

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Meinrad Gawaz

**Cyclophilin A und sein Rezeptor CD147  
bei myokardialer Ischämie und  
Reperfusion der Maus**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Sebastian Zach  
aus  
Bad Oeynhausen

2012

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtersteller:

Professor Dr. A. May

2. Berichtersteller:

Privatdozent Dr. T. Walker

Meiner Familie

## Inhaltsverzeichnis

### Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	8
1.1 Myokardinfarkt.....	10
1.1.1 Ursachen.....	10
1.1.2 Pathogenese des akuten Myokardinfarkts.....	10
1.1.3 Reperfusionsschaden.....	12
1.1.3.1 Freie Sauerstoffradikale.....	13
1.2 Das Immunglobulin CD147.....	15
1.2.1 Allgemeines.....	15
1.2.2 Funktion.....	17
1.2.2.1 Regulation von Matrix Metalloproteinasen (MMPs).....	18
1.2.2.2 Signalrezeptor für extrazelluläres CyPA.....	20
1.2.3 Bsg <sup>+/-</sup> und Bsg <sup>+/+</sup> Mäuse.....	22
1.3 Ppia <sup>-/-</sup> und Ppia <sup>+/-</sup> Mäuse (CyPA <sup>-/-</sup> und CyPA <sup>+/+</sup> ) .....	23
1.4 Fragestellung.....	24
2 Material und Methoden.....	26
2.1 Material.....	26
2.1.1 Chemikalien.....	26
2.1.2 Antikörper und Primer.....	28
2.1.3 Medikamente.....	29
2.1.4 Geräte.....	29
2.1.5 Software.....	29
2.1.6 Verbrauchsmaterialien.....	29
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 Ischämie/Reperfusionsmodell: Operationsdurchführung.....	31
2.2.1.1 Operationsvorbereitung.....	31
2.2.1.2 Operationsdurchführung.....	31
2.2.1.3 Postoperative Versorgung.....	33
2.2.1.4 Herzfärbung zur Bestimmung der „area at risk“ .....	33
2.2.1.5 Auswertung.....	34

## Inhaltsverzeichnis

2.2.2 Histologie.....	35
2.2.2.1 Objektträgerbeschichtung.....	35
2.2.2.2 Hämalaun und Eosin-Färbung.....	35
2.2.2.3 Immunhistologie.....	36
2.2.3 Statistische Auswertung.....	38
2.2.4 Proteinanalyse.....	38
2.2.4.1 Homogenisierung von Gewebe.....	38
2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	39
2.2.4.3 SDS-Page.....	39
2.2.4.4 Westernblot-Analyse.....	40
3 Ergebnisse.....	41
3.1 Infarktmorphologie CyPA-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion.....	41
3.1.1 Beurteilung der Infarktgröße .....	41
3.1.2 HE-Färbung im Grenzbereich des Infarkts.....	42
3.1.3 Immunhistochemie.....	44
3.1.3.1 Nachweis von Makrophagen.....	44
3.1.3.2 Nachweis neutrophiler Granulozyten.....	46
3.2 Infarktmorphologie CyPA-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion.....	49
3.2.1 HE-Färbung der Infarktnarbe.....	49
3.3 Infarktmorphologie von CD147+/- Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion.....	51
3.3.1 Beurteilung der Infarktgröße .....	51
3.3.2 Westernblot .....	52
3.3.3 HE-Färbung des inflammatorischen Infiltrats.....	53
3.3.4 Immunhistochemie.....	55
3.3.4.1 Nachweis von Makrophagen.....	55
3.3.4.2 Nachweis neutrophiler Granulozyten.....	57
3.3.4.3 Nachweis von MMP9-positiven Zellen.....	59

## Inhaltsverzeichnis

3.3.4.4 Nachweis von CyPA.....	61
3.4 Infarktmorphologie von CD147+/- Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion .....	63
3.4.1 HE-Färbung der Infarktnarbe.....	63
3.4.2 Immunhistochemie.....	65
3.4.2.1 Nachweis von Makrophagen.....	65
3.4.2.2 Nachweis MMP9-positiver Zellen.....	67
3.4.2.3 Nachweis von CyPA.....	69
3.5 Infarktmorphologie anti-CD147-behandelter Mäuse 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion .....	71
3.5.1 Beurteilung der Infarktgröße.....	71
3.5.2 HE-Färbung des inflammatorischen Infiltrats.....	72
3.5.3 Immunhistochemie .....	74
3.5.3.1 Nachweis von Makrophagen.....	74
3.5.3.2 Nachweis neutrophiler Granulozyten.....	76
3.6 Infarktmorphologie anti-CD147-behandelter Mäuse 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion .....	78
3.6.1 HE-Färbung der Infarktnarbe.....	78
4 Diskussion.....	81
4.1 Das Versuchsmodell.....	81
4.1.1 Die Maus als Versuchstier.....	81
4.1.2 Heterozygote CD147 Mäuse.....	83
4.1.3 Ligatur der LAD als Ischämie/Reperfusionsmodell.....	84
4.2 Auswirkung einer verminderten Expression von CD147 oder CD147- Inhibition und einer CyPA-Defizienz nach Ischämie/Reperfusion.....	87
4.2.1 Auswirkungen auf die Infarktgrößen.....	87
4.2.2 Auswirkung auf inflammatorische Prozesse.....	88
4.2.2.1 Versuchsreihen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion.....	88
4.2.2.2 Versuchsreihen 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion.....	89
4.2.3 Limitation der Studie.....	90

## Inhaltsverzeichnis

4.3 CD147 und CyPA bei kardiovaskulären inflammatorischen Prozessen...	92
4.4 Interaktion mit weiteren Cyclophilinen.....	94
5 Zusammenfassung.....	96
6 Abbildungsverzeichnis.....	98
7 Abkürzungsverzeichnis.....	100
8 Literaturverzeichnis.....	102
9 Danksagung.....	118
10 Lebenslauf.....	119

## Einleitung

### 1 Einleitung

Laut Auswertung des statistischen Bundesamtes belegten Herz-/Kreislaufkrankungen in der Todesursachenstatistik im Jahr 2008 mit über 43% aller Verstorbenen den ersten Platz wie auch in den Vorjahren. Der akute Myokardinfarkt war mit 7,4 % die häufigste singuläre Todesursache.<sup>59</sup> Nach der MONICA Studie liegt die Inzidenz des akuten Myokardinfarkts bei 330/100.000 bei Männern und 120/100.000 bei Frauen.<sup>153</sup> Dementsprechend wurden mit 35,2 Milliarden Euro im Jahr 2006 rund 15 % der Krankheitskosten für Herz-/Kreislaufkrankungen aufgewandt.<sup>58</sup>

Patienten mit akutem Myokardinfarkt leiden im Falle des Überlebens unter langfristigen Krankheitsverläufen. Zudem sind sie in ihrer Lebensqualität meist nachhaltig eingeschränkt. Viele Patienten werden invalide oder pflegebedürftig. Somit wird die Erwerbsunfähigkeit der Patienten auch volkswirtschaftlich relevant.

Deshalb ist ein genaueres Verständnis der Pathomechanismen des akuten Myokardinfarkts sowie die Entwicklung effektiverer Behandlungsstrategien dringlich.

Die derzeitige Therapie besteht aus der frühen Reperfusion mittels perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie (PTCA) und Stentimplantation. Diese limitiert die Infarktgröße und senkt die Mortalität.<sup>40,21,146</sup>

Das Remodelling ist von einer intensiven inflammatorischen Reaktion mit massiver leukozytärer Rekrutierung in das Infarktareal, der Induktion von inflammatorischen Cytokinen und Chemokinen sowie Matrix Metalloproteinasen (MMP) begleitet.<sup>39</sup> Diese Mechanismen spielen eine wichtige Rolle bei der Beseitigung nekrotischer Zellen sowie Matrixablagerungen aus der Läsion. Verschiedene Studien haben jedoch gezeigt, dass eine Inhibition der initialen leukozytären Infiltration durch gezielte Beeinflussung der leukozytären Adhäsionsrezeptoren die Verletzung im Infarktareal 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion (I/R) reduzieren kann.<sup>90,91,92</sup> Dennoch wirken diese protektiven Effekte nicht über die komplizierte Umbauphase von sieben

## Einleitung

Tagen.<sup>96,105</sup> Die exakte Rolle der MMPs ist zudem bisher nicht bekannt. Während die optimale Heilung einen balancierten MMP-gesteuerten Umbau der Matrix erfordert, ist eine MMP-Fehlsteuerung im Verdacht, einen intensivierten Remodellierungsprozess zu verursachen, der in Fibrose und Herzinsuffizienz resultiert. Folglich kann eine balancierte Inhibition sowohl der Infiltration durch Leukozyten als auch der durch MMPs vermittelten Fibrosierung womöglich einen Schlüsselmechanismus zum Erhalt der Herzleistung nach Herzinfarkt bieten.

Der extrazelluläre Matrix Metalloproteinase Induktor (Synonyme: EMMPRIN CD147, Basigin) und sein Ligand Cyclophilin A (CyPA) bilden ein Rezeptor/Liganden Paar, das sowohl die leukozytäre Rekrutierung als auch die MMP-Induktion beeinflusst.

