen RAGE und CD147 vorbehandelt. Danach wurden die Monozyten mit CyPA stimuliert und über TNF α und INF γ aktivierte HUVECs perfundiert. Durch die Vorbehandlung der Monozyten mit anti-CD147, anti-RAGE oder beiden Antikörpern kam es zu einer deutlichen Reduktion der adhärenen Monozyten im Vergleich zur IgG Kontrolle. Bei einer Verwendung beider Antikörper kam es zu keiner weiteren Reduktion der adhärenen Monozyten im Vergleich zur Neutralisierung von nur einem

Rezeptor (Abbildung 3-14C). Durch den Nachweis, dass die CyPA-abhängige Adhäsion von Monozyten über die Rezeptoren RAGE und CD147 vermittelt wurde, wurde als nächstes analysiert, ob auch beide Rezeptoren an der CyPA-induzierte Migration beteiligt waren. Als erstes wurden für diesen Versuch humane Monozyten isoliert und mit den Antikörpern anti-CD147, anti-RAGE und anti-TLR4 inkubiert. Anschließend wurden die Monozyten in die obere Kammer der Boyden Chamber gegeben und das CyPA in die untere Kammer. Nach der Migration wurden die Zellen im Filter analysiert. Die CyPA-induzierte die Migration von Monozyten wurde bereits beschrieben¹³¹. Auch wir konnten dies zeigen. Daneben kam es durch eine Neutralisierung der Rezeptoren CD147 und RAGE zu einer verminderten Migration der Monozyten zu CyPA im Vergleich zur IgG Kontrolle. Dagegen konnte eine Neutralisierung des TLR4 Rezeptors nicht zu einer Reduktion der CyPA-abhängigen führen im Vergleich zur IgG Kontrolle (Abbildung 3-14D).

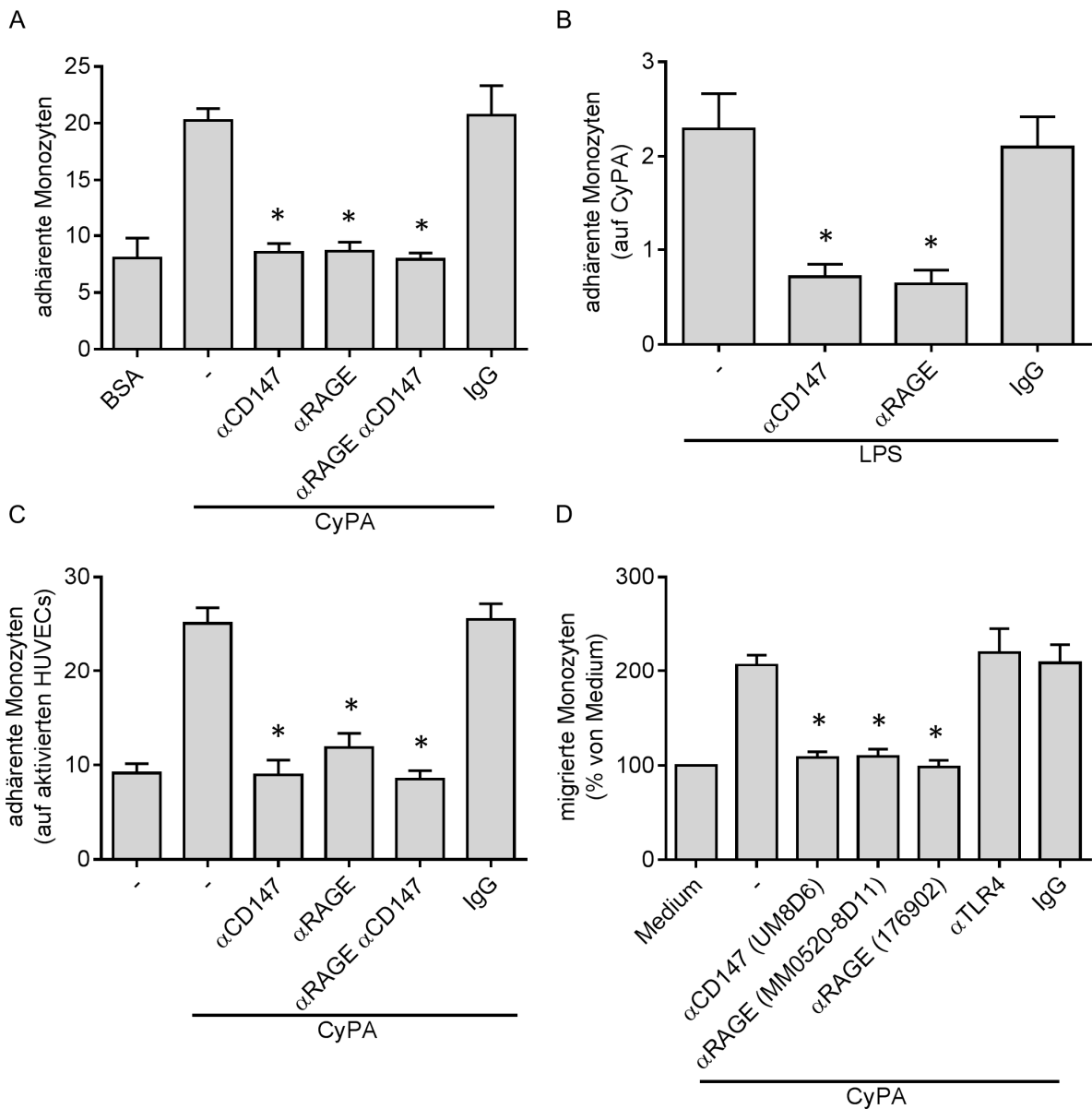


Abbildung 3-14 Die Adhärenz und Migration von Monozyten wurde über die Rezeptoren RAGE und CD147 reguliert. Humane Monozyten adhärten auf rekombinanten CyPA in der statischen Adhäsion. Diese Adhärenz konnte durch eine Neutralisierung von RAGE, CD147 oder beider Rezeptoren verhindert werden (A). Unter Flussgeschwindigkeit adhärten humane LPS-stimulierte Monozyten auf rekombinanten CyPA. Eine Neutralisierung der Rezeptoren CD147 oder RAGE verhinderte die Adhärenz (B). In der dynamischen Adhäsion adhärten CyPA-stimulierte Monozyten auf aktivierten HUVECs. Durch die Neutralisierung von CD147 und RAGE adhärten weniger Monozyten (C). Als nächstes wurde die CyPA-abhängige Monozyten Migration untersucht. CyPA fördert die Migration von Monozyten (D).

3.3.3. CyPA induziert die Adhäsion und Migration von Monozyten über die Bindung an RAGE in vitro

Nachdem mit Antikörpern gegen RAGE und CD147 an humanem Blut gezeigt werden konnte, dass CyPA über die Interaktion mit RAGE die Adhäsion und Migration von Monozyten fördert, wurde als nächstes die Bindung von CyPA und RAGE im murinen System untersucht. Dafür wurde zunächst in der statischen Adhäsion die Adhärenz von murinen Leukozyten auf rekombinanten CyPA untersucht. Dafür wurden die Leukozyten aus dem Knochenmark der Mäuse isoliert und anschließend in eine mit CyPA bzw. BSA beschichtete 96 Well Platte gegeben. Nach Entfernung der nicht-adhärenen Leukozyten wurden Bilder von den adhärenen Leukozyten gemacht und ausgewertet. Dabei konnte, wie in Abbildung 3-15A zu sehen, gezeigt werden, dass Leukozyten von RAGE^{+/+} Mäusen eine signifikant höhere Adhärenz auf rekombinanten CyPA zeigen als auf BSA. Leukozyten von RAGE^{-/-} Mäusen dagegen adhären nicht vermehrt auf rekombinanten CyPA im Vergleich zu BSA. Zwischen den RAGE^{+/+} und den RAGE^{-/-} Mäusen konnte kein Unterschied bei der Adhäsion auf BSA gefunden werden. Allerdings gab es einen signifikanten Unterschied bei der Adhäsion zwischen den RAGE^{+/+} und den RAGE^{-/-} Mäusen auf rekombinanten CyPA. Nach der statischen Adhäsion wurde als nächstes wurde das Verhalten der Leukozyten von RAGE^{+/+} und den RAGE^{-/-} Mäusen in der dynamischen Adhäsion über rekombinantes CyPA untersucht. Dafür wurden Leukozyten aus dem Knochenmark von RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Mäusen isoliert und über mit CyPA und BSA beschichtete Deckgläser perfundiert. Dabei zeigte sich, dass die Leukozyten von RAGE^{+/+} Mäusen signifikant vermehrt über CyPA rollen im Vergleich zu BSA. Allerdings war dies bei Leukozyten von RAGE^{-/-} Mäusen nicht der Fall. Dort gab es keine Erhöhung der rollenden Leukozyten über CyPA im Vergleich zu BSA. Darüber hinaus gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den Leukozyten von RAGE^{-/-} Mäusen und den Leukozyten von RAGE^{+/+} Mäusen. Die Leukozyten von RAGE^{+/+} Mäusen rollen signifikant höher über die CyPA beschichteten Deckgläser als die Leukozyten der RAGE^{-/-} Mäuse (Abbildung 3-15B).

Um zu untersuchen, ob die Interaktion von CyPA und RAGE auch einen inflammatorischen Effekt hat, wurde als nächstes das Migrationsverhalten von RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-}

Leukozyten in der *in vitro* Migration untersucht. Dafür wurden wie auch für die statische und dynamische Adhäsion die Leukozyten aus murinem Knochenmark verwendet. Dabei konnte in der Boyden Chamber Migration gezeigt werden, dass die Leukozyten von RAGE^{+/+} vermehrt zu rekombinantem CyPA migrierten im Vergleich zur Mediumkontrolle. Im Gegensatz dazu kam es zu keiner vermehrten Migration der Leukozyten von RAGE^{-/-} Mäusen im Vergleich zur Mediumkontrolle. Des Weiteren war die CyPA-induzierte Migration der Leukozyten von RAGE^{+/+} Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu den Leukozyten der RAGE^{-/-} Mäuse (Abbildung 3-15C). Um zu bestätigen, dass es sich um eine CyPA-RAGE-initiierte Migration von Leukozyten handelte, wurde die Migration mit den Leukozyten von MyD88^{+/+} und MyD88^{-/-} Mäusen wiederholt. Dafür wurden ebenfalls die Leukozyten aus murinem Knochenmark verwendet. Wie auch schon in der Migration mit RAGE^{+/+} Mäusen kam es auch bei den MyD88^{+/+} Mäusen zu einer verstärkten Migration der Leukozyten zu rekombinantem CyPA. Wie auch schon in der Migration mit den RAGE^{-/-} Mäusen kam es bei der Migration mit MyD88^{-/-} ebenfalls nicht zur Migration der Leukozyten im Vergleich mit der Mediumkontrolle. Darüber hinaus wurde der Einfluss von SDF1 α auf die Migration von MyD88^{+/+} und MyD88^{-/-} Leukozyten untersucht. Dabei war zu sehen, dass sowohl die Leukozyten von MyD88^{+/+} als auch die Leukozyten MyD88^{-/-} zu SDF1 α migrieren im Vergleich zu dem Mediumkontrollen (Abbildung 3-15D).

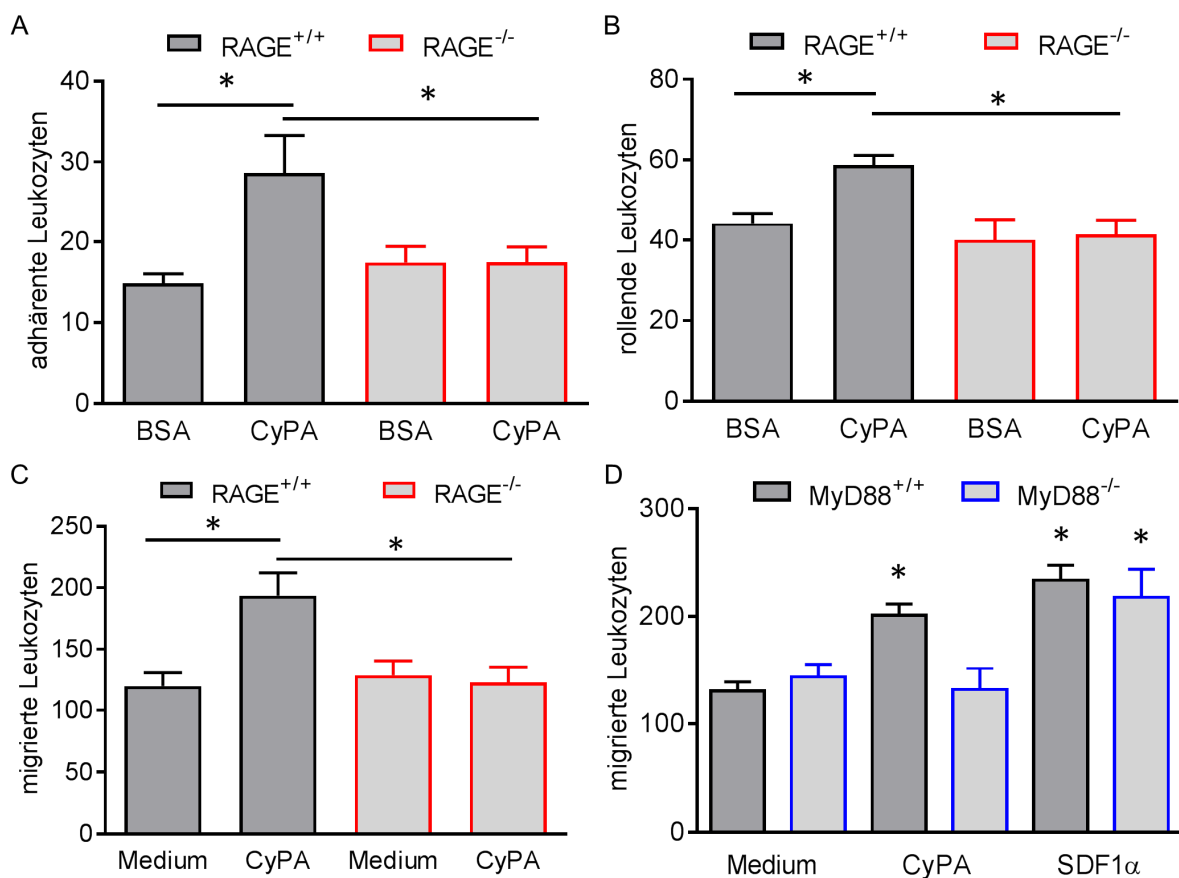


Abbildung 3-15 RAGE ist an der CyPA-vermittelten Entzündungsreaktion beteiligt. Leukozyten von RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Mäusen wurden aus dem Knochenmark isoliert und im

statischen Adhäsionsassay auf ihre Bindung an CyPA getestet (A). Als nächstes wurde untersucht inwiefern die Leukozyten in der Flusskammer über CyPA beschichteten Deckgläsern rollen (B). CyPA-induzierte die Migration von $RAGE^{+/+}$ Leukozyten, allerdings nicht von $Rage^{-/-}$ Leukozyten (C). Zur Überprüfung wurde die CyPA- und $SDF1\alpha$ -induzierte Migration bei $MyD88^{+/+}$ und $MyD88^{-/-}$ Mäusen analysiert (D).