CD147 ist bedeutend in die Regulation von MMPs verschiedener Zelltypen (z.B. Tumorzellen, Monozyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen), Wachstumsfaktoren wie VEGF (Tumorzellen, Endothelzellen) und NFκB-regulierter Zytokine wie IL-6 oder M-CSF (Monozyten, Makrophagen, Schaumzellen) involviert.<sup>125,126,127,132,149,17</sup>

CD147 ist bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt auf zirkulierenden Monozyten hochreguliert und moduliert die MMP9- und MT1-MMP-Aktivität.<sup>126</sup> Zusätzlich reduziert TIMP-2 primär das myokardiale Remodelling nach Myokardinfarkt durch Inhibition von MT1-MMP.<sup>166</sup>

CD147 dient als Oberflächenrezeptor für CyPA.<sup>166,5</sup> CyPA ist ursprünglich als intrazellulärer Ligand des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA) bekannt.<sup>5</sup> Bei Zellaktivierung oder Zellschädigung wird CyPA freigesetzt und bindet an seinen extrazellulären Rezeptor CD147.<sup>135,67,133</sup> Die CyPA-CD147-Interaktion induzieren inflammatorische Prozesse in verschiedenen Zelltypen wie z.B. Makrophagen/Monozyten oder glatten Muskelzellen.

## Einleitung

### 1.1 Myokardinfarkt

#### 1.1.1 Ursachen

Der akute Myokardinfarkt wird durch eine Störung der Durchblutung der Koronargefäße verursacht. Diese Mangelperfusion führt zur Ischämie. Das Myokard toleriert diese Ischämie zwei bis vier Stunden, bevor es zu sukzessivem Untergang der von den betroffenen Gefäßen versorgten Herzmuskelzellen kommt. Die entscheidende Rolle in der Pathogenese spielt die Plaqueruptur einer vulnerablen atherosklerotischen Plaque. Die Ruptur legt subendotheliales Gewebe frei, welches zu einer lokalen Thrombusbildung führt, die in einer Durchblutungsstörung resultiert.<sup>6</sup>

#### 1.1.2 Pathogenese des akuten Myokardinfarkts

Eine solche Koronarthrombose führt infolge einer Durchblutungsstörung zu einer Sauerstoff- und Nährstoffminderversorgung sowie einem ungenügenden Abtransport von Stoffwechselprodukten.

Wenn sich das ATP bei einer Ischämie in den Zellen verringert und das Glykogen metabolisiert ist, wird von aerober auf anaerobe Glykolyse umgestellt, so dass Laktat, Protonen und anorganisches Phosphat anfallen. Somit verringert sich die Kontraktilität der Kardiomyozyten, da die anaerobe Glykolyse den Energiebedarf der Zellen bei weitem nicht decken kann.<sup>64,62</sup> Die Entstehung der oben beschriebenen Stoffwechselprodukte senkt einerseits den intrazellulären pH-Wert, andererseits entsteht durch diese ein osmotischer Druck, der Wasser in die Zelle eindringen und die Zelle damit anschwellen lässt.<sup>63</sup>

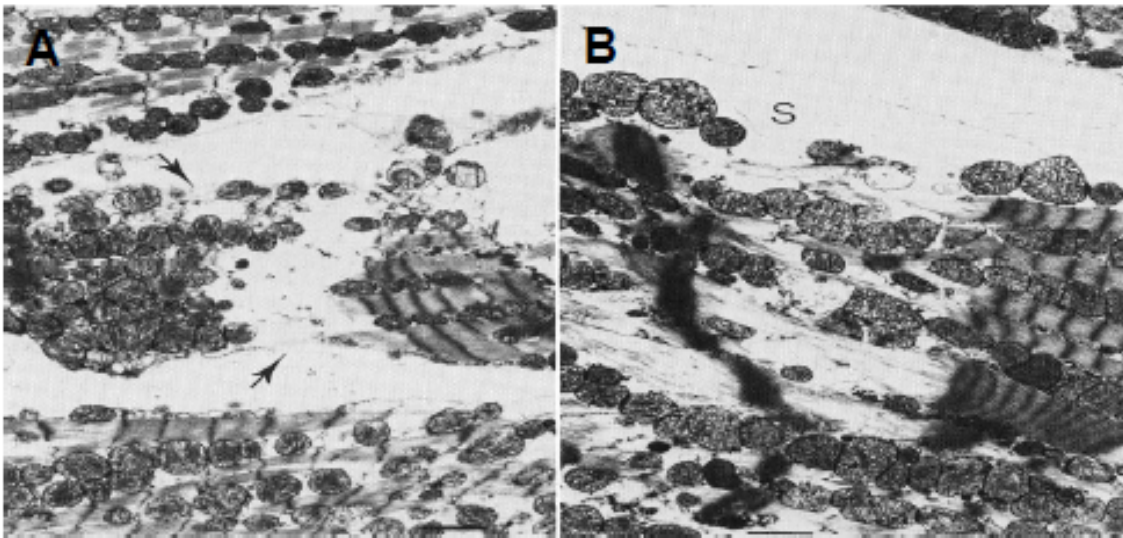
Dies führt zu einer Ansammlung von  $\text{Ca}^{2+}$  im Intrazellularraum, durch die Phospholipasen aktiviert werden, die zur Schädigung der Plasmamembran und damit der Extrazellulärmatrix beitragen.<sup>104</sup> Durch diese Schädigung verliert die Superoxid-Dismutase, eine Oxidoreduktase, die die Reaktion freier Sauerstoffradikale zu Wasserstoffperoxid katalysiert, an Aktivität.<sup>32</sup> Die Zelle

## Einleitung

verliert somit einen ihrer Schutzmechanismen gegen Radikale. Infolge dessen akkumulieren freie Radikale und peroxidieren die Lipide der Plasmamembran.<sup>104</sup>

Diese ischämische Schädigung der Myozyten findet sich elektronenmikroskopisch in Form von Veränderungen der Plasmamembran wie z.B. Rissen, Ödemen der Zellen und Mitochondrien, der Randstellung des nukleären Chromatins sowie fehlendes Glykogen.<sup>104</sup> Das Einreißen der Zellmembran stellt dabei den Übergang einer reversiblen zu einer irreversiblen Schädigung dar.<sup>141</sup> Diese irreversibel geschädigten Kardiomyozyten haben i.d.R. bereits auch die anaerobe Glykolyse weitestgehend eingestellt, so dass sie einen sehr geringen ATP-Gehalt dahingegen aber eine sehr hohe Konzentration an Protonen, Laktat, AMP und anorganischem Phosphat enthalten und somit einen hohen osmotischen Gradienten haben.<sup>117,62</sup>

Die Ischämie ist also ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -verbrauch aus dem eine Stoffwechsellentgleisung resultiert. Das Maß der Entgleisung hängt dabei entscheidend von der Dauer der Ischämie ab.



**Abb. 1 (modifiziert nach Nayler) Kardiomyozyten nach globaler Ischämie/Reperfusion:**

**A** Zellkontrakturen, Plasmaödem, sakrolemmale Diskontinuität (Pfeil) **B** Kontrakturbanden, sakrolemmale Spindeln (S) unter der Glykokalix und geschwollene Mitochondrien. Maßstab jew. 2  $\mu\text{m}$ .<sup>104</sup>

## Einleitung

Werden Kardiomyozyten nur kurzfristiger Ischämie ausgesetzt, ist ihre Funktionsfähigkeit nach Reperfusion auch nur kurzfristig in Form eines „stunned myocardium“ ausgesetzt. Nach langer und schwerer Ischämie hingegen können die Myozyten ihre Kontraktilität nicht wieder erlangen, da sie irreversibel geschädigt sind. Ist diese Ischämie nur lang aber nicht vollständig, geht das Myokard in eine Art „Winterschlaf“ über. Dieses „hibernating myocardium“ erlangt seine Kontraktionsfähigkeit nach der Einschränkung durch die Ischämie wieder.<sup>34</sup>

Es wird vermutet, dass die Kardiomyozyten ihre Aktivität in der Ischämiephase herunterregulieren, um Energie zu sparen und damit das Zellüberleben zu gewährleisten.<sup>75</sup> Allerdings ist die Kontraktilität des betäubten Gewebes im Falle eines „stunned myocardium“ bereits wenige Sekunden nach Beginn der Ischämie eingestellt. Das Erlangen der vollen Funktionsfähigkeit des Myokards nach Reperfusion dauert danach Stunden bis Tage.<sup>75,33</sup> Hierbei ist die Dauer der Regeneration von der Dauer und Schwere der Ischämie einerseits und einem ausreichenden Reperfusionsvolumen andererseits abhängig.<sup>75</sup>

### 1.1.3 Reperfusionsschaden

Die Wiederherstellung der Perfusion ist Voraussetzung für das Überleben von Myokard im Rahmen der Ischämie. Dies wird klinisch durch eine Ballondilatation ggf. mit Thrombusaspiration des betroffenen Koronargefäßes und Stentimplantation erreicht. Die Thrombolyse ist eine weitere Methode. Wie oben beschrieben ist eine schnelle Reperfusion entscheidend, um ischämiebedingte Schäden zu vermeiden.<sup>34</sup> Diese

Reperfusion ist allerdings paradoxerweise in der Lage, weiteren Zellschaden, sogenannten Reperfusionsschaden, zu verursachen.<sup>157</sup> Reperfusionsschaden lässt sich in Form des beschriebenen „stunned myocardium“, Zellnekrosen sowie mikrovaskulären und endothelialen Schäden beobachten. Eine

## Einleitung

Differenzierung erfolgt zwischen irreversibel geschädigten Zellen, deren Zelltod durch die Reperfusion allenfalls beschleunigt wird und reversibel geschädigten, potentiell lebensfähigen Myozyten, die irreversiblen Reperfusionsschaden davontragen können. Die Unterscheidung gestaltet sich allerdings schwierig, da sowohl Reperfusionsschäden als auch Ischämieschäden erst nach der Reperfusion sichtbar werden und die Pathologien sich nur schwer voneinander abgrenzen lassen.<sup>104</sup>

Für die Pathogenese des Reperfusionsschadens spielen freie Sauerstoffradikale und Calcium-Homöostasestörungen eine gewichtige Rolle. Beide Mechanismen beeinflussen sich dabei gegenseitig.