3.3.4. Die CyPA-vermittelt Infiltration von inflammatorischen Zellen involviert den AGE-Rezeptor

Nach der *in vitro* Migration wurde die CyPA-induzierte *in vivo* Migration in $RAGE^{+/+}$ und $RAGE^{-/-}$ getestet. Dafür wurde bei $RAGE^{+/+}$ und $RAGE^{-/-}$ Mäusen eine Peritonitis mittels einer i.p. Injektion von CyPA ausgelöst. Durch das injizierte CyPA kam es nach 24 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der $CD11b^+$ und $CD3^+$ Zellen im Peritoneum bei $RAGE^{+/+}$ Mäusen im Vergleich zu $RAGE^{-/-}$ Mäusen. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den $RAGE^{+/+}$ und $RAGE^{-/-}$ Mäusen bei den $F4/80^+$ Zellen verzeichnet werden in der 24 Stunden Peritonitis (Abbildung 3-16A). Nach der 24 Stunden CyPA-induzierten Peritonitis wurde der Versuch in einer 48-Stunden CyPA-induzierten Peritonitis wiederholt. Wie schon nach 24 Stunden kam es auch nach 48 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der $CD11b^+$ und $CD3^+$ Zellen im Peritoneum bei den $RAGE^{+/+}$ Mäusen im Vergleich zu den $RAGE^{-/-}$ Mäusen. Im Gegensatz zur 24 Stunden CyPA-induzierten Peritonitis kam es nach 48 Stunden ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der $F4/80^+$ Zellen im Peritoneum der $RAGE^{+/+}$ Mäusen im Vergleich zu den $RAGE^{-/-}$ Mäusen (Abbildung 3-16B).

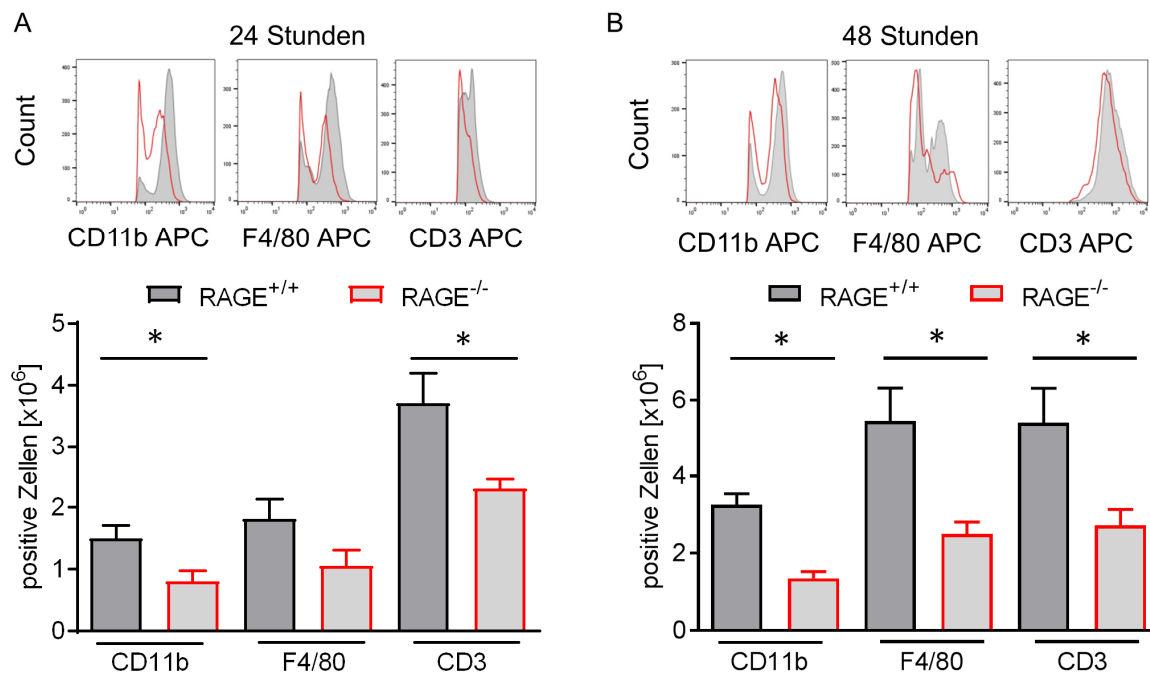


Abbildung 3-16 CyPA vermittelt die Infiltration von Zellen *in vivo*. Nach der *in vitro* Migration wurde die *in vivo* Infiltration von $CD11b^+$, $F4/80^+$ und $CD3^+$ Zellen in $RAGE^{+/+}$

und *Rage*^{-/-} Mäusen im Peritonitis Modell nach 24 Stunden (E) und 48 Stunden (F) untersucht.

3.3.5. CyPA induziert pro-thrombotische Effekte über die Bindung an den RAGE

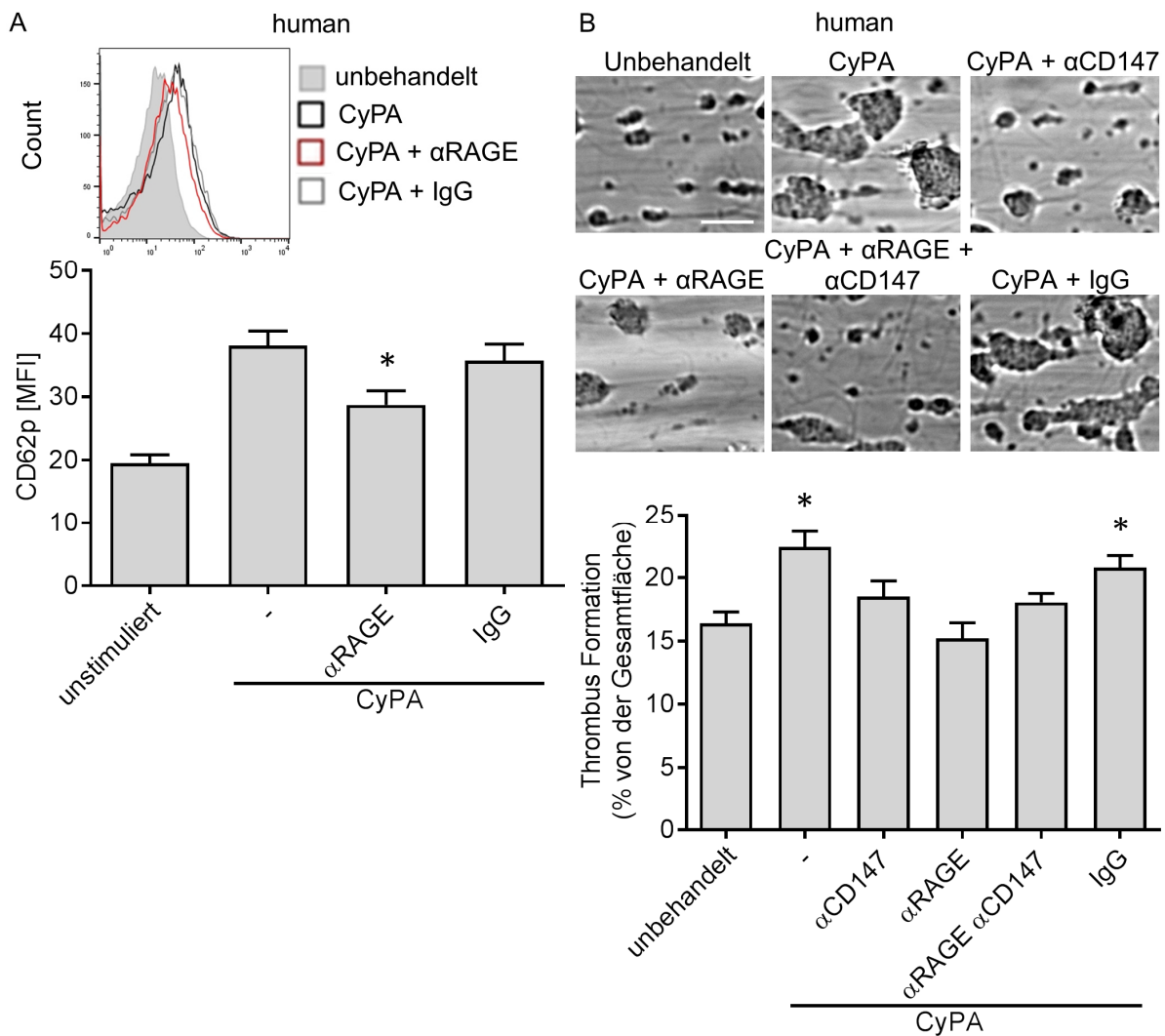


Abbildung 3-17 Eine Inhibierung von RAGE konnte die pro-thrombotischen Effekte von CyPA reduzieren. Die Expression von CD62P nach der Stimulation von CyPA mit oder ohne RAGE Inhibitor wurde in der Durchflusszytometrie analysiert, mit repräsentativen Abbildungen (A). Die CyPA induzierte Thrombusbildung von humanem Blut wurde in vitro in der Flusskammer untersucht, in Gegenwart der Antikörper CD147 und RAGE, mit repräsentativen Abbildungen (B). (Maßstab Balken = 20 μ m)

Durch eine Aktivierung von Thrombozyten durch CyPA kommt es zur Expression von CD62P auf der Oberfläche der Thrombozyten. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob eine Inhibierung von RAGE mit einem anti-RAGE Antikörper in der Lage ist die CyPA-abhängige Degranulation von Thrombozyten zu verhindern. Zuerst wurde von gesunden Personen Blut entnommen und die Thrombozyten isoliert. Anschließend wurden die Thrombozyten mit CyPA aktiviert bzw. vorher mit einem anti-RAGE Antikörper behandelt. Dabei konnten wir zeigen, dass durch die Vorbehandlung der Thrombozyten mit einem anti-RAGE Antikörper, die CyPA-induzierte CD62P Expression reduziert werden konnte, im Vergleich zur IgG Kontrolle ($28,71 \pm 2,25$ vs. $35,72 \pm 2,65$) (Abbildung 3-17A). Eine Aktivierung von Thrombozyten mit CyPA führte zur Bildung von Thromben auf einer Kollagenmatrix, wie bereits in Abbildung 3-4 und Abbildung 3-10 beschrieben. Darum wurde als nächstes die CyPA-vermittelte Bildung von Thromben *in vitro* untersucht, mit Antikörpern gegen CD147 und RAGE. Dafür wurde humanes Vollblut mit CyPA stimuliert und mit Antikörpern gegen CD147, RAGE oder beides vorbehandelt. Im Anschluss wurde dann das Blut über kollagenbeschichtete Deckgläser perfundiert. Dabei kam es durch die Stimulation der im humanen Vollblut vorkommenden Thrombozyten durch rekombinantes CyPA zu einer Erhöhung der Thrombusbildung auf Kollagen im Vergleich zum unbehandelten Blut. Durch eine Neutralisierung der Rezeptoren RAGE und kam es nicht zu einer erhöhten Thrombusbildung ($15,22 \pm 1,23$ vs. $18,54 \pm 1,23$ vs. $22,44 \pm 1,26$) im Vergleich zum unbehandelten Blut. Eine Neutralisierung von beiden Rezeptoren ($18,05 \pm 0,72$) führte zu keiner weiteren Reduktion der Thrombusbildung im Vergleich zu den Antikörpern anti-CD147 und anti-RAGE alleine. (Abbildung 3-17B).

3.3.6. RAGE-defiziente Mäuse bilden nach CyPA Stimulation keine Thromben auf einer Kollagenmatrix

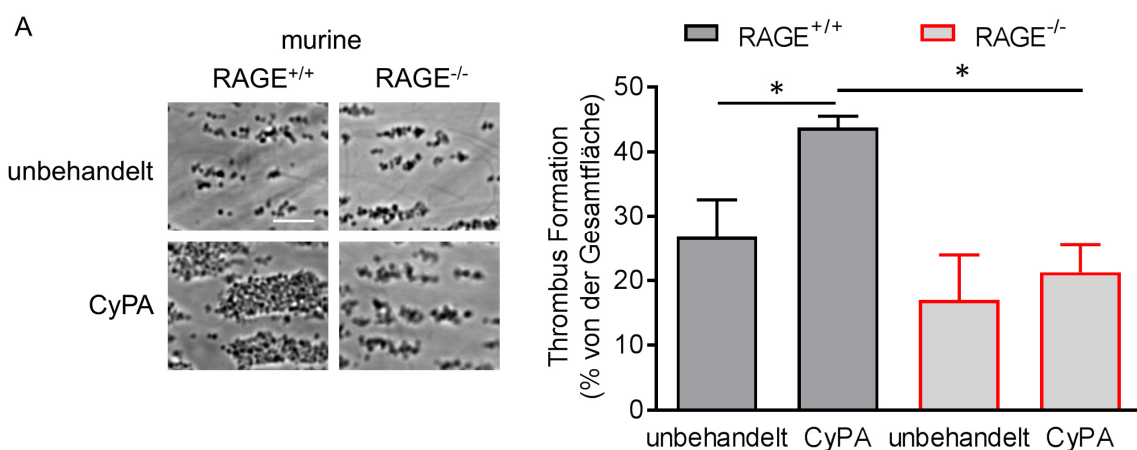


Abbildung 3-18 CyPA induziert über den AGE-Rezeptor pro-thrombotische Effekte. Murines Vollblut von RAGE^{+/+} Mäusen welches mit CyPA stimuliert wurde bildet vermehrt Thromben auf einer Kollagen beschichteten Oberfläche. Dagegen kommt es zu keiner vermehrten Thrombusbildung von CyPA-stimuliertem Vollblut von RAGE^{-/-} Mäusen auf einer

Kollagenmatrix. Beides in Vergleich zu unstimuliertem Vollblut, mit repräsentativen Abbildungen. (Maßstab Balken = 20 µm)

Als nächstes wurde die Thrombusformation von RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Mäusen nach CyPA Stimulation untersucht. Dafür wurde den Mäusen retrobulbär Blut entnommen, mit CyPA stimuliert und über eine Kollagenmatrix perfundiert. Dabei kam es bei CyPA stimuliertem Blut von RAGE^{+/+} Mäusen zu einer vermehrten Thrombusbildung im Vergleich zu unbehandeltem Vollblut von RAGE^{+/+} Mäusen (43,77±1,75 vs. 26,78±5,82). Im Gegensatz dazu kam es bei den RAGE^{-/-} Mäusen durch die Stimulation mit CyPA nicht zu einer vermehrten Thrombusbildung des Blutes auf Kollagen im Vergleich zum unbehandelten Blut der RAGE^{-/-} Mäusen (21,29±4,24 vs. 16,98±7). Außerdem war die Thrombusbildung von RAGE^{-/-} Mäusen signifikant geringer auf Kollagen als die Thrombusformation von RAGE^{+/+} Mäusen (Abbildung 3-18A).

4. Diskussion

Zur weiteren Diskussion siehe auch folgende Publikationen: Seizer, von Ungern-Sternberg et al. 2015 (Atherosclerosis Thrombosis Vascular Biology)²¹ und von Ungern-Sternberg et al. 2017 (Thrombosis and Haemostasis)⁵⁶ sowie den Review von Ungern-Sternberg et al. 2018 (International Journal of Molecular Sciences)³⁹.

4.1. Einfluss von extrazellulärem CyPA auf Thrombozyten

Thrombozyten sind reich an intrazellulärem CyPA, welches sie durch Aktivierung freisetzen können⁷¹. Das extrazelluläre CyPA bindet auf Thrombozyten an dem Zelloberflächenrezeptor CD147^{99, 177} und führt zur Aktivierung der Thrombozyten über den PI3 Kinase-Akt Signalweg²¹.