### **1.1.3.1 Freie Sauerstoffradikale**

Radikale besitzen freie, unpaare Elektronen im äußeren Orbital, so dass sie bestrebt sind, energetische Stabilität durch Oxidation eines anderen Moleküls zu erlangen. Dies macht sie hochreaktiv. Durch die Reaktion mit einem anderen Molekül bekommt dieses vorher stabile Molekül ein unpaares Elektron.<sup>94,39</sup>

Infolge der Reperfusion werden freie Sauerstoffradikale durch die Oxidation der Cyclooxygenase, die Xanthinoxidase und die Cytochromoxidase gebildet<sup>157</sup> oder vom NADPH-Oxidase-System aus der Zellmembran von stimulierten polymorphkernigen Granulozyten freigesetzt (PMN).<sup>69</sup> Letztendlich wird der Großteil der freien Sauerstoffradikale jedoch durch das Enzym Xanthindehydrogenase/-oxidase gebildet. Bei physiologischem Zellmilieu liegt das Enzym als Dehydrogenase vor, um Xanthin zu oxidieren. Der bei Ischämie vorherrschende intrazelluläre Calciumüberschuss sorgt dafür, dass das Enzym von einer Calciumabhängigen Protease zu einer Oxidase umgewandelt wird. Die Xanthinoxidase bildet aus Xanthin und molekularem Sauerstoff anionische Superoxidradikale. Das Substrat Xanthin bzw. Hypoxanthin steht im Rahmen der Reperfusion in großem Maß zur Verfügung, da dieses aus AMP gebildet wird.<sup>95</sup>

## Einleitung

Wie oben angedeutet entstehen durch die Reaktion mit ungesättigten Fettsäuren Peroxide, die das Sarkolemm der Zellen schädigen. Die Stickstoffoxidsynthese wird gemindert, wohingegen die Expression des Thrombozyten aktivierenden Faktors PAF durch Endothelzellen gesteigert wird, so dass neutrophile Granulozyten chemotaktisch angezogen werden.<sup>157</sup>

Physiologischerweise wird Stickstoffoxid permanent von Endothelzellen produziert und freigesetzt, während keine Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen besteht. Stickstoffoxid wirkt vasodilatatorisch und damit kardioprotektiv. Das verminderte Stickstoffoxid sorgt für eine Vasokonstriktion. Die Endothelzellen setzen durch Exozytose das in Weibel-Palade bodies gespeicherte P-Selektin frei, das die erste Phase der Einwanderung neutrophiler Granulozyten, die „Rolling“, initiiert. P-Selektin besitzt eine geringe Affinität zum PSGL-1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand-1) der neutrophilen Granulozyten.

Der Fluss der neutrophilen Granulozyten wird dadurch verlangsamt, so dass eine Interaktion zwischen CD18 und ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) der Endothelzellen entsteht. ICAM-1 ist permanent auf Endothelzellen exprimiert, die Expression wird jedoch im Bedarfsfall erhöht.<sup>78</sup> Dies markiert die zweite Phase, die „Adhäsion“. In der dritten Phase, der „Diapedese“, transmigrieren die neutrophilen Granulozyten mittels PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) durch die gap junctions der Endothelzellen. Im ischämischen Bereich verursachen die neutrophilen Granulozyten einen erheblichen Teil des Reperfusionsschadens durch ihre proinflammatorische Wirkung.<sup>68</sup>

## Einleitung

### 1.2 Das Immunglobulin CD147

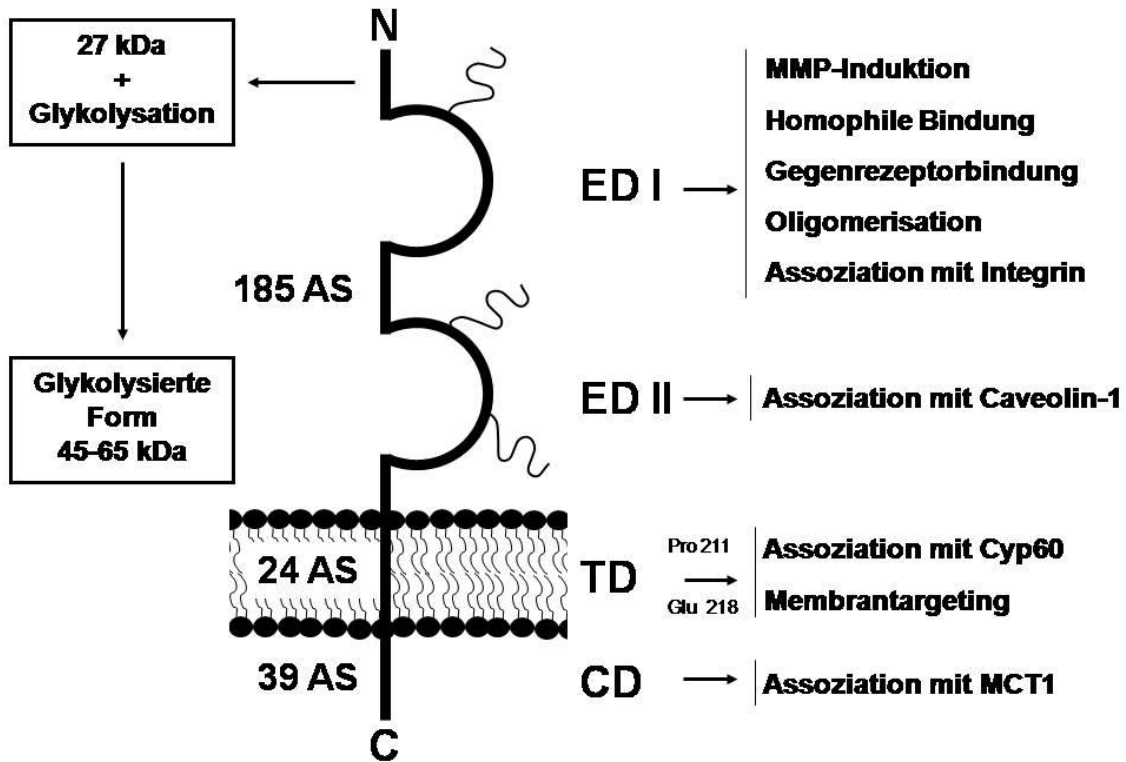
#### 1.2.1 Allgemeines

Das N-glykosylierte Immunglobulin<sup>144</sup> CD147 ist ebenso unter dem Namen EMMPRIN<sup>97</sup> (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer) bekannt. Bei der Maus heißt EMMRPIN Basigin (Bsg).<sup>76,2</sup> CD147 wurde 1982 auf Tumorzellen epithelialen Ursprungs entdeckt und wurde von seinem Entdecker, C. Biswas, TCSF (Tumor Cell-derived Collagenase Stimulating Factor) genannt. Er vermutete, Tumorzellen führten durch Interaktion zur Freisetzung eines Fibroblasten stimulierenden Faktors.<sup>15,13</sup> Nach der gänzlichen Identifizierung wurde TCSF aufgrund seiner Fähigkeit, die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen zu induzieren, zu CD147 umbenannt.<sup>13</sup> CD147 wurde unabhängig voneinander in verschiedenen Spezies nachgewiesen, so dass neben den bisher genannten Namen noch M6 für den Menschen,<sup>71</sup> ox-47 für die Ratte,<sup>38</sup> neben Neurothelin auch HT7 für das Huhn<sup>134,124</sup> und neben Basigin auch gp42 für die Maus existieren.<sup>2</sup>

Das Molekül besteht aus einer transmembranären, einer zytoplasmatischen und zwei extrazellulären Domänen, die Immunglobulinen ähneln. Es weist dabei ein glykosylierungsabhängiges Gewicht zwischen 35 und 64 kDa auf, wobei der Proteinkern selbst 27 kDa schwer ist.<sup>71,14</sup> CD147 besteht aus 187 Aminosäuren, wovon 40 auf die zytoplasmatische Domäne, 24 auf die transmembranäre Domäne und demnach 123 auf die beiden extrazellulären Domänen entfallen.<sup>71,38</sup> Die hydrophoben Aminosäuren der unter den genannten Spezies zu 96% konservierten Transmembrandomäne können teilweise Ladungen besitzen, so dass eine Interaktion mit anderen Membranproteinen bzw. intra- oder extrazellulären Faktoren wegen der sonst bestehenden energetischen Instabilität zustande kommt.<sup>65,98</sup> Über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den N-terminalen Ig-Domänen bildet CD147 mit anderen CD147-Proteinen Homo-Oligomere. Bei diesem „Clustering“ wird eine MMP-induzierende Wirkung ausgelöst.<sup>165,100,144</sup> CD147 kann aber auch als sein

## Einleitung

eigener Rezeptor wirken, um eine homophile Ligand-Rezeptor-Bindung an der N-terminalen Domäne einzugehen.<sup>144</sup> Die Interaktion mit den Integrinen  $\alpha_3\beta_1$  und  $\alpha_6\beta_1$  funktioniert vermutlich ebenfalls über die N-terminale Ig-Domäne.<sup>9</sup>



**Abb. 2 (Borst, modifiziert nach Nabeshima) Aufbau des Rezeptors CD147:** ED I und ED II – erste und zweite extrazelluläre Ig-Domäne; TD – transmembranäre Domäne; CD – zytoplasmatische Domäne. Mit den extrazellulären Domänen sind drei Oligosaccharide verbunden.<sup>16</sup>

Eine zweite extrazelluläre Ig-Domäne kann Caveolin-1 binden. Diese Bindung verhindert die CD147 Glykosylierung und vermindert dadurch das Clustering und somit die MMP-Induzierung.<sup>147,148</sup> Der Glykosylierungsgrad bestimmt die MMP-induzierende Aktivität von CD147. Nicht glykosyliertes CD147 antagonisiert sogar glykosyliertes CD147.<sup>50,70</sup>

Die Expression von CD147 auf der Zelloberfläche wird durch eine Interaktion zwischen Prolin 211 der transmembranären Domäne von CD147 und Cyp60 geregelt. Diese Interaktion reguliert die Überführung von CD147 vom Golgi-

## Einleitung

Apparat in die Plasmamembran.<sup>116</sup> Die Freisetzung hingegen erfolgt über proteolytische Abspaltung oder die Abschnürung CD147 von besetzten, instabilen Mikrovesikel, die kurz nach der Abschnürung zerfallen und so CD147 freigeben.<sup>136,100,15</sup>

### 1.2.2 Funktion

Mittlerweile weiß man, dass CD147 für die Freisetzung von Matrix Metalloproteinasen bei physiologischer und pathologischer Zellinteraktion verantwortlich ist.<sup>115</sup> CD147 fördert maßgeblich die Freisetzung von MMP-1, -2, -3, -4 sowie MT-MMP-1 und -2.<sup>162</sup> Das Vorkommen von CD147 ist dabei ubiquitär. Es konnte außer auf Tumorzellen auf endothelialen, epithelialen, hämatopoetischen Zellen und auf Leukozyten nachgewiesen werden.<sup>38</sup>

CD147 ist außer bei der Freisetzung von Matrix Metalloproteinasen an der Embryonalentwicklung, neuronaler Entwicklung, Retinafunktion, Reproduktion und T-Lymphozytenreifung beteiligt.<sup>60,61,118,72,52</sup> Bei pathologischen Prozessen wie Atherosklerose, Herzerkrankungen, rheumatoider Arthritis oder entzündlichen Lungenerkrankungen steigt das normal niedrige CD147-Expressionslevel stark an.<sup>10,138,37,154</sup>

CD147 und MMPs spielen beim Auf- und Abbau der Extrazellulärmatrix wie beim Menstruationszyklus eine wichtige Rolle, während dem CD147 abhängig vom Progesteronspiegel glykosyliert ist.<sup>108</sup>

Zudem induziert CD147 wie oben beschrieben die Produktion von Matrix Metalloproteinasen in Fibroblasten und ermöglicht so invasives und metastasierendes Wachstum. Zudem vermittelt CD147 via VEGF-Stimulation Angiogenese, so dass es beim Tumorwachstum eine wichtige Rolle spielt.<sup>100,144</sup>

CD147 interagiert wie oben beschrieben mit Integrinen<sup>9</sup> und Caveolin-1.<sup>147</sup> Außerdem dient es zur Integration von Monocarboxylat-Transportern (MCT) in die Zellmembran.

## Einleitung

### 1.2.2.1 Regulation von Matrix Metalloproteinasen (MMPs)

Es sind über 25 MMPs bekannt, die alle als zink- und calciumabhängige Endopeptidasen am hydrolytischen Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind.<sup>28,101</sup> Damit sind sie sowohl an physiologischen Erneuerungsprozessen von Gewebe wie auch bei pathologischen Umbauprozessen im Rahmen von entzündlichen Prozessen, Atherosklerose, Tumoren, Knochenentwicklung, Wundheilung, ovarieller Zyklus und Reproduktion entscheidend beteiligt.<sup>158,143,12,110,111,142,47,103</sup>

Die MMPs lassen sich in Kollagenasen (MMP-1,-8,-13 und -18), Gelatinasen (MMP-2 und -9), Stromelysine (MMP-3,-7,-10 und -11) und membranassoziierte MMPs (MT-MMP 1-4) unterteilen.<sup>160</sup>

Die Transkription der MMP wird durch IL-1 und IL-6, sowie TNF- $\alpha$  und CD40 stimuliert.<sup>81,93,128</sup> Freies CD147 bindet wie oben beschrieben an membranständiges CD147, um eine intrazelluläre Signalkaskade über „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK) zu initiieren, die die Transkription von MMPs induziert.<sup>80,163,144</sup> Dabei ist die Aktivität der MMPs nicht nur auf der Ebene der CD147-abhängigen Transkription von Zymogenen, sondern auch bei der posttranslationalen Aktivierung der Zymogene, der Interaktion freigesetzter MMPs mit der Extrazellulärmatrix und Gewebeinhibitoren der MMPs, sogenannten TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases), reguliert.<sup>101,143</sup>

Inaktive Pro-MMPs werden freigesetzt, die von Plasmin und anderen Proteasen wie MT-MMPs, Serin-Proteasen, Trypsin, Chymotrypsin und anderen aktivierten MMPs durch Abspaltung einer Prodomäne aktiviert werden,<sup>43,137,101</sup> so dass im Rahmen eines „Cystein-switch“ durch Abspaltung eines Cysteins das zinkhaltige Aktivitätszentrum der MMPs demaskiert wird.<sup>139</sup> MT-MMPs sind bereits nach deren Integration in die Plasmamembran aktiv, da die Prodomäne nicht abgespalten wird, sondern vielmehr zur Aktivierung anderer MMPs und zur Bindung von TIMPs dient.<sup>22</sup>

Die Inhibition der MMPs erfolgt durch spezifische, nicht kovalente Bindung eines TIMP an das aktive Zentrum einer MMP im Sinne einer

## Einleitung

Substratblockierung.<sup>48,18,99,120,7</sup>

Das Gleichgewicht zwischen Inhibition und Aktivierung beeinflusst die Stabilität der extrazellulären Matrix wesentlich.<sup>7</sup> Nach einem Myokardinfarkt ist dieses Gleichgewicht gestört. Es kommt zu einem selektiven TIMP-Abfall, der einen Anstieg der MMP9 und MMP2 nach sich zieht.<sup>84,68</sup> MMP9 wird von neutrophilen Granulozyten, und Makrophagen,<sup>88,150</sup> MMP-2 von Makrophagen, Fibroblasten und Myozyten sezerniert.<sup>150</sup> Die MMPs ermöglichen die Einwanderung von inflammatorischen Zellen, die nekrotische Myozyten phagozytieren und wiederum weitere MMPs freisetzen.<sup>88,39</sup> Das Maximum an aktiver MMP-2 wird sieben Tage nach Myokardinfarkt erreicht.<sup>150</sup> Die Verschiebung hin zur Proteolyse der Matrix kann Komplikationen wie Ruptur, Dilatation und Insuffizienz des linken Ventrikels verursachen.<sup>150</sup>

Die Rolle der MMP-2 und -9 zeigte sich Versuchen an Mäusen MMP-2- bzw. -9-defizienten Mäusen. Sie beeinflussen das Remodelling wesentlich, so dass bei den defizienten Mäusen nach Ligatur der LAD weniger Zellen der angeborenen Immunität einwanderten, der Kollagenabbau verringert war und weniger Ventrikelrupturen entstanden, während die Angiogenese gesteigert war.<sup>30,53,87</sup>

Bei der Atherosklerose spielen MMPs eine ähnliche Rolle.<sup>27,44</sup> Hier sind ebenfalls die MMP2 und MMP9 sowie MT1-MMP erhöht.<sup>19,85,107,45</sup> MMPs sind an allen Stadien der Atherosklerose beteiligt.<sup>28</sup>

Auf dem Sarkolemm der Kardiomyozyten findet sich eine basale CD147-Expression,<sup>131</sup> die sich nach Myokardinfarkt erhöht.<sup>126,138</sup> Die CD147-Expression von Monozyten beim akuten Myokardinfarkt korreliert dabei mit der MMP9-Aktivität im Plasma und der MT1-MMP-Aktivität.<sup>126</sup> Die Fibrose und verstärktes Remodelling induzierende MMP-Expression werden einerseits wie oben beschrieben durch CD147-CD147-Interaktion gesteuert,<sup>126,144,138,80,163</sup> andererseits ruft eine dauerhafte hohe myokardiale CD147-Expression eine vermehrte Rekrutierung aktiver MMPs hervor.<sup>168</sup>

## Einleitung

### 1.2.2.2 Signalrezeptor für extrazelluläres CyPA

CyPA ist ein weit verbreitetes vor allem zytosolisches Immunophilin mit einem Gewicht von 18 kDA, das den Hauptligand des Immunsuppressivums CsA bildet.<sup>36,51,24,41,89</sup> CyPA wird zudem von lebenden Zellen sezerniert und von nekrotischen bzw. absterbenden Zellen freigesetzt.<sup>67,135,161</sup> Demnach wurden erhöhte CyPA-Spiegel bei Sepsis,<sup>152</sup> rheumatoider Arthritis<sup>11</sup> und Schädigung glatter Muskelzellen der Gefäße festgestellt.<sup>67</sup> Im Falle der rheumatoiden Arthritis konnte eine Korrelation zwischen Schweregrad der Erkrankung und dem Expressionslevel von CyPA festgestellt werden.<sup>11</sup> Die inflammatorischen Prozesse werden wesentlich von CyPA und CyPB durch ihre chemotaktische Wirkung auf Monozyten, neutrophile Granulozyten,<sup>135,161</sup> eosinophile Granulozyten<sup>161</sup> und T-Lymphozyten beeinflusst.<sup>1</sup>