Aktuell gibt es zwei verschiedene CsA Derivate NIM811, welches zellgängig ist¹⁷⁸ und MM284 welcher nur extrazellulär agiert¹⁷⁹. Um zu untersuchen, ob das intrazelluläre CyPA bei der Aktivierung von Thrombozyten benötigt wird oder es vor allem durch das extrazelluläre CyPA vermittelt ist, wurden NIM811 und MM284 in der CyPA-abhängigen Thrombozytenaktivierung untersucht. CyPA ist in der Lage Thrombozyten zu aktivieren und zu degranulieren, was zur Expression von CD62P auf der Zelloberfläche führt. Dies geschieht durch die Bindung von CyPA und CD147 und daraus folgend die Phosphorylierung von PI3 Kinase und Akt. Sowohl NIM811 als auch MM284 sind in der Lage die CyPA-induzierte Thrombozytenaktivierung ab einer Konzentration von 200 nM zu inhibieren. Durch die CyPA-abhängige Aktivierung der Thrombozyten kommt es auch zur Bildung von Thromben. Das CyPA bei der Bildung der Thromben von Bedeutung ist, konnte schon von Elvers et al.⁶³ nachgewiesen. Ob es sich um das intra- oder extrazelluläre CyPA handelt, wurde allerdings nicht unterschieden. Dennoch wurde gezeigt, dass CyPA^{-/-} Mäuse generell eine schlechtere Thrombusbildung haben als die CyPA^{+/+} Mäuse. Durch die Tatsache, dass MM284 die Thrombusbildung verringern kann, wie wir in Abbildung 3-3 konnten, ist zu schließen, dass es vor allem das extrazelluläre CyPA ist, welches für die Thrombusbildung verantwortlich ist.

Um dies näher zu untersuchen wurden Versuche an CyPA^{-/-} Mäusen durchgeführt. Wie auch beim humanen Blut kommt es durch CyPA zu einer Aktivierung der Thrombozyten und zur Expression von CD62P auf der Oberfläche. Dies konnte auch bei den CyPA^{-/-} Mäusen festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass es vor allem das extrazelluläre CyPA welches an der Aktivierung von Thrombozyten beteiligt ist. Darüber hinaus zeigen diese Daten, dass die Expression von CD62P auch in der Abwesenheit von intrazellulärem CyPA möglich ist. Bestätigt wurde das durch die Inhibitoren NIM811 und MM284, welche beide die CyPA-vermittelte Thrombozytenaktivierung verhindern. Des Weiteren konnte in der Thrombusformation gezeigt werden, dass es bei CyPA^{-/-} Mäuse, die mit CyPA stimuliert wurden, zu einer Bildung von Thromben *in vitro* kommt. Dies deutet darauf hin, dass auch ohne die Anwesenheit von intrazellulärem CyPA die Aktivierung von Thrombozyten möglich

ist. Dies zeigt sich auch in der FeCl_3 -induzierten Thrombusformation, mit NIM811 und MM284 behandelte C57BL/6J Mäuse haben eine verlangsamte bzw. verringerte Thrombusformation *in vivo*²¹. Diese Ergebnisse implizieren auch, dass CyPA von Thrombozyten während der Adhäsion freigesetzt werden kann und an die Thrombozyten über CD147 bindet. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten und zur Bildung von Thromben. Allerdings ist das intrazelluläre CyPA ebenfalls an der Thrombozytenaktivierung beteiligt, indem es zur Aktivierung von $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ beiträgt⁶⁵.

Der extrazelluläre CyPA Inhibitor MM284 reduziert die CyPA-induzierten Effekte genauso wie NIM811, was darauf hindeutet, dass es vor allem das extrazelluläre CyPA ist, welches die pro-inflammatorischen Effekte auslöst. Zu diesen Effekten zählt auch die Chemokinexpression von SDF1 α . Durch MM284 wird nur das extrazelluläre CyPA inhibiert, wodurch die intrazellulären Funktionen nicht beeinflusst werden²¹.

4.2. Screening und Testung eines spezifischen CyPA Antikörpers

Der Nachteil von CyPA Inhibitoren, welche CsA Derivate sind, ist, dass sie keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Cyclophilinen machen und damit alle inhibieren bzw. nur ein Unterschied zwischen intra- und extrazellulärem Cyclophilinen möglich ist^{178, 179}. Daher ist es von Bedeutung einen spezifischen CyPA-Antikörper zu entwickeln, der nur das extrazelluläre CyPA blockiert.

4.2.1. Screening und Funktionstest nach einem spezifischen Antikörper

Daher wurden fünf verschiedene CyPA-Antikörper entwickelt, welche an CyPA binden und damit die CyPA-CD147 Interaktion verhindern. Alle generierten Antikörper waren in der Lage rekombinantes CyPA zu detektieren.

Intrazelluläres CyPA ist in allen Zellen zu finden und dort ein wichtiger Regulator der thrombozytären Ca^{2+} Hämostase und beteiligt an der arteriellen Thrombusformation⁶³. Darüber hinaus agiert das intrazelluläre CyPA als Chaperon und ist an der Proteinfaltung und dem Proteintransport beteiligt⁵⁸⁻⁶¹. Vor kurzen konnte von Wang et al.⁶⁵ gezeigt werden, dass CyPA intrazellulär an der Aktivierung des Rezeptors $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ beteiligt ist. Des Weiteren ist CyPA ein attraktives pharmakologisches Ziel um die Immunabwehr in Organen nach Transplantationen zu kontrollieren¹⁸⁰. CsA oder CsA-Derivate hemmen die PPIase-Aktivität von CyPA, welche für das Immunsystem wichtig ist¹⁷⁸. Dies führt dazu, dass eine generelle oder unspezifische Inhibition von CyPA zu einer gestörten Hämostase in den Zellen führt⁶³. Daher ist es von Bedeutung spezifische CyPA-Inhibitoren zu entwickeln, um Nebenwirkungen, welche mit dem intrazellulären CyPA zusammenhängen, zu verringern. Durch die Entwicklung des CyPA-Antikörpers 8H7-mAk, der eine spezifische Bindung an extrazelluläres CyPA hat, werden weder die Hämostase noch die Anzahl der Thrombozyten

beeinflusst. Der Grund dafür ist, dass 8H7-mAk nur gegen die durch sekretiertes CyPA vermittelten Effekte wirkt. Dies schließt ein, dass 8H7-mAk nur bei thrombotischen oder inflammatorischen Prozessen wirkt, an welchen das extrazelluläre CyPA beteiligt ist. Dadurch ist 8H7-mAk in der Lage die CyPA-induzierten pro-thrombotischen und entzündungsfördernden Prozesse zu minimieren. Allerdings hat 8H7-mAk keine anti-thrombotischen bzw. anti-inflammatorischen Effekte ohne die Gegenwart von extrazellulärem CyPA.

Neben Thrombozyten sind allerdings auch andere Zellen nach inflammatorischen Stimuli in der Lage CyPA zu sekretieren, darunter Endothelzellen, LPS-aktivierte Makrophagen oder durch hohe Glucose aktivierte Monozyten⁷². Allerdings wird CyPA ebenfalls von nekrotischen Zellen sekretiert, da die Zellmembran von nekrotischen Zellen permeable wird¹⁸¹. Dies führt dazu, dass CyPA auch einen Einfluss auf anderen Zellen hat. In der Monozytenmigration konnten ebenfalls alle Antikörper die CyPA-induzierte Migration verhindern. Anhand von diesen Ergebnissen wurde der Antikörper 8H7-mAk für weitere Versuche ausgewählt. 8H7-mAk ist ein spezifischer extrazellulärer CyPA Antikörper, welches zwischen CyPA und CyPB unterscheiden kann. Dies unterscheidet ihn von MM284, welcher keinen Unterschied zwischen den extrazellulären Cyclophilinen macht¹⁷⁹.

4.2.2. 8H7-mAk beeinflusst die CyPA-induzierte Adhäsion und Migration von Monozyten

Der Rezeptor für extrazelluläres CyPA ist CD147, ein Rezeptor, der auf den meisten inflammatorischen Zellen, darunter Monozyten, Makrophagen und Thrombozyten zu finden ist^{99, 123, 130, 177}. Die Sekretion von CyPA führt über die Interaktion mit CD147 *in vitro* zur Migration von Monozyten, Neutrophilen, Eosinophilen und T-Zellen^{130, 131, 182}. Dass CyPA zur Migration von Zellen führt, zeigt sich auch im Mausmodell der autoimmunen Myokarditis. Durch die Inhibition des extrazellulären CyPA, durch MM284, kommt es zu einer verminderten Infiltration von Zellen und zu einer verminderten Myokardfibrose¹³¹. Auch beim Myokardinfarkt scheint die Interaktion von CyPA und CD147 eine wichtige Rolle zu spielen. Die Expression von CyPA und von CD147 ist im Myokardinfarktgewebe sowohl von Patienten wie auch von Mäusen erhöht. Ebenfalls kommt es zur Infiltration von Makrophagen und Neutrophilen in den Infarktbereich. Durch eine Blockierung von CD147 kommt es zu einer besseren linksventrikulären Auswurf Funktion. Dies deutet auf weniger Ischämie- und Reperfusionsschäden hin¹³⁶. Daraus kann geschlossen werden, dass extrazelluläres CyPA eine wichtige Rolle bei der Thrombose und Entzündung spielt und dadurch auch eine wichtige Rolle in der Pathologie von verschiedenen Herzkreislaufkrankungen, darunter Atherosklerose, Myokardinfarkt und Myokarditis^{78, 136, 183}. CyPA induziert die CD11b Expression und damit die Aktivierung von Monozyten. Durch die Zugabe des Antikörpers 8H7-mAk kommt es nicht zur CyPA-induzierten Monozytenaktivierung⁵⁶. Dass Monozyten durch CyPA aktiviert werden, zeigt sich auch in der vermehrten Adhärenz von Monozyten auf aktiviertem Endothel, daraus resultierend wird

die Migration gefördert. Dadurch ist es von Bedeutung die CyPA-vermittelten Effekte zu blockieren. Der Antikörper 8H7-mAk ist in der Lage die CyPA-vermittelten Effekte *in vitro* zu beheben und damit die Adhäsion und Migration von Monozyten zu verhindern. Neben dem *in vitro* Einfluss ist 8H7-mAk auch in der Lage die *in vivo* CyPA-initiierte Infiltration von T-Zellen und Monozyten in das Peritoneum zu verhindern. Damit hat 8H7-mAk dieselben anti-migratorischen Eigenschaften wie MM284, das ebenfalls die CyPA-vermittelte Migration von Monozyten *in vitro* blockieren kann¹³¹. Anhand von diesen Tatsachen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass durch die Rezeptor-Ligand-Interaktion von CyPA und CD147 auf Monozyten und Thrombozyten ein essenzieller Schritt bei Entzündungen und in der Entstehung von Atherosklerose ist.

4.2.3. Der Einfluss von 8H7-mAk auf die CyPA-induzierte Thrombozytenaktivierung

Neben den Monozyten sind auch Thrombozyten an der Entzündungsreaktion in kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt, darunter Atherosklerose¹⁸⁴. Darüber hinaus wird CyPA durch verschiedene Zellen, darunter Thrombozyten sekretiert⁷¹. Extrazelluläres CyPA ist ein effektiver Thrombozytenagonist und induziert die Aktivierung, Adhäsion und Thrombusformation über den Rezeptor CD147¹²³. Durch eine Störung der CyPA-CD147 Interaktion kann somit der CyPA-vermittelten Effekt blockiert werden. 8H7-mAk ist in der Lage die CyPA-vermittelte Thrombozytenaktivierung zu verhindern und hat damit dieselben Eigenschaften wie der CyPA Inhibitor und CsA Derivat MM284. Wie auch dieser Inhibitor agiert 8H7-mAk nur extrazellulär und ist nicht zellgängig⁵⁶, wodurch die Funktion des intrazellulären CyPA nicht beeinträchtigt wird. CyPA ist an der Thrombusformation *in vitro* und *in vivo* beteiligt und durch extrazelluläres CyPA-aktivierte Thrombozyten zeigen eine höhere Adhärenz auf entzündetem Endothel *in vivo*. Dieser Prozess ist unabhängig vom intrazellulären CyPA²¹, dadurch kann geschlussfolgert werden, dass das intrazelluläre CyPA nur eine untergeordnete Rolle bei der Bindung von aktivierten Thrombozyten an Kollagen spielt. Durch die CyPA-induzierte Aktivierung der Thrombozyten sind diese in der Lage mit Monozyten zu sogenannte Monozyten-Thrombozyten-Aggregate (MTA) zu interagieren, welche vermutlich durch die CyPA-CD147-induzierte Expression von CD62P auf Thrombozyten verantwortlich ist. Da dieser Prozess sowohl durch eine Inhibition mit 8H7-mAk als auch durch eine Blockierung von CD147 unterbunden werden kann⁵⁶, ist davon auszugehen, dass extrazelluläres CyPA in diesen Prozess involviert ist. Diese Daten zeigen, dass es möglich ist, die CyPA-vermittelten Effekte durch den Antikörper 8H7-mAk zu reduzieren bzw. zu verhindern. Der entwickelte Antikörper bindet an CyPA und verhindert damit die Bindung an CD147, wodurch die CyPA-CD147-induzierten Effekte, wie die Aktivierung von Monozyten und Thrombozyten, nicht stattfinden können. Dass 8H7-mAk ein wirksamer Antikörper ist, wird auch deutlich, da der Antikörper in der Lage ist die Akkumulation von Monozyten und Thrombozyten im murinen Modell des Leberversagens zu

reduzieren⁵⁶. Dadurch ist CyPA ein Mediator für die Thrombose und thrombozytenvermittelte Entzündung und auch am Organversagen beteiligt.

Da 8H7-mAk nur extrazellulär wirkt, ist die Hämostase, an der das intrazelluläre CyPA beteiligt ist⁶³, nicht betroffen. Dies konnte durch die gleiche Verschlusszeit der Schwanzvene bei 8H7-mAk und IgG behandelten Mäusen nachgewiesen wird. Darüber hinaus kommt es durch die Injektion von 8H7-mAk nicht zu einer Thrombozyten- oder Monozytendepletion, weder nach wenigen Minuten noch nach 24 Stunden. Darüber hinaus ist 8H7-mAk für mindestens 24 Stunden in der Maus nachzuweisen⁵⁶.

Aktuell gibt es mehrere antikörperbasierte Therapien, die in der klinischen Praxis getestet werden, wie PKSC-9 Inhibitoren oder $\alpha_{IIb}\beta_3$ Antagonisten^{185, 186}. Daher ist die Entwicklung eines Antikörpers für den klinischen Einsatz besser geeignet als der Einsatz von CsA Derivaten.

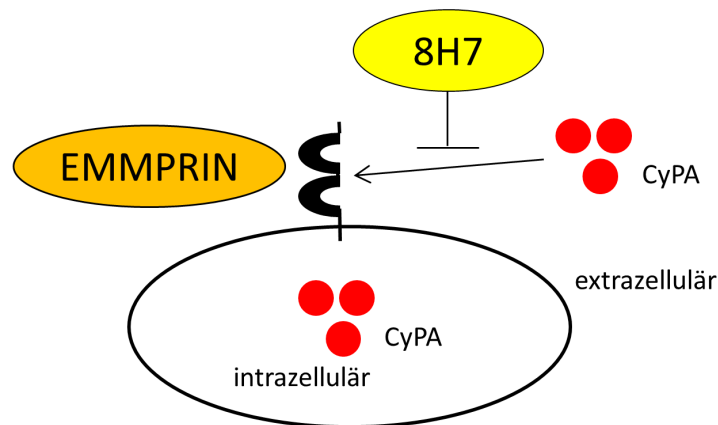


Abbildung 4-1 Die Wirkweise von 8H7-mAk. 8H7-mAk ist in der Lage die Bindung von CyPA an den Rezeptor CD147 (EMMPRIN) zu verhindern.