CyPA fördert nicht nur die Einwanderung, sondern auch die Degranulation eosinophiler Granulozyten. So werden Proteine wie Peroxidasen im geschädigten Areal ausgeschüttet. Somit können CyPA exprimierende Gewebe auf Entzündungsstimuli durch Freisetzung von CyPA reagieren, welche zur Migration und Aktivierung von Leukozyten führt. Diese Fähigkeit von CyPA wird durch Bindung des Immunsuppressivums CsA blockiert.<sup>42,161,67</sup>

Aufgrund seiner Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase (PPIase)-Aktivität ist CyPA bedeutend für die Proteinfaltung.<sup>77</sup> Die chemotaktischen Eigenschaften von CyPA sind offenbar ebenfalls mit dessen PPIase-Aktivität verbunden, wie an der durch CyPA induzierten Chemotaxis gegenüber CsA gezeigt wurde.<sup>113,135</sup>

Dabei ist CD147 für von CyPA induzierte Signalkaskaden der Chemotaxis und der Adhäsion von Immunzellen essentiell, scheint aber die Proliferation von glatten Muskelzellen nicht zu beeinflussen. Möglicherweise sind an dieser Stelle noch nicht identifizierte Rezeptoren beteiligt.<sup>167</sup> Die primäre Bindung von CyPA erfolgt an der Zelloberfläche durch Heparansulfatproteoglykanen (HSPGs), einer Untergruppe der Glykosaminoglykane, woraufhin das gebundene CyPA CD147 präsentiert wird, um eine CyPA-CD147-Interaktion durch die Rotamatase-Aktivität von CyPA zu ermöglichen.<sup>167,166</sup>

## Einleitung

Wie oben beschrieben wird CD147 aus dem Golgi-Apparat nach Bindung des intrazellulären CyP60 an das Prolin 211 von CD147 transportiert. Prolin 211 befindet sich zwischen transmembranärer und extrazellulärer Domäne von CD147. Nach der Integration in die Plasmamembran interagiert CyPA über HSPG mit dem Prolin 180 der extrazellulären Domäne von CD147.<sup>166,116,167</sup>

Eine ähnliche Interaktion dieser Moleküle wird auch bei HIV-1-Infektionen beobachtet, wo CD147 als Rezeptor für das Virion-assoziierte CyPA fungiert und so den Viruseintritt in die Wirtszelle und das „Uncoating“ in dieser unterstützt.<sup>160</sup>

Der Beitrag von extrazellulärem CyPA zur Rekrutierung und anschließenden Akkumulation zirkulierender Leukozyten in entzündlich verändertem Gewebe über Interaktion mit CD147 macht eine wichtige Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques wahrscheinlich. Bei der Rekrutierung wird die leukozytäre CD147-Expression nach deren Eintritt in entzündetes Gewebe herunterreguliert, was deutlich macht, dass CD147 vor allem für Leukozytenrekrutierung während der Phase der Entzündungsreaktion wichtig ist.<sup>5</sup>

Während der Atherogenese wird CyPA exprimiert, so dass es sich in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und extrazellulär nahe der Lamina elastica atherosklerotischer Plaques nachweisen lässt.<sup>66</sup> Da es infolge oxidativen Stresses freigesetzt wird, wird es als secreted oxidative stress-induced factor (SOXF) beschrieben, der die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in gleichem Maß wie Apoptose fördert.<sup>66,67</sup>

Verschiedene inflammatorische Stimuli sorgen für eine Liberation von CyPA aus Monozyten bzw. Makrophagen,<sup>135</sup> Gefäßmuskelzellen<sup>145</sup> und Endothelzellen.<sup>74</sup>

Diese Stimuli verursachen zumeist oxidativen Stress. Unter anderem zeigt das Endotoxin gramnegativer Bakterien Lipopolysaccharid (LPS) eine derartige Wirkung.<sup>74</sup>

CyPA induziert durch seine PPlase-Aktivität die Freisetzung von IL-6 durch Makrophagen.<sup>112</sup> Bei Monozyten und Makrophagen wird außerdem durch die

## Einleitung

nukleäre Translokation bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B die Freisetzung von Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1 und IL-1 $\beta$  sowie der Gelatinase MMP9 stimuliert.<sup>73</sup> Zudem wird die MMP9-Freisetzung durch Monozyten und Makrophagen durch direkte Bindung von CD147 von CyPA über Aktivierung des MAPK-Signalwegs im Falle der rheumatoiden Arthritis induziert.<sup>164,121</sup> Dieselbe Signalkaskade führt auch zu vermehrtem Zellwachstum und verstärkter Chemotaxis.<sup>164,121,83</sup>

### 1.2.3 Bsg<sup>+/-</sup> und Bsg<sup>+/+</sup> Mäuse

Die in der vorliegenden Arbeit zu experimentellen Zwecken verwendeten Versuchstiere wurden aus dem Mausstamm C57/Bl6 gezüchtet. Die offizielle Bezeichnung der CD147-defizienten Mäuse lautet Bsg<sup>-/-</sup>. Zur Vereinheitlichung werden diese im folgenden mit CD147<sup>-/-</sup> anstatt Bsg<sup>-/-</sup> bezeichnet. In unseren Händen wurde keine CD147<sup>-/-</sup> Maus ausgetragen, was am ehesten auf die geschwächte Trophoblasten-Implantation zurückzuführen ist, die eine adäquate MMP-Sekretion erfordert. Für die vorliegende Studie wurden daher Mäuse mit verminderter CD147-Expression (CD147<sup>+/-</sup> bzw. Bsg<sup>+/-</sup>) und Wildtyp Mäuse (CD147<sup>+/+</sup>) verglichen.<sup>140</sup>

## Einleitung

### 1.3 Ppia<sup>-/-</sup> und Ppia<sup>+/-</sup> Mäuse (CyPA<sup>-/-</sup> und CyPA<sup>+/-</sup>)

Die aus dem Mausstamm 129S6/SvEv<sup>24</sup> gezüchteten Ppia<sup>tm1Lubn</sup>/J Mäuse heißen nach dem für CyPA kodierenden Gen Ppia<sup>-/-</sup> oder CyPA<sup>-/-</sup>. Im folgenden werden die Versuchstiere mit CyPA<sup>-/-</sup> benannt. CyPA<sup>-/-</sup> Mäuse sind lebensfähig und ohne Verhaltensauffälligkeiten. Ihre Reproduktionsfähigkeit ist allerdings eingeschränkt. So ist die Anzahl der Tiere pro Wurf um ein Viertel gegenüber Wildtypmäusen reduziert.

Es werden zudem vermehrt Splenomegalien beobachtet. Außerdem entwickeln ein Drittel der homozygoten Mäuse drei Monate nach Geburt eine Blepharitis, die mit Infiltraten eosinophiler Granulozyten in Herz, Pankreas und Leber einhergehen kann.

Bei unauffälliger T-Zell-Reifung zeigt sich eine erhöhte Anzahl an CD4- und CD8-positiven Zellen im Blut. Der IgG1- und IgE-Spiegel ist ebenfalls erhöht.<sup>23</sup>

Da CyPA als Ligand von CsA bekannt ist, konnte eine fehlende Immunsuppression nach CsA-Gabe bei CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt werden.<sup>24</sup>

## Einleitung

### 1.4 Fragestellung

Mein vorrangiges Ziel ist zu klären, welche Auswirkung die Beeinflussung der CD147-CyPA-Achse auf die Leukozyteninfiltration im Rahmen des akuten Myokardinfarkts hat. Unsere Arbeitsgruppe hat hierzu drei Tiermodelle der Maus untersucht. Zusätzlich zu der von mir untersuchten Leukozyteninfiltration wurde die Infarktgröße bestimmt.

CD147 und CyPA spielen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung inflammatorischer Zellen.<sup>38</sup>

Bisher wurden ausschließlich die Effekte einer verminderten CD147-Expression oder einer CD147-Inhibition auf die Infarktgröße untersucht. Es wird allerdings vermutet, dass auch andere Rezeptoren von CyPA existieren.<sup>167</sup>

Daher ist es für das Verständnis der pathophysiologischen Auswirkungen einer Beeinflussung der CD147-CyPA-Achse auf die Infarktgröße nach Ischämie/Reperfusion (I/R) wichtig, ob sich eine Defizienz des Liganden CyPA ähnlich auf die Leukozyteninfiltration und Infarktgröße wie eine verminderte CD147-Expression oder eine CD147-Inhibition auswirkt.

Die Hypothese der vorliegenden Studie ist, dass die Beeinflussung der CD147-CyPA-Achse eine verminderte leukozytäre Rekrutierung und Inflammation verursacht, die zu verminderten Infarktgrößen führt.

Die vorliegende Studie untersucht die Auswirkungen einer CyPA-Defizienz auf die Infarktgröße nach Ischämie/Reperfusion und charakterisiert CyPA<sup>-/-</sup>-defiziente Mäuse, Mäuse mit verminderter CD147-Expression und anti-CD147-behandelte Wildtypmäuse nach Ischämie/Reperfusion hinsichtlich ihrer histologischen Veränderungen gegenüber den Kontrollgruppen.