4.2.4. Limitierung der 8H7-mAk Studie

Die durchgeführte Studie mit dem 8H7 monoklonalen Antikörper hat allerdings auch seine Limitierungen. Da in der Studie eine IgG Kontrolle verwendet wurde, können nicht-spezifische Bindungen über den Fc-Teil des Antikörpers nicht ausgeschlossen werden, da kein Fab Fragment als Kontrolle verwendet wurde. Allerdings besitzt die IgG Kontrolle ähnliche Eigenschaften wie der eigentliche Antikörper, weist aber keine spezifische Zielbindung auf, wodurch eine IgG Kontrolle auch als negative Kontrolle bezeichnet wird¹⁸⁷. Da die IgG Kontrolle wie auch der Antikörper einen Fc-Teil besitzt ist es eher unwahrscheinlich, dass der Fc-Teil einen Einfluss auf die gefundenen Resultate hat. Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Resultaten um eine spezifische

Reduktion der CyPA-induzierten Effekte durch den 8H7 monoklonalen Antikörper handelt und es keine unspezifische Bindung über den Fc-Teil gibt.

4.3. Die Interaktion von CyPA und mit RAGE

Der Einzige bekannte Bindungspartner von extrazellulärem CyPA ist aktuell CD147. Diese Bindung wurde im Jahr 2002 zum ersten Mal beschrieben⁹⁹. Da es allerdings verschiedene posttranslationale Modifikationen von CyPA gibt, acetyliert, methyliert und phosphoryliert könnte es, wie bereits Xue et al.⁶⁹ spekulierten, neben CD147 einen weiteren Bindungspartner für CyPA geben. CD147 ist als Bindungspartner für verschiedene Liganden beschrieben. Dazu gehört auch S100A9, ein DAMP aus der S100 Familie¹⁰¹. Durch die Interaktion von S100A9 und CD147 kommt es zur Phosphorylierung und damit Aktivierung des Akt und Erk Signalwegs. Darüber hinaus ist die S100A9-CD147 Interaktion an der Migration von Monozyten beteiligt¹⁸⁸. S100A9 ist neben CyPA und CyPB der einzig andere bekannte Bindungspartner von CD147, der als DAMP klassifiziert wurde. RAGE ist, wie auch CD147, ein Oberflächenrezeptor an den S100A9 binden kann. Sorci et al. 2013¹⁸⁹ spekulierten, das es mindestens einen anderen Rezeptor aus der Immunglobulin Familie geben muss, der die Funktionen von RAGE bei einem Verlust des Rezeptors ausgleichen kann. Der Grund für diese Annahme war, dass sich RAGE^{-/-} Mäuse ohne phänotypische Auffälligkeiten entwickeln und somit die Funktion dieses Rezeptors durch andere Rezeptoren kompensiert werden muss. Da CD147 wie auch RAGE zur Immunglobulin Familie gehört, könnte CD147 einer der Rezeptoren sein, die die Funktionen von RAGE übernehmen bzw. den Verlust ausgleichen kann. Daher wurde untersucht, ob auch CyPA an RAGE bindet. Sowohl im Bindungs-ELISA als auch durch konfokale Aufnahmen könnten wir eine Interaktion von RAGE und CyPA bestätigen. Damit ist RAGE ein neuer bisher unbekannter Bindungspartner von CyPA.

4.3.1. Die CyPA-RAGE Interaktion beeinflusst Monozyten

Durch den Bindungs-ELISA konnte nachgewiesen werden, dass CyPA konzentrationsabhängig an RAGE bindet. Die Bindung von CyPA an CD147 fördert die Adhäsion von Monozyten und auch deren Migration, was wir in der Studie mit dem 8H7-mAk nachweisen konnten (siehe Resultate 3.2.3 und Diskussion 4.2.2). Nachdem allerdings auch RAGE ein Bindungspartner von CyPA ist, wurde untersucht, inwiefern diese Bindung einen Einfluss auf Monozyten hat. Dabei wurde deutlich: I) CyPA fördert die Adhärenz von Monozyten über die Rezeptoren RAGE und CD147, eine Blockierung von beiden Rezeptoren führt zu keiner weiteren Reduktion der Adhärenz. II) CyPA induziert die Migration von Monozyten über beide Rezeptoren. Der TLR4 Rezeptor dagegen ist nicht an der CyPA-abhängigen Migration beteiligt. Allerdings wurde für diesen Rezeptor auch schon beschrieben, dass er auch nicht die Migration von Monozyten auf S100A9 fördert^{188, 190}. Daher zeigen diese Ergebnisse, was schon vorher über TLR4 beschrieben wurde, nämlich

dass TLR4 nicht an der Migration von Monozyten zu S100A9 beteiligt ist und scheinbar auch nicht an der zu CyPA induzierten Migration. Monozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Entzündungen. Das Rekrutieren von Monozyten ist ein kontrollierter Prozess. Nach dem ersten Kontakt der Monozyten mit der Gefäßwand beginnen diese zu rollen. Durch die Verlangsamung der Monozyten kommt es zu einer Adhäsion, wodurch die Monozyten dann ins Gewebe migrieren können¹⁹¹. Aktiviertes Endothel ist in der Lage CyPA zu sekretieren und damit Monozyten anzulocken⁷⁴, die ins Gewebe infiltrieren und an der Entstehung der Atherosklerose beitragen. Die Tatsache, dass CyPA an RAGE bindet, impliziert, dass es neben CD147 noch einen anderen Rezeptor gibt, über den CyPA einen promigratorischen Einfluss auf die Monozyten ausübt.

Die Myokarditis gehört zu den inflammatorischen Erkrankungen des Herzens. Durch die Entzündung im Herzgewebe kommt es zur Sekretion von CyPA. Dies führt zur Infiltration von Zellen und zur Fibrose des Gewebes. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass dies durch eine Inhibierung von CyPA verhindert werden^{131, 183}. Da in beiden Studien allerdings mit CsA Derivaten gearbeitet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben CD147 auch RAGE eine Rolle dabei spielt. Eine Blockierung mit RAGE durch sRAGE führt in der frühen Phase der Myokarditis zu einer reduzierten Entzündungsreaktion *in vivo*, im Rattenmodell¹⁹², wodurch RAGE ebenfalls eine Rolle bei der Myokarditis spielt. CyPA spielt eine Rolle bei der Infiltration von Zellen bei einer Entzündungsreaktion. Durch die Bindung von CyPA an die Rezeptoren werden pro-inflammatorische Signalkaskaden aktiviert und weitere Zellen wandern in das Gewebe ein. Dies zeigt sich auch in der *in vivo* Infiltration von CD11b, F4/80 und CD3 positiven Zellen in das Peritoneum nach einer CyPA-induzierten Peritonitis.

Hibino et al.¹⁰¹ konnten keine Interaktion von den Rezeptoren CD147 und RAGE miteinander nachweisen und auch intrazellulär ist die Signalübertragung verschieden. Daher sollten Versuche an RAGE^{-/-} Mäusen die CyPA-RAGE Interaktion bestätigen. Wie auch bei den humanen Monozyten konnte mit RAGE-defizienten Monozyten/Leukozyten nachgewiesen werden, dass erstens die CyPA-vermittelte Adhäsion über RAGE induziert ist und zweitens die Migration und Infiltration von Monozyten über RAGE vermittelt ist. Die Tatsache, dass auch die CyPA-induzierte Migration bei MyD88^{-/-} Mäusen reduziert ist, bestätigt, dass die CyPA-induzierte Migration von Monozyten über RAGE vermittelt wird. Allerdings ist die Migration nicht ausschließlich RAGE vermittelt, sondern geht auch über CD147 (siehe Resultate 3.2.3). Bei der CyPA-induzierte Monozytenmigration über RAGE handelt es sich um eine spezifische Migration, da die Monozyten der MyD88^{-/-} Mäuse zu SDF1 α migrieren. Von SDF1 α ist weder eine Interaktion mit CD147 noch mit RAGE bekannt. Dadurch ist davon auszugehen, dass es sich bei der CyPA-RAGE Interaktion um eine spezifische Interaktion handelt.

4.3.2. Signalkaskade von RAGE nach Ligandbindung

Durch die Bindung eines Liganden, darunter AGEs, an RAGE kommt es zur Phosphorylierung von RAGE an Serine³⁹¹ durch PKC ζ , wodurch es zur Bindung von TIRAP und MyD88 an die zytoplasmatische Domäne von RAGE kommt. Dies sind die ersten Interaktionen der Signalkaskade. Im weiteren Verlauf kommt es zur Phosphorylierung von Akt, p38 und IKK α . Am Ende führt dies zu einer Aktivierung von NF κ B und zur Expression der Zytokine IL-6, TNF α und IL-8. Dieser Prozess ist an erster Stelle von der Bindung von TIRAP an RAGE abhängig, die als Adapterproteine für RAGE fungieren¹⁹³. Wir haben den intrazellulären Signalweg nach der Stimulation mit CyPA nicht untersucht. Allerdings scheint es zumindest bei der Migration der Fall zu sein, dass es zur Phosphorylierung von PKC ζ kommt und damit zur Bindung von TIRAP und MyD88 an RAGE. Dies führt dann zur Migration von Monozyten zu CyPA *in vitro*¹⁹³.

4.3.3. Auswirkung der CyPA-RAGE Interaktion auf Thrombozyten

CyPA aktiviert Thrombozyten über die Bindung an CD147 und die Aktivierung des PI3 Kinase/Akt Signalwegs²¹. Da CD147 nicht mehr der einzige Rezeptor für CyPA ist, wurde nun untersucht, ob die Thrombozytenaktivierung ausschließlich über CD147 geregelt ist oder ob auch RAGE daran beteiligt ist. Eine Blockierung von RAGE führt zu einer reduzierten Aktivierung der Thrombozyten. Allerdings wurde nicht der intrazelluläre Signalweg untersucht, wodurch es nicht möglich ist, zu sagen, ob es durch die CyPA Bindung an RAGE auch zur Aktivierung des PI3 Kinase/Akt Signalwegs kommt oder ein anderer Signalweg aktiviert wird. Da Akt durch die eine Bindung von AGE an RAGE phosphoryliert werden kann¹⁹³ wäre es möglich, dass auch die Bindung von CyPA und RAGE diesen Signalweg aktiviert.

Welcher intrazelluläre Signalweg für die Aktivierung der Thrombozyten und damit für die Expression von CD62P auf der Oberfläche verantwortlich ist, ist vermutlich auch der Signalweg, über den die Thrombusformation reguliert wird. Die Thrombusbildung auf Kollagen wird durch CyPA erhöht und kann durch eine Blockierung der Rezeptoren CD147 und RAGE verhindert werden. Dies deutet darauf hin, dass neben CD147 auch RAGE eine Rolle bei der CyPA-induzierten Bildung von Thromben führt.

sRAGE Levels sind ein idealer Biomarker für Entzündungsreaktionen im menschlichen Körper. Bei Patienten mit einem Myokardinfarkt oder einer stabilen Angina Pectoris gibt es eine Korrelation zwischen den Plasmalevel von sRAGE und einem koronaren Event, wobei Patienten mit einer Angina Pectoris höhere sRAGE Level haben als Patienten mit einem Myokardinfarkt¹⁷⁵. Da das sRAGE in der Lage ist, unter anderem sekretierte AGE zu binden^{173, 174}, könnte sRAGE auch in der Lage sein an DAMPs, wie CyPA, zu binden. Damit würde die Interaktion von CyPA sowohl mit oberflächengebundenem CD147 als auch mit oberflächengebundenem RAGE nicht stattfinden. Dadurch würde auch die Aktivierung von

Monozyten und Thrombozyten ausbleiben und somit eine Ausbreitung der Entzündungsreaktion.

4.4. Fazit

Thrombozyten und Monozyten sind ein wichtiger Bestandteil der Hämostase und Immunabwehr. Damit die Thrombozyten sich an der Hämostase beteiligen können, ist es von Bedeutung so spezifisch wie möglich unerwünschte Effekte zu reduzieren.

In dieser Arbeit konnte zunächst durch den Einsatz von CsA Derivaten als CyPA Inhibitoren gezeigt werden, dass es vor allem das extrazelluläre CyPA ist, welches für die Aktivierung von Thrombozyten verantwortlich ist und darüber hinaus von Thrombozyten sekretiert werden kann. Zur Inhibierung von extrazellulärem CyPA gibt es allerdings keinen spezifischen Antikörper. Daher ist es von großer Bedeutung einem spezifischen Antikörper gegen extrazelluläres CyPA zu entwickeln und diesen auf seine Wirksamkeit zu untersuchen. Durch die Entwicklung von 8H7-mAk ist es gelungen einen spezifischen Antikörper gegen CyPA zu entwickeln und diesen sowohl an Monozyten als auch an Thrombozyten zu testen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung eines CyPA Antikörpers ein vielversprechender Therapieansatz bei Erkrankungen ist, wo Thrombozyten und Monozyten involviert sind, also auch bei kardiovaskulären Erkrankungen. Aber auch für andere Erkrankungen, wie die rheumatoide Arthritis, könnten vom Einsatz eines spezifischen CyPA Antikörpers profitieren.

Um spezifische Antikörper entwickeln zu können, ist es von großer Bedeutung, die Mechanismen und Bindungspartner der für die Entzündung verantwortlichen Substanzen, Chemokine und DAMPs, zu identifizieren. In dieser Arbeit ist es gelungen einen neuen, bisher unbekanntem Bindungspartner von CyPA zu identifizieren, RAGE ein Rezeptor aus der Immunglobulin Familie. Da über die Interaktion von CyPA mit diesem Rezeptor nichts bekannt ist, musste diese Interaktion neu untersucht werden. Wir konnten in erster Instanz zeigen, dass es durch die Interaktion von CyPA mit RAGE zu einer Aktivierung von Thrombozyten und zur Adhäsion und Migration von pro-inflammatorischen Zellen kommt. Aus diesem Grund ist es wichtig diese Interaktion weiter zu untersuchen um daraus schlussendlich neue Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können.

5. Zusammenfassung

CyPA ist ein in allen Säugetier-Zellen vorkommendes Protein, welches an verschiedenen intrazellulären Prozessen beteiligt ist. Zu diesen intrazellulären Funktionen gehört v.a. die Proteinfaltung und die Ca^{2+} Hämostase. Darüber hinaus ist CyPA an der intrazellulären Migration von anderen Proteinen und Rezeptoren zur Zelloberfläche beteiligt.

Während einer Entzündungsreaktion kann CyPA von verschiedenen Zelltypen freigesetzt werden. Diese Freisetzung führt dazu, dass CyPA an den bereits bekannten Rezeptor CD147 binden kann. Darüber hinaus konnten wir eine Bindung von CyPA an den bisher nicht beschriebenen Rezeptor RAGE nachweisen. Diese Interaktion wurde in dieser Arbeit das erste Mal beschrieben.

Die Bindung von CyPA an CD147 auf der Oberfläche von Thrombozyten und Monozyten führt zu deren Aktivierung. Dies fördert die Adhäsion auf Endothelzellen und die Migration/Infiltration in das Gewebe. Dadurch ist CyPA an der Pathophysiologie von verschiedenen inflammatorischen kardiovaskulären Erkrankungen, wie Myokarditis, Myokardinfarkt und Atherosklerose beteiligt. Während kardiovaskulären Erkrankungen kommt es zu einer vermehrten Expression von CyPA. Dabei konnte gezeigt werden, dass es durch eine Inhibition von CyPA zu positiveren Verläufen der Erkrankungen kommt. Damit möglichst keine unerwünschten Nebeneffekte bei der Blockierung von CyPA auftreten wurde in dieser Arbeit ein spezifischer Antikörper gegen extrazelluläres CyPA entwickelt. CyPA sorgt für die Akkumulation von Thrombozyten und Monozyten und trägt damit zur Progression von inflammatorischen Erkrankungen bei. Durch die Entwicklung eines spezifischen Antikörpers gegen CyPA kann der entzündungsfördernde Einfluss von CyPA auf Monozyten und Thrombozyten aufgehoben werden. Dabei wird weder die Hämostase noch das intrazelluläre CyPA durch den entwickelten Antikörper beeinflusst. Dadurch kann geschlussfolgert werden, dass durch die Entwicklung eines spezifischen CyPA Antikörpers die Thrombose und Thrombo-Inflammation *in vitro* und *in vivo* beeinflusst werden.

Wir konnten das erste Mal nachweisen, dass es neben CD147 einen anderen Rezeptor für extrazelluläres CyPA gibt, den Rezeptor RAGE. Von RAGE ist bekannt, dass er bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen vermehrt exprimiert wird, darunter Atherosklerose, Myokarditis und Myokardinfarkt. Dies alles sind Erkrankungen bei denen auch CyPA vermehrt exprimiert wird. Daher kann geschlussfolgert werden, dass einige von den über RAGE vermittelte inflammatorische Effekten durch die Interaktion von CyPA an diesen Rezeptor hervorgerufen werden könnten. Durch die Interaktion von CyPA mit RAGE kommt es zur Aktivierung von Thrombozyten und zur Entwicklung von Thromben. Ebenfalls wird die Adhäsion und Migration von Monozyten durch die CyPA-RAGE Interaktion induziert. Daher ist diese Interaktion vermutlich auch an der Thrombusbildung *in vivo* beteiligt, sowie an der Entstehung von Folgeschäden nach einem Myokardinfarkt.

Durch die Entdeckung der Bindung von CyPA an RAGE kann diese Interaktion nun untersucht werden um daraus Therapieansätze zu entwickeln, welche spezifisch diese Interaktion unterbinden.

6. Summary

CyPA is a protein which is present in all mammalian cells which is involved in different intracellular processes. The intracellular functions include especially protein folding and Ca^{2+} hemostasis. Moreover, CyPA is involved in the protein trafficking of other proteins and receptors towards the cell surface.

During inflammation CyPA is released from various cell types. The release leads to the binding of CyPA to the known receptor CD147 but also to the not as interaction partner for CyPA described receptor RAGE. This receptor is described in this work for the first time as a binding partner for CyPA.

The binding between CyPA and CD147 on the surface of platelets and monocytes leads to their activation. This induces the adhesion on endothelial cells and the migration/infiltration into the tissue. Thus, CyPA is involved in the pathophysiology of several inflammatory cardiovascular diseases, including myocarditis, myocardial infarction and atherosclerosis. During cardiovascular disease there is an increase in CyPA secretion, it could be shown that an inhibition of CyPA leads to a more positive outcome of the disease. To avoid unpredictable side effects in the blocking of CyPA, a specific antibody against extracellular CyPA was developed in this work. CyPA ensures the accumulation of platelets and monocytes and thus contributes to the progression of inflammatory diseases. By developing a specific antibody against CyPA, the pro-inflammatory effect of CyPA on monocytes and platelets can be abolished. Neither the hemostasis nor the intracellular CyPA are affected by the new developed antibody. Thus, it can be concluded that the development of a specific CyPA antibody affects thrombosis and thrombo-inflammation *in vitro* and *in vivo*.

We have demonstrated for the first time that there is another receptor for extracellular CyPA besides CD147, the receptor RAGE. It is known that the RAGE expression is increased in various inflammatory diseases, including atherosclerosis, myocarditis and myocardial infarction. These are all diseases in which CyPA is also increasingly expressed. Therefore, it can be concluded that some of the RAGE-mediated inflammatory effects could be elicited by the interaction of CyPA with this receptor. The interaction of CyPA with RAGE activates platelets and thrombi can be formed. Moreover, the adhesion and migration of monocytes is induced by the CyPA-RAGE interaction. Therefore, this interaction is probably also involved in thrombus formation *in vivo* as well as the development of damages after a myocardial infarction.

Due to the discovering of the binding from CyPA to RAGE, it is now possible to investigate this interaction. This is necessary that it is possible to develop therapeutic approaches that prevent specifically this interaction.

7. Literaturverzeichnis

1. Bizzozero J. Ueber einen neuen formbestandtheil des blutes und dessen rolle bei der thrombose und der blutgerinnung. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin*. 1882;261-332
2. Gremmel T, Frelinger AL, 3rd, Michelson AD. Platelet physiology. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2016;42:191-204
3. George JN. Platelets. *Lancet*. 2000;355:1531-1539
4. Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, Collinge JE, Hilton AA, Ellis S, Kelly PN, Ekert PG, Metcalf D, Roberts AW, Huang DC, Kile BT. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell*. 2007;128:1173-1186
5. Escolar G, Leistikow E, White JG. The fate of the open canalicular system in surface and suspension-activated platelets. *Blood*. 1989;74:1983-1988
6. Lievens D, von Hundelshausen P. Platelets in atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2011;106:827-838
7. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and haemostasis*. 2011;105 Suppl 1:S13-33
8. Thomas MR, Storey RF. The role of platelets in inflammation. *Thrombosis and haemostasis*. 2015;114:449-458
9. Italiano JE, Jr., Shivdasani RA. Megakaryocytes and beyond: The birth of platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2003;1:1174-1182
10. Kahner BN, Shankar H, Murugappan S, Prasad GL, Kunapuli SP. Nucleotide receptor signaling in platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2006;4:2317-2326
11. Duerschmied D, Suidan GL, Demers M, Herr N, Carbo C, Brill A, Cifuni SM, Mauler M, Cicko S, Bader M, Idzko M, Bode C, Wagner DD. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood*. 2013;121:1008-1015
12. Nurden P, Poujol C, Winckler J, Combrie R, Pousseau N, Conley PB, Levy-Toledano S, Habib A, Nurden AT. Immunolocalization of p2y1 and tpalph receptors in platelets showed a major pool associated with the membranes of alpha -granules and the open canalicular system. *Blood*. 2003;101:1400-1408
13. Clemetson KJ. Platelets and primary haemostasis. *Thrombosis research*. 2012;129:220-224
14. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood reviews*. 2011;25:155-167
15. Lee D, Fong KP, King MR, Brass LF, Hammer DA. Differential dynamics of platelet contact and spreading. *Biophys J*. 2012;102:472-482
16. Aslan JE, McCarty OJ. Rho gtpases in platelet function. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2013;11:35-46
17. Badimon L, Storey RF, Vilahur G. Update on lipids, inflammation and atherothrombosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2011;105 Suppl 1:S34-42
18. Cimmino G, Golino P. Platelet biology and receptor pathways. *Journal of cardiovascular translational research*. 2013;6:299-309
19. Liverani E, Kilpatrick LE, Tsygankov AY, Kunapuli SP. The role of p2y(1)(2) receptor and activated platelets during inflammation. *Curr Drug Targets*. 2014;15:720-728
20. Tsoumani ME, Kalantzi KI, Goudevenos IA, Tselepis AD. Platelet-mediated inflammation in cardiovascular disease. Potential role of platelet-endothelium interactions. *Current vascular pharmacology*. 2012;10:539-549
21. Seizer P, von Ungern-Sternberg SN, Schonberger T, Borst O, Munzer P, Schmidt EM, Mack AF, Heinzmann D, Chatterjee M, Langer H, Malesevic M, Lang F, Gawaz M, Fischer G, May AE. Extracellular cyclophilin a activates platelets via emmprin (cd147) and pi3k/akt signaling, which promotes platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35:655-663

22. Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, Prescott SM, Zimmerman GA. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97:1525-1534
23. Mastenbroek TG, Feijge MA, Kremers RM, van den Bosch MT, Swieringa F, De Groef L, Moons L, Bennett C, Ghevaert C, Johnson JL, van der Meijden PE, Cosemans JM. Platelet-associated matrix metalloproteinases regulate thrombus formation and exert local collagenolytic activity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35:2554-2561
24. Mohebbali D, Kaplan D, Carlisle M, Supiano MA, Rondina MT. Alterations in platelet function during aging: Clinical correlations with thromboinflammatory disease in older adults. *J Am Geriatr Soc*. 2014;62:529-535
25. Modesti PA, Fortini A, Abbate R, Gensini GF. Age related changes of platelet prostacyclin receptors in humans. *Eur J Clin Invest*. 1985;15:204-208
26. Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Muscari S, Muscari A. The involvement of circulating microparticles in inflammation, coagulation and cardiovascular diseases. *Can J Cardiol*. 2010;26:140-145
27. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327:656-661
28. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews. Immunology*. 2005;5:953-964
29. Czepluch FS, Kuschicke H, Dellas C, Riggert J, Hasenfuss G, Schafer K. Increased proatherogenic monocyte-platelet cross-talk in monocyte subpopulations of patients with stable coronary artery disease. *J Intern Med*. 2014;275:144-154
30. Hilgendorf I, Swirski FK, Robbins CS. Monocyte fate in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35:272-279
31. Swirski FK, Weissleder R, Pittet MJ. Heterogeneous in vivo behavior of monocyte subsets in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29:1424-1432
32. Swirski FK, Hilgendorf I, Robbins CS. From proliferation to proliferation: Monocyte lineage comes full circle. *Semin Immunopathol*. 2014;36:137-148
33. Terry RL, Miller SD. Molecular control of monocyte development. *Cellular immunology*. 2014;291:16-21
34. Shashkin P, Dragulev B, Ley K. Macrophage differentiation to foam cells. *Curr Pharm Des*. 2005;11:3061-3072
35. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*. 1999;340:115-126
36. van der Laan AM, Ter Horst EN, Delewi R, Begieneman MP, Krijnen PA, Hirsch A, Lavaei M, Nahrendorf M, Horrevoets AJ, Niessen HW, Piek JJ. Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *European heart journal*. 2014;35:376-385
37. Tsujioka H, Imanishi T, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, Tanimoto T, Kitabata H, Okochi K, Arita Y, Ishibashi K, Komukai K, Kataiwa H, Nakamura N, Hirata K, Tanaka A, Akasaka T. 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*. 2009;54:130-138
38. van der Laan AM, Hirsch A, Robbers LF, Nijveldt R, Lommerse I, Delewi R, van der Vleuten PA, Biemond BJ, Zwaginga JJ, van der Giessen WJ, Zijlstra F, van Rossum AC, Voermans C, van der Schoot CE, Piek JJ. A proinflammatory monocyte response is associated with myocardial injury and impaired functional outcome in patients with st-segment elevation myocardial infarction: Monocytes and myocardial infarction. *American heart journal*. 2012;163:57-65 e52
39. von Ungern-Sternberg SNI, Zerneck A, Seizer P. Extracellular matrix metalloproteinase inducer emmprin (cd147) in cardiovascular disease. *International journal of molecular sciences*. 2018;19

40. Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B. Padgem protein: A receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell*. 1989;59:305-312
41. Fernandes LS, Conde ID, Wayne Smith C, Kansas GS, Snapp KR, Bennet N, Ballantyne C, McIntire LV, O'Brian Smith E, Klem JA, Mathew S, Frangogiannis N, Turner NA, Maresh KJ, Kleiman NS. Platelet-monocyte complex formation: Effect of blocking psgl-1 alone, and in combination with alphaIIb beta3 and alpha beta2, in coronary stenting. *Thrombosis research*. 2003;111:171-177
42. Weber C, Springer TA. Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of mac-1 with fibrinogen bound to alphaIIb beta3 and stimulated by platelet-activating factor. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100:2085-2093
43. Seizer P, Borst O, Langer HF, Bultmann A, Munch G, Herouy Y, Stellos K, Kramer B, Bigalke B, Buchele B, Bachem MG, Vestweber D, Simmet T, Gawaz M, May AE. Emmprin (cd147) is a novel receptor for platelet gpvi and mediates platelet rolling via gpvi-emmprin interaction. *Thrombosis and haemostasis*. 2009;101:682-686
44. Schulz C, von Bruhl ML, Barocke V, Cullen P, Mayer K, Okrojek R, Steinhart A, Ahmad Z, Kremmer E, Nieswandt B, Frampton J, Massberg S, Schmidt R. Emmprin (cd147/basigin) mediates platelet-monocyte interactions in vivo and augments monocyte recruitment to the vascular wall. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2011;9:1007-1019
45. Jungi TW, Spycher MO, Nydegger UE, Barandun S. Platelet-leukocyte interaction: Selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes, and related cell lines. *Blood*. 1986;67:629-636
46. Lehr HA, Olofsson AM, Carew TE, Vajkoczy P, von Andrian UH, Hubner C, Berndt MC, Steinberg D, Messmer K, Arfors KE. P-selectin mediates the interaction of circulating leukocytes with platelets and microvascular endothelium in response to oxidized lipoprotein in vivo. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1994;71:380-386
47. Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, Hughes BJ, Smith CW. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: A mechanism for recurrent disease? *Journal of the American College of Cardiology*. 1996;28:345-353
48. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface p-selectin: Studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;104:1533-1537
49. Passacquale G, Vamadevan P, Pereira L, Hamid C, Corrigall V, Ferro A. Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PloS one*. 2011;6:e25595
50. Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW. Cyclophilin: A specific cytosolic binding protein for cyclosporin a. *Science*. 1984;226:544-547
51. Fischer G, Bang H, Berger E, Schellenberger A. Conformational specificity of chymotrypsin toward proline-containing substrates. *Biochimica et biophysica acta*. 1984;791:87-97
52. Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*. 1989;337:476-478
53. Harding MW, Handschumacher RE, Speicher DW. Isolation and amino acid sequence of cyclophilin. *The Journal of biological chemistry*. 1986;261:8547-8555
54. Ke HM, Zydowsky LD, Liu J, Walsh CT. Crystal structure of recombinant human t-cell cyclophilin a at 2.5 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88:9483-9487
55. Kallen J, Spitzfaden C, Zurini MG, Wider G, Widmer H, Wuthrich K, Walkinshaw MD. Structure of human cyclophilin and its binding site for cyclosporin a determined by x-ray crystallography and nmr spectroscopy. *Nature*. 1991;353:276-279