Dazu werden HE-Färbungen und immunhistochemische Färbungen der CD147-CyPA-Achse sowie von Immunzellen angefertigt.

Die so gewonnenen Erkenntnisse sollen ein besseres Verständnis über die inflammatorischen Prozesse im Rahmen des Remodelling und die Rolle der CD147-CyPA-Achse ermöglichen. Diese Erkenntnisse können unter Umständen dazu beitragen, Möglichkeiten zu finden, die CD147-CyPA-Achse

## Einleitung

gezielt im Rahmen der Ischämie/Reperfusion zu beeinflussen, um die Infarktgröße und Funktionseinschränkungen nach Ischämie/Reperfusion zu verringern. Eine solche Beeinflussung könnte den Anstoß zu weiteren Studien geben, die den Einfluß der CD147-CyPA-Achse im Rahmen des akuten Myokardinfarkts weiter ergründet und schließlich den Ansatz zu neuen, adjuvanten therapeutischen Maßnahmen bieten.

## Material und Methoden

### 2 Material und Methoden

#### 2.1 Material

##### 2.1.1 Chemikalien

Albumin bovine serum, fraction V >96%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen
Ammoniumpersulfat	RheinPerChemie GmbH, Hamburg
aTaq DNA Polymerase	Promega GmbH, Mannheim
Bench Mark Frestained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biotin blocking system	Dako, Glostrup - Dänemark
Citronensäure 99,5%, A.C.S. Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA-Leiter	Promega GmbH, Mannheim
dNTP Mix 25 mM	Promega GmbH, Mannheim
EDTA 0,5M pH 8	Invitrogen, Karlsruhe
Eosin G f.d.M.	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Eukitt	Kindler GmbH, Freiburg
Ethanol 99% vollständig vergällt mit MEK (Bitrex)	SAV, Flintsbach
Ethidiumbromid	Promega GmbH, Mannheim
Evans Blue 0,5 %ig	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd 4 %ig	Merck, Darmstadt
Hämalaunlösung sauer nach Mayer für die Mikroskopie	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Ladepuffer 6x	Promega GmbH, Mannheim

## Material und Methoden

Liquid DAB + substrate chromogen system	Dako, Glostrup - Dänemark
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Goat IgG – isotype control	Vector Laboratories, Burlingame - USA
Goat serum (normal)	Dako, Glostrup - Dänemark
Magnesiumchlorid	Promega GmbH, Mannheim
Natriumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	AppliChem, Darmstadt
Negative control rabbit immunoglobulin fraction (solid-phase absorbed)	Dako, Glostrup - Dänemark
PBS-tablets	Invitrogen, Karlsruhe
Polyacrylamidgel 10 %ig	
Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurate (Tween 20)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein-Assay Farbstoffkonzentrat	BioRad, München
Rabbit serum (normal)	Dako, Glostrup - Dänemark
Rat IgG1, kappa monoclonal isotype control	Abcam, Cambridge - UK
Rat IgG2b, kappa monoclonal isotype control	Biolegend, San Diego - USA
Roti-Histol	Roth, Karlsruhe
Rotiporese	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
Strept AB Complex/HRP	Dako, Glostrup - Dänemark
TEMED	Roth, Karlsruhe
Thermophiler DNA Polymerase Puffer 10x	Promega GmbH, Mannheim
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tri-Natriumcitratdihydrat p.a.	AppliChem, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe

## Material und Methoden

Triton X 100	Fluca, Buchs
TTC- (2,3,5 Triphenyltetrazolim-Chlorid) 1 %ig	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.1.2 Antikörper und Primer

#### Erstantikörper

Goat anti-CD147 (WB)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz – USA
MMP9 goat polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz - USA
Purified rat anti-mouse mac3	BD Pharmgen, Heidelberg
Rabbit polyclonal to Cyclophilin A	Abcam, Cambridge - UK
Rat-anti-mouse PMN	GeneTex, Irvine - USA
Rat monoclonal to CD147	Abcam, Cambridge - UK

#### Zweitantikörper

Polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulins/biotinylated	Dako, Glostrup - Dänemark
Polyclonal rabbit anti-goat immunoglobulins/biotinylated	Dako, Glostrup - Dänemark
Polyclonal rabbit anti-rat immunoglobulins/biotinylated	Dako, Glostrup - Dänemark
Rabbit anti-goat-HRP	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz – USA

#### Primer

Basigin forward 5'-TCG-CCT-TCA-CGC-TCT-TGA-GC-3'	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg
Basigin reverse 5'-GCC-TCA-TCT-CTA-AGA-TCA-CT-3'	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg

## Material und Methoden

### 2.1.3 Medikamente

Antisedan	Pfizer GmbH, Karlsruhe
Bepanthen	Bayer Vital, Leverkusen
Domitor	Pfizer, Karlsruhe
Fentanyl	Curamed pharma GmbH, Karlsruhe
Flumazenil Kabi 0,1mg/ml	Fresenius Kabi Dtsch GmbH, Bad Homburg
Isoflo	Albrecht GmbH, Aulendorf
Midazolam	Ratiopharm, Ulm
Ringerlösung	Roth, Karlsruhe
Temgesic	ESSEX PHARMA GMBH, München

### 2.1.4 Geräte

Cybershot DSC W40	Sony Deutschland GmbH, Berlin
Mikroskop Optiphot - 2	Nikon, Tokyo - Japan
Mikrotom Jung Multicut	Reichert, New York - USA
Tissue Tec	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwonde, NL

### 2.1.5 Software

NIS Elements BR 2.10	Nikon, Tokyo - Japan
SPSS 15.1.1 für Windows	SPSS Inc, Chicago - USA

### 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Venlo - Niederlande
Faden 6-0-Perma Hand Seide schwarz	Ethicon, Norderstedt
Faden 6-0 Prolene blau	Ethicon, Norderstedt

## Material und Methoden

Faden 6-0-Vicryl	Ethicon, Norderstedt
Faden 8-0 Vicryl	Ethicon, Norderstedt
Gel-Kassette	Invitrogen, Carlsbad - USA
Objektträger Super Frost Plus	R. Langenbrink, Emmendingen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Polyethylenschlauch	Polyethylene Tubing, SIMS Portex Ltd,
Außendurchmesser 0,61mm, Innendurchmesser 0,28mm	SIMS trademarks, UK

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Ischämie/Reperfusionsmodell: Operationsdurchführung

##### 2.2.1.1 Operationsvorbereitung

Die Operation wird von einer Tierärztin durchgeführt. Dabei wird eine Kombinationsnarkose aus dem alpha2-Adrenozeptoragonisten Medetomidin (Domitor) in einer Dosierung von 0,5mg/kg Körpergewicht, dem Benzodiazepin Midazolam mit 5mg/kg Körpergewicht und dem Opioid Fentanyl mit 0,05mg/kg Körpergewicht<sup>54</sup> mittels intraperitonealer Injektion vorgenommen.

Daraufhin wird die Maus rasiert und enthaart, um mechanisch mit isotoner Kochsalzlösung gereinigt und anschließend desinfiziert zu werden. Zum Schutz der Augen wird Augensalbe verwendet (Bepanthen).

Die Temperatur wird über eine mit einer Rektalsonde gekoppelten Wärmematte konstant bei  $37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  gehalten.

##### 2.2.1.2 Operationsdurchführung

Der Eingriff wird mit zwölfacher Vergrößerung unter einem Stereomikroskop (Zeiss, Deutschland) durchgeführt.

Das Versuchstier wird dafür zunächst per Maske und nach Tracheotomie durch Intubation beatmet. Der Sauerstoff-Flow beträgt 0,8l/min, als Erhaltungsdosis dient eine Einstellung von 0,7 – 1,5 Volumenprozent Isofluran (Isoflo).

Anschließend erfolgt die Thorakotomie in rechter Seitlage möglichst über dem Herzspitzenstoß (i.d.R. im vierten Interkostalraum). Zur vollständigen Eröffnung des Thorax wird der Schnitt nach ventral und dorsal erweitert, um die Musculi cutaneus trunci, serratus ventralis thoracis, intercostales externi und intercostales interni zu durchtrennen. Kleinere Blutungen werden mittels Saugtupfer (Ethikeil) gestillt.

Ein Rippenspreizer hält den Thorax offen, damit das Perikard gefenstertert werden kann, um die linke Herzseite freizulegen.

## Material und Methoden

Die LAD (left anterior descending artery) wird in der Facies auricularis unterhalb des linken Herzohres aufgesucht und aufgrund ihrer hellen Farbe von den dunkleren Coronarvenen abgegrenzt. Das Herzohr wird mit einem auf 1mm Seitenlänge zugeschnittenem Tupfer (Ethikeil) nach kranial geschoben, damit sich die Facies auricularis besser einsehen lässt.

Daraufhin wird die LAD mit einem Faden (6-0 Perma Hand Seide schwarz) unterstochen und eine Schlaufe gebildet. Darunter wird ein ca. 2mm langer Polyethylenschlauch gelegt und die Schlaufe festgezogen, so dass die Ligatur später wieder durch Aufziehen der Schlaufe entfernt werden kann.

Die erfolgreiche Ligatur lässt sich daran überprüfen, dass die LAD distal der Ligatur durch den fehlenden Blutfluss nicht mehr sichtbar wird, die Herzfrequenz der Maus ischämiebedingt ansteigt oder Arrhythmien auftreten.