56. von Ungern-Sternberg SNI, Vogel S, Walker-Allgaier B, Geue S, Maurer A, Wild AM, Munzer P, Chatterjee M, Heinzmann D, Kremmer E, Borst O, Loughran P, Zerneck A, Neal MD, Billiar TR, Gawaz M, Seizer P. Extracellular cyclophilin a augments platelet-dependent thrombosis and thromboinflammation. *Thrombosis and haemostasis*. 2017;117:2063-2078
57. Pan H, Luo C, Li R, Qiao A, Zhang L, Mines M, Nyanda AM, Zhang J, Fan GH. Cyclophilin a is required for cxcr4-mediated nuclear export of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein a2, activation and nuclear translocation of erk1/2, and chemotactic cell migration. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283:623-637
58. Galigniana MD, Morishima Y, Gallay PA, Pratt WB. Cyclophilin-a is bound through its peptidylprolyl isomerase domain to the cytoplasmic dynein motor protein complex. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:55754-55759
59. Rosado JA, Pariente JA, Salido GM, Redondo PC. Serca2b activity is regulated by cyclophilins in human platelets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30:419-425
60. Kern G, Kern D, Schmid FX, Fischer G. Reassessment of the putative chaperone function of prolyl-cis/trans-isomerases. *FEBS letters*. 1994;348:145-148
61. Baker EK, Colley NJ, Zuker CS. The cyclophilin homolog ninaa functions as a chaperone, forming a stable complex in vivo with its protein target rhodopsin. *The EMBO journal*. 1994;13:4886-4895
62. Lang K, Schmid FX, Fischer G. Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature*. 1987;329:268-270
63. Elvers M, Herrmann A, Seizer P, Munzer P, Beck S, Schonberger T, Borst O, Martin-Romero FJ, Lang F, May AE, Gawaz M. Intracellular cyclophilin a is an important ca(2+) regulator in platelets and critically involved in arterial thrombus formation. *Blood*. 2012;120:1317-1326
64. Soe NN, Sowden M, Baskaran P, Smolock EM, Kim Y, Nigro P, Berk BC. Cyclophilin a is required for angiotensin ii-induced p47phox translocation to caveolae in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33:2147-2153
65. Wang L, Soe NN, Sowden M, Xu Y, Modjeski K, Baskaran P, Kim Y, Smolock EM, Morrell CN, Berk BC. Cyclophilin a is an important mediator of platelet function by regulating integrin alphaIIb beta3 bidirectional signalling. *Thrombosis and haemostasis*. 2014;111:873-882
66. Chevalier F, Depagne J, Hem S, Chevillard S, Bensimon J, Bertrand P, Lebeau J. Accumulation of cyclophilin a isoforms in conditioned medium of irradiated breast cancer cells. *Proteomics*. 2012;12:1756-1766
67. Lammers M, Neumann H, Chin JW, James LC. Acetylation regulates cyclophilin a catalysis, immunosuppression and hiv isomerization. *Nature chemical biology*. 2010;6:331-337
68. Mao M, Yu X, Ge X, Gu R, Li Q, Song S, Zheng X, Shen T, Li X, Fu Y, Li J, Zhu D. Acetylated cyclophilin a is a major mediator in hypoxia-induced autophagy and pulmonary vascular angiogenesis. *Journal of hypertension*. 2017;35:798-809
69. Xue C, Sowden M, Berk BC. Extracellular cyclophilin a, especially acetylated, causes pulmonary hypertension by stimulating endothelial apoptosis, redox stress, and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2017;37:1138-1146
70. Soe NN, Sowden M, Baskaran P, Kim Y, Nigro P, Smolock EM, Berk BC. Acetylation of cyclophilin a is required for its secretion and vascular cell activation. *Cardiovascular research*. 2014;101:444-453
71. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, Cahill DJ, Emili A, Fitzgerald DJ, Maguire PB. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood*. 2004;103:2096-2104
72. Ramachandran S, Venugopal A, Sathisha K, Reshmi G, Charles S, Divya G, Chandran NS, Mullassari A, Pillai MR, Kartha CC. Proteomic profiling of high glucose primed monocytes identifies cyclophilin a as a potential secretory marker of inflammation in type 2 diabetes. *Proteomics*. 2012;12:2808-2821

73. Sherry B, Yarlett N, Strupp A, Cerami A. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89:3511-3515
74. Kim SH, Lessner SM, Sakurai Y, Galis ZS. Cyclophilin a as a novel biphasic mediator of endothelial activation and dysfunction. *The American journal of pathology*. 2004;164:1567-1574
75. Dear JW, Simpson KJ, Nicolai MP, Catterson JH, Street J, Huizinga T, Craig DG, Dhaliwal K, Webb S, Bateman DN, Webb DJ. Cyclophilin a is a damage-associated molecular pattern molecule that mediates acetaminophen-induced liver injury. *Journal of immunology*. 2011;187:3347-3352
76. Satoh K, Matoba T, Suzuki J, O'Dell MR, Nigro P, Cui Z, Mohan A, Pan S, Li L, Jin ZG, Yan C, Abe J, Berk BC. Cyclophilin a mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*. 2008;117:3088-3098
77. Satoh K, Nigro P, Matoba T, O'Dell MR, Cui Z, Shi X, Mohan A, Yan C, Abe J, Illig KA, Berk BC. Cyclophilin a enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin ii-induced aortic aneurysms. *Nature medicine*. 2009;15:649-656
78. Nigro P, Satoh K, O'Dell MR, Soe NN, Cui Z, Mohan A, Abe J, Alexis JD, Sparks JD, Berk BC. Cyclophilin a is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208:53-66
79. Satoh K, Nigro P, Zeidan A, Soe NN, Jaffre F, Oikawa M, O'Dell MR, Cui Z, Menon P, Lu Y, Mohan A, Yan C, Blaxall BC, Berk BC. Cyclophilin a promotes cardiac hypertrophy in apolipoprotein e-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31:1116-1123
80. Doerries C, Grote K, Hilfiker-Kleiner D, Luchtefeld M, Schaefer A, Holland SM, Sorrentino S, Manes C, Schieffer B, Drexler H, Landmesser U. Critical role of the nad(p)h oxidase subunit p47phox for left ventricular remodeling/dysfunction and survival after myocardial infarction. *Circulation research*. 2007;100:894-903
81. Kaname T, Miyauchi T, Kuwano A, Matsuda Y, Muramatsu T, Kajii T. Mapping basigin (bsg), a member of the immunoglobulin superfamily, to 19p13.3. *Cytogenet Cell Genet*. 1993;64:195-197
82. Liao CG, Kong LM, Song F, Xing JL, Wang LX, Sun ZJ, Tang H, Yao H, Zhang Y, Wang L, Wang Y, Yang XM, Li Y, Chen ZN. Characterization of basigin isoforms and the inhibitory function of basigin-3 in human hepatocellular carcinoma proliferation and invasion. *Molecular and cellular biology*. 2011;31:2591-2604
83. Belton RJ, Jr., Chen L, Mesquita FS, Nowak RA. Basigin-2 is a cell surface receptor for soluble basigin ligand. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283:17805-17814
84. Miyauchi T, Kanekura T, Yamaoka A, Ozawa M, Miyazawa S, Muramatsu T. Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin v domain and the beta-chain of major histocompatibility complex class ii antigen. *Journal of biochemistry*. 1990;107:316-323
85. Biswas C. Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*. 1982;109:1026-1034
86. Altruda F, Cervella P, Gaeta ML, Daniele A, Giancotti F, Tarone G, Stefanuto G, Silengo L. Cloning of cDNA for a novel mouse membrane glycoprotein (gp42): Shared identity to histocompatibility antigens, immunoglobulins and neural-cell adhesion molecules. *Gene*. 1989;85:445-451
87. Fossum S, Mallett S, Barclay AN. The mrc ox-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence. *European journal of immunology*. 1991;21:671-679
88. Petruszak JA, Nehme CL, Bartles JR. Endoproteolytic cleavage in the extracellular domain of the integral plasma membrane protein ce9 precedes its redistribution from the posterior to the anterior tail of the rat spermatozoon during epididymal maturation. *The Journal of cell biology*. 1991;114:917-927

89. Seulberger H, Lottspeich F, Risau W. The inducible blood--brain barrier specific molecule ht7 is a novel immunoglobulin-like cell surface glycoprotein. *The EMBO journal*. 1990;9:2151-2158
90. Schlosshauer B, Herzog KH. Neurothelin: An inducible cell surface glycoprotein of blood-brain barrier-specific endothelial cells and distinct neurons. *The Journal of cell biology*. 1990;110:1261-1274
91. Kasinrerck W, Fiebiger E, Stefanova I, Baumruker T, Knapp W, Stockinger H. 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. *Journal of immunology*. 1992;149:847-854
92. Ellis SM, Nabeshima K, Biswas C. Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor. *Cancer research*. 1989;49:3385-3391
93. Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, Nabeshima K. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed emmprin) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer research*. 1995;55:434-439
94. Yu XL, Hu T, Du JM, Ding JP, Yang XM, Zhang J, Yang B, Shen X, Zhang Z, Zhong WD, Wen N, Jiang H, Zhu P, Chen ZN. Crystal structure of hab18g/cd147: Implications for immunoglobulin superfamily homophilic adhesion. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283:18056-18065
95. Bork P, Holm L, Sander C. The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *Journal of molecular biology*. 1994;242:309-320
96. Smith DK, Xue H. Sequence profiles of immunoglobulin and immunoglobulin-like domains. *Journal of molecular biology*. 1997;274:530-545
97. Tang W, Chang SB, Hemler ME. Links between cd147 function, glycosylation, and caveolin-1. *Molecular biology of the cell*. 2004;15:4043-4050
98. Miyauchi T, Masuzawa Y, Muramatsu T. The basigin group of the immunoglobulin superfamily: Complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken ht7 antigen. *Journal of biochemistry*. 1991;110:770-774
99. Yurchenko V, Zybarth G, O'Connor M, Dai WW, Franchin G, Hao T, Guo H, Hung HC, Toole B, Gallay P, Sherry B, Bukrinsky M. Active site residues of cyclophilin a are crucial for its signaling activity via cd147. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:22959-22965
100. Yurchenko V, O'Connor M, Dai WW, Guo H, Toole B, Sherry B, Bukrinsky M. Cd147 is a signaling receptor for cyclophilin b. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;288:786-788
101. Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S, Yamamoto M, Motoyama A, Hosoi J, Shimokata T, Ito T, Tsuboi R, Huh NH. S100a9 is a novel ligand of emmprin that promotes melanoma metastasis. *Cancer research*. 2013;73:172-183
102. Xu D, Hemler ME. Metabolic activation-related cd147-cd98 complex. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2005;4:1061-1071
103. Slomiany MG, Grass GD, Robertson AD, Yang XY, Maria BL, Beeson C, Toole BP. Hyaluronan, cd44, and emmprin regulate lactate efflux and membrane localization of monocarboxylate transporters in human breast carcinoma cells. *Cancer research*. 2009;69:1293-1301
104. Khunkaewla P, Schiller HB, Paster W, Leksa V, Cermak L, Andera L, Horejsi V, Stockinger H. Lfa-1-mediated leukocyte adhesion regulated by interaction of cd43 with lfa-1 and cd147. *Molecular immunology*. 2008;45:1703-1711
105. Kato N, Yuzawa Y, Kosugi T, Hobo A, Sato W, Miwa Y, Sakamoto K, Matsuo S, Kadomatsu K. The e-selectin ligand basigin/cd147 is responsible for neutrophil recruitment in renal ischemia/reperfusion. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2009;20:1565-1576

106. Pushkarsky T, Yurchenko V, Vanpouille C, Brichacek B, Vaisman I, Hatakeyama S, Nakayama KI, Sherry B, Bukrinsky MI. Cell surface expression of cd147/emmprin is regulated by cyclophilin 60. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280:27866-27871
107. Najyb O, Brissette L, Rassart E. Apolipoprotein d internalization is a basigin-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290:16077-16087
108. Tang W, Hemler ME. Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and cd147/emmprin cell surface clustering. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:11112-11118
109. Zhao P, Zhang W, Tang J, Ma XK, Dai JY, Li Y, Jiang JL, Zhang SH, Chen ZN. Annexin ii promotes invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cells in vitro via its interaction with hab18g/cd147. *Cancer Sci*. 2010;101:387-395
110. Till A, Rosenstiel P, Brautigam K, Sina C, Jacobs G, Oberg HH, Seegert D, Chakraborty T, Schreiber S. A role for membrane-bound cd147 in nod2-mediated recognition of bacterial cytoinvasion. *Journal of cell science*. 2008;121:487-495
111. Berditchevski F, Chang S, Bodorova J, Hemler ME. Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with emmprin/basigin/ox47/m6. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272:29174-29180
112. Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH, Barclay AN, Halestrap AP. Cd147 is tightly associated with lactate transporters mct1 and mct4 and facilitates their cell surface expression. *The EMBO journal*. 2000;19:3896-3904
113. Yoshida S, Shibata M, Yamamoto S, Hagihara M, Asai N, Takahashi M, Mizutani S, Muramatsu T, Kadomatsu K. Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its n-terminal immunoglobulin domain. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2000;267:4372-4380
114. Sun J, Hemler ME. Regulation of mmp-1 and mmp-2 production through cd147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer research*. 2001;61:2276-2281
115. Sidhu SS, Mengistab AT, Tauscher AN, LaVail J, Basbaum C. The microvesicle as a vehicle for emmprin in tumor-stromal interactions. *Oncogene*. 2004;23:956-963
116. Tomita T, Nakase T, Kaneko M, Shi K, Takahi K, Ochi T, Yoshikawa H. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46:373-378
117. 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. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 2002;99:520-528
118. Riethdorf S, Reimers N, Assmann V, Kornfeld JW, Terracciano L, Sauter G, Pantel K. High incidence of emmprin expression in human tumors. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 2006;119:1800-1810
119. Major TC, Liang L, Lu X, Rosebury W, Bocan TM. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (emmprin) is induced upon monocyte differentiation and is expressed in human atheroma. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22:1200-1207
120. Schmidt R, Bultmann A, Ungerer M, Joghetaei N, Bulbul O, Thieme S, Chavakis T, Toole BP, Gawaz M, Schomig A, May AE. Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: Implications in acute myocardial infarction. *Circulation*. 2006;113:834-841
121. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, Bond BR, Gunasinghe HR, Etoh T, Goldberg AT, Zellner JL, Crumbley AJ. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation*. 2000;102:1944-1949
122. Song F, Zhang X, Ren XB, Zhu P, Xu J, Wang L, Li YF, Zhong N, Ru Q, Zhang DW, Jiang JL, Xia B, Chen ZN. Cyclophilin a (cypa) induces chemotaxis independent of its peptidylprolyl cis-trans isomerase activity: Direct binding between cypa and the ectodomain of cd147. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:8197-8203

123. Schmidt R, Bultmann A, Fischel S, Gillitzer A, Cullen P, Walch A, Jost P, Ungerer M, Tolley ND, Lindemann S, Gawaz M, Schomig A, May AE. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (cd147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor kappaB-dependent inflammation in monocytes. *Circulation research*. 2008;102:302-309
124. Sturhan H, von Ungern-Sternberg SN, Langer H, Gawaz M, Geisler T, May AE, Seizer P. Regulation of emmprin (cd147) on monocyte subsets in patients with symptomatic coronary artery disease. *Thrombosis research*. 2015;135:1160-1164
125. Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO, Wagner DD. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood*. 1998;91:1318-1324
126. Allain F, Vanpouille C, Carpentier M, Slomianny MC, Durieux S, Spik G. Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin b to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood t lymphocytes to extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:2714-2719
127. Xu Q, Leiva MC, Fischkoff SA, Handschumacher RE, Lyttle CR. Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267:11968-11971
128. Seizer P, Schonberger T, Schott M, Lang MR, Langer HF, Bigalke B, Kramer BF, Borst O, Daub K, Heidenreich O, Schmidt R, Lindemann S, Herouy Y, Gawaz M, May AE. Emmprin and its ligand cyclophilin a regulate mt1-mmp, mmp-9 and m-csf during foam cell formation. *Atherosclerosis*. 2010;209:51-57
129. Takahashi K, Takeya M, Sakashita N. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Med Electron Microsc*. 2002;35:179-203
130. Arora K, Gwinn WM, Bower MA, Watson A, Okwumabua I, MacDonald HR, Bukrinsky MI, Constant SL. Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *Journal of immunology*. 2005;175:517-522
131. Heinzmann D, Bangert A, Muller AM, von Ungern-Sternberg SN, Emschermann F, Schonberger T, Chatterjee M, Mack AF, Klingel K, Kandolf R, Malesevic M, Borst O, Gawaz M, Langer HF, Katus H, Fischer G, May AE, Kaya Z, Seizer P. The novel extracellular cyclophilin a (cypa) - inhibitor mm284 reduces myocardial inflammation and remodeling in a mouse model of troponin i -induced myocarditis. *PLoS one*. 2015;10:e0124606
132. Kim H, Kim WJ, Jeon ST, Koh EM, Cha HS, Ahn KS, Lee WH. Cyclophilin a may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages. *Clinical immunology*. 2005;116:217-224
133. Yang Y, Lu N, Zhou J, Chen ZN, Zhu P. Cyclophilin a up-regulates mmp-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via cd147 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2008;47:1299-1310
134. Pennings GJ, Yong AS, Kritharides L. Expression of emmprin (cd147) on circulating platelets in vivo. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2010;8:472-481
135. Seizer P, Fuchs C, von Ungern-Sternberg SN, Heinzmann D, Langer H, Gawaz M, May AE, Geisler T. Platelet-bound cyclophilin a in patients with stable coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Platelets*. 2016;27:155-158
136. Seizer P, Ochmann C, Schonberger T, Zach S, Rose M, Borst O, Klingel K, Kandolf R, MacDonald HR, Nowak RA, Engelhardt S, Lang F, Gawaz M, May AE. Disrupting the emmprin (cd147)-cyclophilin a interaction reduces infarct size and preserves systolic function after myocardial ischemia and reperfusion. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31:1377-1386
137. Tegeder I, Schumacher A, John S, Geiger H, Geisslinger G, Bang H, Brune K. Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis. *Journal of clinical immunology*. 1997;17:380-386
138. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science*. 2010;327:580-583