Für die 30-minütige Ligatur wird der Rippenspreizer wieder geschlossen, um Organaustrocknung zu vermeiden. Die Wundränder werden mit Ringerlösung feucht gehalten. Der korrekte Sitz des Fadens und des Polyethylenschlauchs wird alle 5min überprüft.

Nach 30min wird die Schlaufe gelöst und der Polyethylenschlauch entfernt. Der Faden verbleibt im Gewebe, um die Ligatur für die Färbung (siehe unten) erneut an exakt derselben Stelle setzen zu können.

Zum Verschluss des Thorax wird der Rippenspreizer entfernt und die Inzision zwischen den Rippen mit Einzelknopfnähten verschlossen. Dazu werden die Fäden (6-0-Vicryl) zunächst um die 4. und 5. Rippe vorgelegt und anschließend festgezogen. Muskelschichten und Faszie werden mit einer fortlaufenden Naht (6-0 Vicryl) verschlossen. Die Haut wird mit Einzelknopfnähten (6-0 Prolene) zugenäht.

Zur Narkoseausleitung wird die Isofluranzufuhr wenige Minuten vor Extubation auf 0,5% gesenkt. Nach Hautnaht wird Isofluran abgesetzt und die Sauerstoffzufuhr erhöht.

Zur postoperativen Analgesie wird Buprenorphin (Temgesic) wegen der langsamen Anflutung bereits 30min vor Beendigung der Operation subkutan mit

## Material und Methoden

Dosierung von 0,1mg/kg Körpergewicht gegeben.

Anschließend erfolgt die Extubation und der Verschluss der Trachea mit Einzelknopfnähten (8-0 Vicryl), bzw. der Haut (6-0 Prolene blau).

Zur Antagonisierung der Narkose wird daraufhin eine Kombination aus Atipamezol (Antisedan) mit einer Dosierung von 2,5mg/kg Körpergewicht und Flumazenil (Flumazenil Kabi 0,1mg/ml) in einer Dosierung von 0,5mg/kg Körpergewicht verabreicht.

### **2.2.1.3 Postoperative Versorgung**

Die Maus verbleibt unter der Atemmaske, bis sie vollständig aus der Narkose erwacht ist und wird danach in einen mit einer Rotlichtlampe bestrahlten Einzelkäfig gesetzt, um sie vor Auskühlung zu schützen.

Das Versuchstier erhält Nahrung nach Bedarf.

Nach acht Stunden werden die Versuchstiere erneut subkutan mit Buprenorphin (Temgesic) in einer Dosierung von 0,1mg/kg Körpergewicht analgesiert.

### **2.2.1.4 Herzfärbung zur Bestimmung der „area at risk“**

Die Maus wird wie oben beschrieben anästhesiert, intubiert und thorakotomiert. Mit den im Herz verbliebenen Fäden wird wie oben beschrieben erneut ligiert, woraufhin in den linken Ventrikel 0,5ml 0,5%iges Evans Blue injiziert werden (1ml-Spritze).

Da Evans Blue jedes perfundierte Gewebe blau anfärbt, grenzt sich das von der Ischämie betroffene Areal (=„area at risk“) bei diesem Schritt vom übrigen Myokard ab. Die erfolgreiche Färbung wird dementsprechend durch die auftretende Organfärbung kontrolliert.

Daraufhin wurde der Maus 0,3ml 1M-Lösung Kaliumchlorid linksventrikulär injiziert, um einen Herzstillstand zu induzieren. Im Anschluss wird das Herz entnommen und mit 0,9%iger Natriumchloridlösung gereinigt.

Zur Auswertung wird das Gewebe trocken getupft, mit Tissue Tec bedeckt und

## Material und Methoden

30min bei -20°C tiefgefroren.

Das gefrorene Herz wird mittels Einmalskalpell senkrecht zur Längsachse in sechs ca. 1mm dicke Scheiben geschnitten. Diese Scheiben werden erneut mit NaCl gereinigt und 10min unter Lichtabschluss bei 37°C in 1%iger TTC- (2,3,5 Triphenyltetrazolim-Chlorid-)Lösung inkubiert. In diesem Schritt färbt TTC durch oxidative Phosphorylierung mitochondrialer Dehydrogenasen vitales Gewebe rot. So erscheint anschließend die „area at risk“ rot, das nicht Ischämiegefährdete Gewebe wird durch die Evans Blue-Färbung überlagert und ist blau. Das nekrotische bzw. vernarbte Gewebe des Infarktareals erscheint blass. Die Fixierung erfolgte in 4%igem Formaldehyd.

### 2.2.1.5 Auswertung

Die ersten vier Herzscheiben, ausgehend von der Herzspitze, werden mit einer elektronischen Waage gewogen. Anschließend werden diese Querscheiben von beiden Seiten neben einer Millimeterskala digital fotografiert. Diese ersten vier Scheiben stellen den Bereich distal der Ligatur dar, während sich die anderen beiden Scheiben bereits im Herzklappen- und Vorkammerbereich befinden.

Die Anfärbung der unterscheidbaren Areale sind

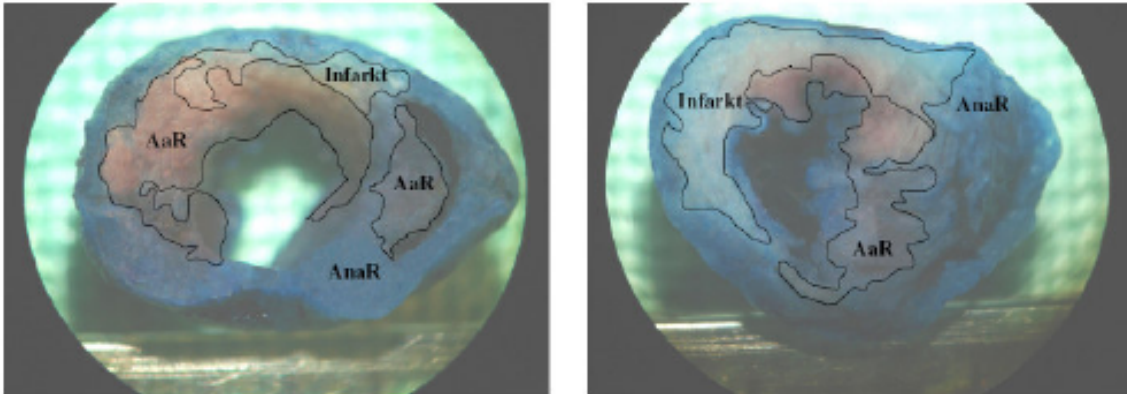
rot: area at risk (aar)

weiß: Infarktareal

blau: area at non risk (aanr)

Mittels NIS-Elements (Nikon GmbH, Deutschland) erfolgt die Messung der Flächen des linken Ventrikels, des Infarktareals und der „area at risk“.<sup>109</sup>

## Material und Methoden



**Abb. 3** Evans-Blue Färbung: Zur Verfügung gestellt von Frau Dr. C. Ochmann. Herzscheiben mit Evans-Blue gefärbt. „area at risk“ und „area at non risk“ grenzen sich deutlich gegeneinander ab. Am Rande der „area at risk“ ist der Infarkt zu sehen.

### 2.2.2 Histologie

#### 2.2.2.1 Objektträgerbeschichtung

Die in Formalin eingelegten Präparate werden in Paraffin eingebettet und anschließend gekühlt bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Daraufhin wurden die Präparate in das Jung Multicut Mikrotom eingespannt und vier  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte hergestellt. Diese Scheiben werden in einem Wasserbad mit lauwarmem Leitungswasser auf Objektträger aufgetragen. Daraufhin wird der beschichtete Objektträger in das Hitzebad bei  $55\text{-}65^{\circ}\text{C}$  etwa 10 Sekunden eingetaucht. Anschließend werden die Objektträger ein bis zwei Tage im Ofen bei  $38^{\circ}\text{C}$  getrocknet.

#### 2.2.2.2 Hämalan und Eosin-Färbung

Für die Hämalan und Eosin-Färbung (HE-Färbung) werden die Schnitte nach Entparaffinierung 5min in Hämalan inkubiert und daraufhin 10min unter lauwarmen, fließendem Leitungswasser „gebläut“. Es folgt eine dreiminütige Inkubation in einprozentigem Eosin. Nachdem die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe durchlaufen, werden diese mit Eukitt eingedeckelt.

Die Präparate werden unter dem Optiphot-2 Mikroskop mit NIS Elements BR

## Material und Methoden

2.10 ausgewertet.

Hierfür werden bei den nach 24h geopfertten Mäusen die Infiltrate im Infarktareal aufgesucht. Es wird die Zellzahl und die Fläche des Infiltrats bestimmt.

Die Messung der nach 7d euthanasierten Mäuse erfordert ein Ausmessen mehrerer repräsentativer Flächen aus den Infarktarnen und die Zellauszählung in diesen Flächen. Um besser vergleichen zu können, wird die Größe der gemessenen Flächen zwischen 10.000 und 20.000  $\mu\text{m}^2$  gewählt. Diese Größe erweist sich zudem bei der Auszählung als zuverlässiger als besonders große Areale.

### **2.2.2.3 Immunhistologie**

Bei der Immunhistologie wird das Gewebe zunächst mit dem Primärantikörper gegen das darzustellende Antigen inkubiert. Daraufhin bindet ein Zweitantikörper an den Primärantikörper. Dieser Sekundärantikörper ist biotinyliert. Um unspezifische Färbung zu vermeiden, wird das Präparat anfangs mit einem Serum der zur Klonierung verwendeten Spezies und/oder einer Blockierlösung inkubiert.