139. Wang CH, Dai JY, Wang L, Jia JF, Zheng ZH, Ding J, Chen ZN, Zhu P. Expression of cd147 (emmprin) on neutrophils in rheumatoid arthritis enhances chemotaxis, matrix metalloproteinase production and invasiveness of synoviocytes. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011;15:850-860
140. Dear JW, Leelahavanichkul A, Aponte A, Hu X, Constant SL, Hewitt SM, Yuen PS, Star RA. Liver proteomics for therapeutic drug discovery: Inhibition of the cyclophilin receptor cd147 attenuates sepsis-induced acute renal failure. *Critical care medicine*. 2007;35:2319-2328
141. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267:14998-15004
142. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley W, Clauss M, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267:14987-14997
143. Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K, Mita K, Takahashi E, Ando A, Inoko H, Ikemura T. Three genes in the human mhc class iii region near the junction with the class ii: Gene for receptor of advanced glycosylation end products, pbx2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics*. 1994;23:408-419
144. Yatime L, Andersen GR. Structural insights into the oligomerization mode of the human receptor for advanced glycation end-products. *FEBS J*. 2013;280:6556-6568
145. Ostendorp T, Weibel M, Leclerc E, Kleinert P, Kroneck PM, Heizmann CW, Fritz G. Expression and purification of the soluble isoform of human receptor for advanced glycation end products (srage) from pichia pastoris. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;347:4-11
146. Sarkany Z, Ikonen TP, Ferreira-da-Silva F, Saraiva MJ, Svergun D, Damas AM. Solution structure of the soluble receptor for advanced glycation end products (srage). *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:37525-37534
147. Koch M, Chitayat S, Dattilo BM, Schiefner A, Diez J, Chazin WJ, Fritz G. Structural basis for ligand recognition and activation of rage. *Structure*. 2010;18:1342-1352
148. Dattilo BM, Fritz G, Leclerc E, Kooi CW, Heizmann CW, Chazin WJ. The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units. *Biochemistry*. 2007;46:6957-6970
149. Hudson BI, Carter AM, Harja E, Kalea AZ, Arriero M, Yang H, Grant PJ, Schmidt AM. Identification, classification, and expression of rage gene splice variants. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22:1572-1580
150. Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz VV, Fahrenholz F, Nawroth PP, Bierhaus A, Postina R. Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283:35507-35516
151. Hudson BI, Kalea AZ, Del Mar Arriero M, Harja E, Boulanger E, D'Agati V, Schmidt AM. Interaction of the rage cytoplasmic domain with diaphanous-1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of rac1 and cdc42. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283:34457-34468
152. Toure F, Fritz G, Li Q, Rai V, Daffu G, Zou YS, Rosario R, Ramasamy R, Alberts AS, Yan SF, Schmidt AM. Formin mdia1 mediates vascular remodeling via integration of oxidative and signal transduction pathways. *Circulation research*. 2012;110:1279-1293
153. Ishihara K, Tsutsumi K, Kawane S, Nakajima M, Kasaoka T. The receptor for advanced glycation end-products (rage) directly binds to erk by a d-domain-like docking site. *FEBS letters*. 2003;550:107-113
154. Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D, et al. The receptor for advanced glycation end products (rage) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin

- in the developing nervous system. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270:25752-25761
155. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM. Rage and amyloid-beta peptide neurotoxicity in alzheimer's disease. *Nature*. 1996;382:685-691
156. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. Rage mediates a novel proinflammatory axis: A central cell surface receptor for s100/calgranulin polypeptides. *Cell*. 1999;97:889-901
157. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, Nagashima M, Morser J, Arnold B, Preissner KT, Nawroth PP. The pattern recognition receptor (rage) is a counterreceptor for leukocyte integrins: A novel pathway for inflammatory cell recruitment. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198:1507-1515
158. Leclerc E, Fritz G, Weibel M, Heizmann CW, Galichet A. S100b and s100a6 differentially modulate cell survival by interacting with distinct rage (receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282:31317-31331
159. Allmen EU, Koch M, Fritz G, Legler DF. V domain of rage interacts with ages on prostate carcinoma cells. *Prostate*. 2008;68:748-758
160. Sturchler E, Galichet A, Weibel M, Leclerc E, Heizmann CW. Site-specific blockade of rage- α prevents amyloid-beta oligomer neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28:5149-5158
161. Ostendorp T, Leclerc E, Galichet A, Koch M, Demling N, Weigle B, Heizmann CW, Kroneck PM, Fritz G. Structural and functional insights into rage activation by multimeric s100b. *The EMBO journal*. 2007;26:3868-3878
162. Demling N, Ehrhardt C, Kasper M, Laue M, Knels L, Rieber EP. Promotion of cell adherence and spreading: A novel function of rage, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type i cells. *Cell Tissue Res*. 2006;323:475-488
163. Zhong Y, Cheng CF, Luo YZ, Tian CW, Yang H, Liu BR, Chen MS, Chen YF, Liu SM. C-reactive protein stimulates rage expression in human coronary artery endothelial cells in vitro via ros generation and erk/nf-kappab activation. *Acta Pharmacol Sin*. 2015;36:440-447
164. Li XH, Lv BL, Xie JZ, Liu J, Zhou XW, Wang JZ. Ages induce alzheimer-like tau pathology and memory deficit via rage-mediated gsk-3 activation. *Neurobiol Aging*. 2012;33:1400-1410
165. Chen X, Zhang L, Zhang IY, Liang J, Wang H, Ouyang M, Wu S, da Fonseca AC, Weng L, Yamamoto Y, Yamamoto H, Natarajan R, Badie B. Rage expression in tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in glioma. *Cancer research*. 2014;74:7285-7297
166. Nankali M, Karimi J, Goodarzi MT, Saidijam M, Khodadadi I, Razavi AN, Rahimi F. Increased expression of the receptor for advanced glycation end-products (rage) is associated with advanced breast cancer stage. *Oncol Res Treat*. 2016;39:622-628
167. Wang D, Li T, Ye G, Shen Z, Hu Y, Mou T, Yu J, Li S, Liu H, Li G. Overexpression of the receptor for advanced glycation endproducts (rage) is associated with poor prognosis in gastric cancer. *PloS one*. 2015;10:e0122697
168. Zhang Q, Jin Y, Zhao CF, Wang WJ, Liu GY. Receptor for advanced glycation end-products (rage) is overexpressed in human osteosarcoma and promotes the proliferation of osteosarcoma u-2os cells in vitro. *Genet Mol Res*. 2016;15
169. Dahlmann M, Okhrimenko A, Marcinkowski P, Osterland M, Herrmann P, Smith J, Heizmann CW, Schlag PM, Stein U. Rage mediates s100a4-induced cell motility via mapk/erk and hypoxia signaling and is a prognostic biomarker for human colorectal cancer metastasis. *Oncotarget*. 2014;5:3220-3233
170. Bartling B, Hofmann HS, Weigle B, Silber RE, Simm A. Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (rage) supports non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis*. 2005;26:293-301

171. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269:9889-9897
172. Penfold SA, Coughlan MT, Patel SK, Srivastava PM, Sourris KC, Steer D, Webster DE, Thomas MC, MacIsaac RJ, Jerums G, Burrell LM, Cooper ME, Forbes JM. Circulating high-molecular-weight rage ligands activate pathways implicated in the development of diabetic nephropathy. *Kidney international*. 2010;78:287-295
173. Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ, Jr., Chow WS, Stern D, Schmidt AM. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nature medicine*. 1998;4:1025-1031
174. Aleshin A, Ananthkrishnan R, Li Q, Rosario R, Lu Y, Qu W, Song F, Bakr S, Szaboles M, D'Agati V, Liu R, Homma S, Schmidt AM, Yan SF, Ramasamy R. Rage modulates myocardial injury consequent to lad infarction via impact on jnk and stat signaling in a murine model. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2008;294:H1823-1832
175. Falcone C, Bozzini S, D'Angelo A, Matrone B, Colonna A, Benzi A, Paganini EM, Falcone R, Pelissero G. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary atherosclerosis: Possible correlation with clinical presentation. *Disease markers*. 2013;35:135-140
176. McNair ED, Wells CR, Qureshi AM, Basran RS, Pearce C, Orvold J, Devilliers J, Prasad K. Low levels of soluble receptor for advanced glycation end products in non-st elevation myocardial infarction patients. *The International journal of angiology : official publication of the International College of Angiology, Inc.* 2009;18:187-192
177. Yuan W, Ge H, He B. Pro-inflammatory activities induced by cypa-emmprin interaction in monocytes. *Atherosclerosis*. 2010;213:415-421
178. Ma S, Boerner JE, TiongYip C, Weidmann B, Ryder NS, Cooreman MP, Lin K. Nim811, a cyclophilin inhibitor, exhibits potent in vitro activity against hepatitis c virus alone or in combination with alpha interferon. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50:2976-2982
179. Malesevic M, Kuhling J, Erdmann F, Balsley MA, Bukrinsky MI, Constant SL, Fischer G. A cyclosporin derivative discriminates between extracellular and intracellular cyclophilins. *Angewandte Chemie*. 2010;49:213-215
180. Colgan J, Asmal M, Neagu M, Yu B, Schneidkraut J, Lee Y, Sokolskaja E, Andreotti A, Luban J. Cyclophilin a regulates tcr signal strength in cd4+ t cells via a proline-directed conformational switch in itk. *Immunity*. 2004;21:189-201
181. Christofferson DE, Yuan J. Cyclophilin a release as a biomarker of necrotic cell death. *Cell death and differentiation*. 2010;17:1942-1943
182. Damsker JM, Bukrinsky MI, Constant SL. Preferential chemotaxis of activated human cd4+ t cells by extracellular cyclophilin a. *Journal of leukocyte biology*. 2007;82:613-618
183. Seizer P, Klingel K, Sauter M, Westermann D, Ochmann C, Schonberger T, Schleicher R, Stellos K, Schmidt EM, Borst O, Bigalke B, Kandolf R, Langer H, Gawaz M, May AE. Cyclophilin a affects inflammation, virus elimination and myocardial fibrosis in coxsackievirus b3-induced myocarditis. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012;53:6-14
184. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196:887-896
185. Investigators E. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein iib/iiia receptor in high-risk coronary angioplasty. *The New England journal of medicine*. 1994;330:956-961
186. Koren MJ, Lundqvist P, Bolognese M, Neutel JM, Monsalvo ML, Yang J, Kim JB, Scott R, Wasserman SM, Bays H, Investigators M-. Anti-pcsk9 monotherapy for

- hypercholesterolemia: The mendel-2 randomized, controlled phase iii clinical trial of evolocumab. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63:2531-2540
187. O'Gorman MR, Thomas J. Isotype controls--time to let go? *Cytometry*. 1999;38:78-80
188. Alexaki VI, May AE, Fujii C, von Ungern-Sternberg SN, Mund C, Gawaz M, Chavakis T, Seizer P. S100a9 induces monocyte/ macrophage migration via emmprin. *Thrombosis and haemostasis*. 2017;117:636-639
189. Sorci G, RiuZZi F, Giambanco I, Donato R. Rage in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833:101-109
190. Chen B, Miller AL, Rebelatto M, Brewah Y, Rowe DC, Clarke L, Czapiga M, Rosenthal K, Imamichi T, Chen Y, Chang CS, Chowdhury PS, Naiman B, Wang Y, Yang D, Humbles AA, Herbst R, Sims GP. S100a9 induced inflammatory responses are mediated by distinct damage associated molecular patterns (damp) receptors in vitro and in vivo. *PloS one*. 2015;10:e0115828
191. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology*. 2007;7:678-689
192. Yang WI, Lee D, Lee da L, Hong SY, Lee SH, Kang SM, Choi DH, Jang Y, Kim SH, Park S. Blocking the receptor for advanced glycation end product activation attenuates autoimmune myocarditis. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2014;78:1197-1205
193. Sakaguchi M, Murata H, Yamamoto K, Ono T, Sakaguchi Y, Motoyama A, Hibino T, Kataoka K, Huh NH. Tirap, an adaptor protein for tlr2/4, transduces a signal from rage phosphorylated upon ligand binding. *PloS one*. 2011;6:e23132

8. Anhang

8.1. Buchstaben-Code der Aminosäuren

Tabelle 8-1 Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstaben-Code	Einbuchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Try	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin V	Val	V

8.2. Kristallstruktur Ig Domänen

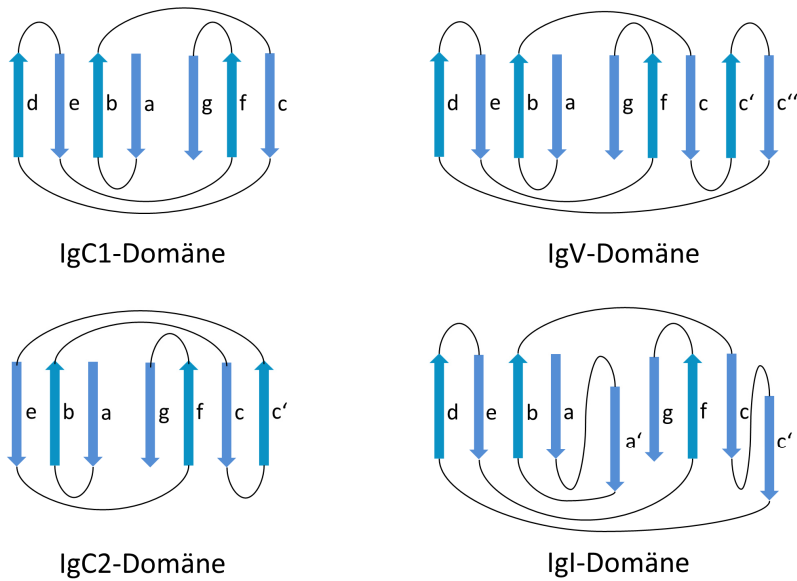


Abbildung 8-1 Die Kristallstruktur der Ig-Domänen.

C1-Typ: DEBA – GFC⁹⁵

C2-Typ: EBA – GFCC^{,94-96}

V-Typ: DEBA – GFCC'C^{,95}

I-Typ: DEBA – A'GFCC^{,94}

8.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Die verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten von Monozyten, Thrombozyten und Endothelzellen	7
Abbildung 1-2 Möglichkeiten der Monozyten-Thrombozyten Aggregation	8
Abbildung 1-3 Die Struktur von CyPA bei Raumtemperatur	9
Abbildung 1-4 Schematische Darstellung des Rezeptors CD147	12
Abbildung 1-5 CyPA-induzierte Aktivierung von Thrombozyten	15
Abbildung 1-6 Schematische Darstellung von RAGE	17
Abbildung 3-1 Sekretion von CyPA	49
Abbildung 3-2 Einfluss von CyPA auf die Thrombozyten Aktivierung und Thrombusbildung in vitro	50
Abbildung 3-3 Extrazelluläres CyPA führt zur Aktivierung und Adhäsion von murinen Thrombozyten in vitro	52
Abbildung 3-4 Extrazelluläres CyPA führt zur Aktivierung und Thrombusformation von murinen Thrombozyten in vitro und in vivo	54
Abbildung 3-5 Entwicklung und Screening nach einem spezifischen CyPA Antikörper.....	55
Abbildung 3-6 Funktionstest und Bindungsspezifität für die neu generierten CyPA Antikörper.	56
Abbildung 3-7 8H7-mAk hat einen entzündungshemmenden Effekt auf Monozyten in vitro	58
Abbildung 3-8 8H7-mAk hat einen entzündungshemmenden Effekt auf Monozyten in vivo	58
Abbildung 3-9 Die CyPA-abhängige Thrombozytenaktivierung wird durch 8H7-mAk gehemmt	59
Abbildung 3-10 8H7-mAk verringert die Entstehung von Thromben. Humanes Vollblut wird über eine Kollagenmatrix gegeben.....	61
Abbildung 3-11 8H7-mAk verringert den Gefäßverschluss in vivo	62
Abbildung 3-12 8H7-mAk hat keinen Einfluss Thrombozytenaktivität.....	62
Abbildung 3-13 Kolokalisation und Bindung von CyPA / CD147 an RAGE	65
Abbildung 3-14 Die Adhärenz und Migration von Monozyten wurde über die Rezeptoren RAGE und CD147 reguliert	68

Abbildung 3-15 RAGE ist an der CyPA-vermittelten Entzündungsreaktion beteiligt	69
Abbildung 3-16 CyPA vermittelt die Infiltration von Zellen in vivo	70
Abbildung 3-17 Eine Inhibierung von RAGE konnte die pro-thrombotischen Effekte von CyPA reduzieren	71
Abbildung 3-18 CyPA induziert über den AGE-Rezeptor pro-thrombotische Effekte.	72
Abbildung 4-1 Die Wirkweise von 8H7-mAk	78
Abbildung 8-1 Die Kristallstruktur der Ig-Domänen.	99

8.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Rekombinante Proteine	21
Tabelle 2-2 primäre Antikörper für Western Blot.....	21
Tabelle 2-3 Primäre anti-TAKTE Antikörper für Western Blot	21
Tabelle 2-4 Sekundäre Antikörper für Western Blot	22
Tabelle 2-5 FACS Antikörper	22
Tabelle 2-6 Fluoreszenzfärbung primäre Antikörper.....	22
Tabelle 2-7 Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz.....	23
Tabelle 2-8 Neutralisierende / Blockierende Antikörper	23
Tabelle 2-9 Chemikalien und Lösungen	23
Tabelle 2-10 Pufferlösungen	25
Tabelle 2-11 Zellkulturmedien.....	27
Tabelle 2-12 Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	27
Tabelle 2-13 Zelllinien	28
Tabelle 2-14 Medikamente / Betäubungsmittel	28
Tabelle 2-15 Verbrauchsmaterialien	28
Tabelle 2-16 Geräte und Software	29
Tabelle 2-17 Sitz der Hersteller / Firma.....	30
Tabelle 2-18 Antikörper in der Migrationskammer	40
Tabelle 2-19 Inkubationszeiten der Thrombusformation.....	43
Tabelle 8-1 Abkürzungen der Aminosäuren	98
Tabelle 8-2 Zusammensetzung des Trenngels pro Gel	103
Tabelle 8-3 Zusammensetzung des Sammelgels pro Gel.....	103

8.5. Zusammensetzung des Western Blot Gels

8.5.1. 15% Trenngel

Tabelle 8-2 Zusammensetzung des Trenngels pro Gel

H ₂ O	2,3 ml
1,5M Tris/HCl pH8,8	2,5 ml
Acrylamide/bis-acrylamide 30%	5 ml
10% SDS	100 µl
<hr/>	
10% APS	80 µl
TEMED	10 µl

8.5.2. Sammelgel

Tabelle 8-3 Zusammensetzung des Sammelgels pro Gel

H ₂ O	3,4 ml
1M Tris/HCl pH6,8	0,625 ml
Acrylamide/bis-acrylamide 30%	0,85 ml
10% SDS	50 µl
<hr/>	
10% APS	50 µl
TEMED	5 µl

8.6. Abkürzungsverzeichnis

$\alpha_{IIb}\beta_3$	CD41/CD61; GPIIb/IIIa
aa	englisch: amino acid; deutsch: Aminosäure
AAA	Abdominale Aorten Aneurysmen
ACD	„acid citrate dextrose“
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	„advanced glycation endproducts“
APC	Allophycocyanin
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca ²⁺	Kalzium
CD147	Cluster of Differentiation 147; Synonym: EMMPRIN („Extracellular Matrix MetalloProteinase Inducer“), Basigin („basic immunoglobulin superfamily“)
CD62P	P-Selektin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CDPA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
CsA	Cicosporin A
CCL	CC-Motif Chemokin Ligand
CRP	C-Reaktives Protein
CXCL	CXC-Motif Chemokin Ligand
CXCR	CXC-Motif Chemokin Rezeptor
CyPA	Cyclophilin A
CyPB	Cyclophilin B
DAMP	„Danger associated molecular pattern“

DC	Dendritische Zellen (Englisch: “dendritic cells”)
DCF	5-(and-6-)carboxyfluoresceindiacetatesuccinimidylester
Dia-1	Diaphanous-1
DPBS	„Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline“
EC	Extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötale Kälber Serum
FeCl ₃	Eisen(III)Chloride Lösung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	„Granulocyte/Monocyte-colony stimulating factor“
GP	Glykoprotein
GPIb	Glykoprotein Ib, CD42
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HMGB1	„High-Mobility-Group-Protein B1“
HUVEC	„Human Umbilical Vein Endothelial Cells“
HSC	Hämapoetische Stammzellen (englisch: “hemapoetic stem cells”)
IKK	IκB kinase
IL	Interleukin
INF	Interferon
i.v.	intravenös
i.p.	intraperitoneal
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LDL	Lipoprotein niederer Dichte (englisch: low density lipoprotein)

LPS	Lipopolysaccharide
Ly-6C	lymphocyte antigen 6 complex, locus C
Ly-6G	lymphocyte antigen 6 complex, locus G
MAC-1	$\alpha_M\beta_2$; CD11b/CD18
mAk	monoklonaler Antikörper
MCP-1	„monocyte chemoattractant protein-1“
M-CSF	„Monocyte-colony stimulating factor“
MCT	„Monocarboxylate transporter“
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MM284	nicht zellgängiges CsA Derivat
MMP	MatrixMetallo Proteinase
MP	Mikropartikel
MTA	Monozyten-Thrombozyten-Aggregate
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid adenin dinucleotid phosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Natruimcitrat
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	„nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells“
NIM811	zellgängiges CsA Derivat

nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OCS	„Open Canalicular system“
PAK	Primärer Antikörper
PI3 kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PPIase	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
PRP	Thrombozytenreiches Plasma
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAGE	„Receptor for advanced glycation Endproducts“
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (englisch: „reactive oxygen species“)
RT	Raumtemperatur
SAK	Sekundärer Antikörper
SDF1 α	„stromal cell-derived factor-1 α “
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
TCSF	“Tumor Cell-derived Collegenase Stimulating Factor”
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	„Transforming Growth Factor“
TIRAP	„Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein”
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	„tumor necrosis factor“
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VCAM	„vascular cell adhesion molecule”; CD106
vWF	van Willebrand Faktor

x g	Zentrifugationsgeschwindigkeit
μl	Mikroliter
+/+	Wildtyp
-/-	Knockout
°C	Grad Celsius

8.7. Publikationen und Kongressbeiträge

8.7.1. Publikationen

Schmohl JU, Daub K, **von Ungern-Sternberg SN**, Lindemann S, Schonberger T, Geisler T, Gawaz M, Seizer P. Differential mmp-9 activity in cd34progenitor cell-derived foam cells from diabetic and normoglycemic patients. *Herz*. 2013

Sturhan H*, **von Ungern-Sternberg SN***, Langer H, Gawaz M, Geisler T, May AE, Seizer P. Regulation of emmprin (cd147) on monocyte subsets in patients with symptomatic coronary artery disease. *Thrombosis research*. 2015;135:1160-1164 *share first authorship

Heinzmann D, Bangert A, Muller AM, **von Ungern-Sternberg SN**, Emschermann F, Schonberger T, Chatterjee M, Mack AF, Klingel K, Kandolf R, Malesevic M, Borst O, Gawaz M, Langer HF, Katus H, Fischer G, May AE, Kaya Z, Seizer P. The novel extracellular cyclophilin a (cypa) - inhibitor mm284 reduces myocardial inflammation and remodeling in a mouse model of troponin i -induced myocarditis. *PloS one*. 2015;10:e0124606

Seizer P, **von Ungern-Sternberg SN**, Schonberger T, Borst O, Munzer P, Schmidt EM, Mack AF, Heinzmann D, Chatterjee M, Langer H, Malesevic M, Lang F, Gawaz M, Fischer G, May AE. Extracellular cyclophilin a activates platelets via emmprin (cd147) and pi3k/akt signaling, which promotes platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35:655-663

Boesten DM, **von Ungern-Sternberg SN**, den Hartog GJ, Bast A. Protective pleiotropic effect of flavonoids on nad(+) levels in endothelial cells exposed to high glucose. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015;2015:894597

Chatterjee M, **von Ungern-Sternberg SN**, Seizer P, Schlegel F, Buttcher M, Sindhu NA, Muller S, Mack A, Gawaz M. Platelet-derived cxcl12 regulates monocyte function, survival, differentiation into macrophages and foam cells through differential involvement of cxcr4-cxcr7. *Cell death & disease*. 2015;6:e1989

Seizer P, Fuchs C, **von Ungern-Sternberg SN**, Heinzmann D, Langer H, Gawaz M, May AE, Geisler T. Platelet-bound cyclophilin a in patients with stable coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Platelets*. 2016;27:155-158

Alexaki VI, May AE, Fujii C, **von Ungern-Sternberg SN**, Mund C, Gawaz M, Chavakis T, Seizer P. S100a9 induces monocyte/ macrophage migration via emmprin. *Thrombosis and haemostasis*. 2017;117:636-639

von Ungern-Sternberg SN, Vogel S, Walker-Allgaier B, Geue S, Maurer A, Wild AM, Munzer P, Chatterjee M, Heinzmann D, Kremmer E, Borst O, Loughran P, Zerneck A, Neal MD, Billiar TR, Gawaz M, Seizer P. Extracellular cyclophilin a augments platelet-dependent thrombosis and thromboinflammation. *Thrombosis and haemostasis*. 2017;117:2063-2078

von Ungern-Sternberg SN, Zerneck A, Seizer P. Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer EMMPRIN (CD147) in Cardiovascular Disease. *International journal of molecular sciences*. 2018;19

Zhou Q, Maleck C, **von Ungern-Sternberg SN**, Neupane B, Heinzmann D, Marquardt J, Duckheim M, Scheckenbach C, Stimpfle F, Gawaz M, Schreieck J, Seizer P, Gramlich M. Circulating MicroRNA-21 Correlates With Left Atrial Low-Voltage Areas and Is Associated With Procedure Outcome in Patients Undergoing Atrial Fibrillation Ablation. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2018;11:e006242

8.7.2. Kongressbeiträge

8.7.2.1. Präsentation

S.N.I. von Ungern-Sternberg, E. Kremmer, G. Fischer, M. Gawaz, AE. May, P. Seizer. Development of a specific Cyclophilin A inhibitor. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, Deutschland 2014

D. Heinzmann, A. Bangert, A.-M. Müller, **S.N.I. von Ungern-Sternberg**, F. Emschermann, M. Malesevic, K. Klingel, R. Kandolf, M. Gawaz, H.-F. Langer, G. Fischer, Z. Kaya, A. May, P. Seizer. The novel extracellular CyPA-inhibitor MM284 reduces myocardial inflammation and remodelling in a mouse model of Troponin I induced myocarditis. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, Deutschland 2014

S.N.I. von Ungern-Sternberg, B. Walker-Allgaier, S. Vogel, E. Kremmer, T.R. Billiar, M. Gawaz, P. Seizer. Specific inhibition of extracellular CyPA affects platelet and monocyte functions *in vitro* and *in vivo*. Gesellschaft für Thrombose und Hämostase, Basel, Schweiz 2017

S.N.I. von Ungern-Sternberg, S. Vogel, B. Walker-Allgaier, E. Kremmer, O. Borst, M.D. Neal, T.R. Billiar, M.Gawaz, A.E. May, P. Seizer. Specific Inhibition of extracellular CyPA by an antibody reduces CyPA-induced pro-inflammatory and pro-thrombotic effects. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, Deutschland 2017

M. Gramlich, Q. Zhou, **S.N.I. von Ungern-Sternberg**, C. Frische, F. Stimpfle, M. Gawaz, J. Schreieck, P. Seizer. Circulating miRNA-21 correlates with left atrial fibrosis in patients with persistent atrial fibrillation. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, Deutschland 2017

8.7.2.2. Poster

S.N.I. von Ungern-Sternberg, P. Seizer, K. Schuster, M. Kaleqi, O. Borst, G. Fischer, M. Gawaz, A.E. May. Cyclophilin A activates human platelets via EMMPRIN and PI3-kinase

and promotes platelets adhesion to the vascular wall. Platelet meeting, Tübingen, Deutschland 2012

S.N.I von Ungern-Sternberg, O. Borst, G. Fischer, D. Heinzmann, H. Sturhan, E. Kremmer, M. Gawaz, A.E. May, P. Seizer. Development of a specific extracellular CyPA inhibitor. International Symposium on Cyclophilins and other Foldases: Cell Signalling Catalysts and Drug Targets, Halle/Saale, Deutschland 2013

P. Seizer, H. Sturhan, **S.N.I. von Ungern-Sternberg**, D. Heinzmann, B. Bigalke, T. Geisler, M. Gawaz, A. May. Regulation of EMMPRIN (CD147) on monocyte subsets in patients with acute myocardial infarction and aortic stenosis. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, Deutschland 2014

S.N.I. von Ungern-Sternberg, S. Vogel, B. Walker-Allgaier, S. Geue, M. Chatterjee, D. Heinzmann, E. Kremmer, O. borst, P. Loughran, A. Zerneck, M.D. Neal, T.R. Billiar, A.E. May, M. Gawaz, P. Seizer. Extracellular cyclophilin A augments platelet-dependent thrombosis and thrombo-inflammation without affecting physiological hemostasis. ESC, Barcelona, Spanien 2017

S.N.I. von Ungern-Sternberg, K. Posavec, D. Heinzmann, M. Gramlich, M. Gawaz, P. Seizer. S100A9 activates platelets via RAGE. ISH SSC, Dublin, Irland 2018

8.8. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Peter Seizer bedanken für die Vergabe dieses interessanten Themas, der Betreuung und wissenschaftlichen Unterstützung während der Doktorarbeit.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Andreas E. May für die Vergabe des Themas und der Betreuung während der ersten Zeit der Doktorarbeit.

Vielen Dank an Prof. Dr. Thilo Stehle für die Übernahme der Doktorarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen.

Ein riesen Dankeschön an Klaudia Posavec für die kontinuierliche Unterstützung und Hilfestellung bei den Experimenten.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Britta Walker-Allgaier, Frau Katja Metzger und Frau Tanja Schönberger für die Durchführung der Intravitalmikroskopie Versuche, sowie bei Frau Christina Flaum bei der Unterstützung bei der Durchführung der Western Blots.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Meinrad Gawaz für die Bereitstellung der Laborräumlichkeiten und der wissenschaftlichen Geräte.

Bei Sarah Gekeler und Lydia Laptev und den Labor Gawaz bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern die bei der Entstehung der aus der Doktorarbeit hervorgegangenen Publikationen beteiligt waren bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit bedanken.