Nach Bindung des biotinylierten Zweitantikörpers gibt man eine Avidin-Biotin-Lösung hinzu. Eine Streptokinase ist an Avidin gebunden, welches seinerseits in der Lage ist, an bis zu vier Biotinmoleküle zu binden. So entsteht ein Komplex, dessen Streptokinase mit dem Färbereagenz (DAB) die mikroskopisch sichtbare Färbung erzeugt.

Nach der Entparaffinierung werden die Objektträger in PBS gewaschen. Diese werden danach in Citratpuffer von pH6 3min inkubiert, woraufhin sie 5min in der Mikrowelle bei 360 Watt gekocht werden. Im Anschluss werden die Präparate bei Raumtemperatur abgekühlt.

Nach dem Abkühlen werden die Schnitte in PBS gewaschen und danach 10min in 3%iger  $\text{H}_2\text{O}_2$  eingelegt. Danach werden die Schnitte dreimal 2min in PBS

## Material und Methoden

gewaschen.

Für die Färbung mit den Antikörpern gegen CD147 und MMP9 werden die Präparate nun 10min in Avidinlösung (Biotin blocking system) inkubiert, daraufhin 2min in 0,05%igem Tween-PBS (Tween 20) eingelegt und danach in Biotinlösung (Biotin blocking system) inkubiert.

Nachdem die Schnitte drei mal 2min in 0,05%igem Tween-PBS gewaschen wurden, werden sie mit 10%igem Kaninchenserum (bei Markierung von CD147, MMP9, Mac3, PMN) bzw. 10%igem Ziegenserum (bei Markierung von Cyclophilin A ) für eine halbe Stunde bedeckt.

Nach Abkippen des Überstandes werden die Präparate mit den entsprechenden Erstantikörpern gegen CD147 (1,0mg/ml; 1:100 in 1%igem BSA), Cyclophilin A (1,0mg/ml; 1:100 in 1%igem BSA), MMP9 (0,2mg/ml; 1:50 in 1%igem BSA), Mac3 (31,25mg/ml; 1:500 in 1 %igem BSA), PMN (0,1mg/ml; 1:500 in 1%igem BSA) sowie der IgG<sub>1</sub> (IgG<sub>2</sub> bei PMN) oder PBS eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend werden die Schnitte fünf mal 5min in 0,05%igem Tween-PBS eingelegt und daraufhin wird eine halbe Stunde der entsprechende biotinierte Sekundärantikörper (rabbit anti-rat für CD147, PMN und Mac3; goat anti-rat für Cyclophilin A; rabbit anti-goat für MMP9) hinzugegeben.

Im Anschluss werden die Objektträger fünfmal 5min in 0,05%igem Tween-PBS gewaschen. Dann werden die Präparate in mindestens einer halben Stunde zuvor hergestelltem StreptAB Complex/HRP für 30min inkubiert.

Daraufhin werden die Schnitte fünfmal 5min in 0,05%igem Tween-PBS eingelegt und unter dem Optiphot-2 Mikroskop mit DAB-Lösung für 1-2min versehen.

Anschließend werden die Objektträger dreimal 5min in 0,05%igem Tween-PBS inkubiert und danach 2min mit Hämalaun gegengefärbt.

Es folgte ein zehnmütiges „Bläuen“ mit fließendem, lauwarmem Leitungswasser und danach eine aufsteigende Alkoholreihe vor dem Eindeckeln mit Eukitt.

## Material und Methoden

Nach dem Trocknen der Objektträger wird unter dem Optiphot-2 Mikroskop mit NIS Elements BR 2.10 ausgewertet. Hierfür werden jeweils ähnliche Areale wie bei der HE-Färbung ausgewählt. Es wird die Zellzahl der Areale und die Anzahl der immunhistochemisch gefärbten Zellen bestimmt. Auch bei diesem Auswertungsschritt beträgt die ausgezählten Flächen zwischen 10.000 und 20.000 $\mu\text{m}^2$ .

### **2.2.3 Statistische Auswertung**

Die statische Auswertung erfolgt mittels SPSS 15.1.1 für Windows. Die Daten werden ausgewertet als Mittelwert  $\pm$  Standard Error of the mean. Die Differenz der Mittelwerte wird durch einen unpaaren Student's t-Test analysiert. Werte von  $p < 0,05$  werden als signifikant angenommen.

### **2.2.4 Proteinanalyse**

#### **2.2.4.1 Homogenisierung von Gewebe**

Zur Gewebekomogenisierung von Milzen der zehn Wochen alten Mäuse wird bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  tiefgefrorenes Gewebe verwendet. 0,13 Gramm Gewebe werden mit 600  $\mu\text{l}$  Homogenisierungspuffer (mit Proteinase-Inhibitoren 1:25 in PBS) im Douncer inkubiert.

Diese Homogenisate wird anschließend 5min bei 1.000g zentrifugiert. Der Überstand wird erneut 30min bei 20.000g zentrifugiert.

Daraufhin werden die Pellets mit 100  $\mu\text{l}$  RIPA-Puffer (150mM NaCl, 50mM Tris, 0,1% SDS, 0,5% Natrium-Deoxycholat, 1% Triton X 100 auf pH8 eingestellt) resuspendiert und unter Drehen bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  im Kühlraum vier Stunden inkubiert.

Die Probe wird danach wiederum 30min bei 20.000g zentrifugiert, um die Überstände zu gewinnen.

## Material und Methoden

### 2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Es wird eine Verdünnungsreihe der Proteinstandarlösung in H<sub>2</sub>O durchgeführt, so dass die Standardlösung rein, 1:1, 1:4; 1:8 und 1:16 verdünnt vorliegt. Dazu wird jeweils eine Probe der Wildtypmaus und der Maus mit verminderter CD147-Expression 1:10 und 1:50 verdünnt.

Von diesen Proben werden viermal je 10 µl in eine 96-Well-Platte pipettiert und pro Well 200µl BioRad Protein-Assay Farbstoffkonzentrat 1:5 in H<sub>2</sub>O hinzugefügt.

Die Extinktionsmessung erfolgt in einem ELISA-Reader bei 595nm. Anhand der bekannten Konzentration der Standardlösung kann die Konzentration der Probe bestimmt werden.

### 2.2.4.3 SDS-Page

Während des gesamten Westernblot sind Handschuhe zu tragen, um die Verfälschung der Messergebnisse durch Eigenproteine zu vermeiden.

Zunächst wird für den Westernblot ein 10%iges Trenngel aus 4ml dest. H<sub>2</sub>O, 2,5 ml 1,5M Tris, 3,3ml 30%igem Acrylamid (Rotiporese), 100µl 10%igem SDS, 80µl 10%igem Ammoniumpersulfat und 10µl TEMED gegossen und in die Gel-Kassette eingefügt.

Danach wird das Gel mit Isopropanol überschichtet und 10-15min die Polymerisierung abgewartet. Im Anschluss wird die Oberseite mit dest. H<sub>2</sub>O gespült und vorsichtig mit einem Filterpapier getrocknet.

Für die Proben wird das Sammelgel aufgetragen. Ein Kamm an der Oberseite erzeugte die Probentaschen. Diese werden nach Entfernung des Kamms ebenfalls mit dest. H<sub>2</sub>O gespült.

Dann wurde die Gelkammer mit Laufpuffer (25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS) gefüllt und 10-12µl Marker (Bench Mark) sowie die Proben in die Taschen pipettiert. Eine Probe besteht aus 20µg Protein, 24µl Aqua dest. und 6µl Probenpuffer (fünfmal Laufpuffer mit 10% β-Mercaptoethanol), die leeren

## Material und Methoden

Taschen werden mit selbiger Lösung ohne Überstand aufgefüllt.

An das Gel werden 400mA angelegt, so dass Spannungen von 80V im Sammelgel und 120-150V im Trenngel bestehen.

Nachdem die Lauffront des Puffers aus dem Gel gelaufen ist, wird die Gelkassette aufgebrochen und das Sammelgel vom Trenngel entfernt.

### **2.2.4.4 Westernblot-Analyse**

Daraufhin wird das Gel für den Westernblot folgendermaßen in die Blotkammer verbracht: (-) Filter – Gel – Membran – Filter (+)

Dabei wird jede Schicht bestrichen, um Luftblasen zu vermeiden. Ein alter, belichteter Film dient zur Abdeckung, um einen Kurzschluss zu vermeiden.

An die Blotkammer werden für eine Stunde 70mA und 10V angelegt.

Danach wird die Membran für eine Minute in Ponceau-Lösung (1g Ponceau S, 15ml 100%ige Trichloressigsäure, 485ml dest. H<sub>2</sub>O) gefärbt und anschließend mit Aqua dest. entfärbt.

Die Membran wird im Anschluss für eine Stunde in Blockierlösung (5% Milchpulver in PBS) eingelegt. Anschließend wird die Membran mit dem Primärantikörper (Ziege anti-CD147 1:1000) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wird die Membran zweimal 10min in 0,1%iger Tween-PBS und einmal 10min PBS inkubiert, um eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (Kaninchen anti-Ziege-HRP) inkubiert zu werden.

Daraufhin erfolgt erneut derselbe Waschschrift.

Zum Schluss wird die Membran auf eine Folie gelegt und diese auf einen Film aufgebracht.

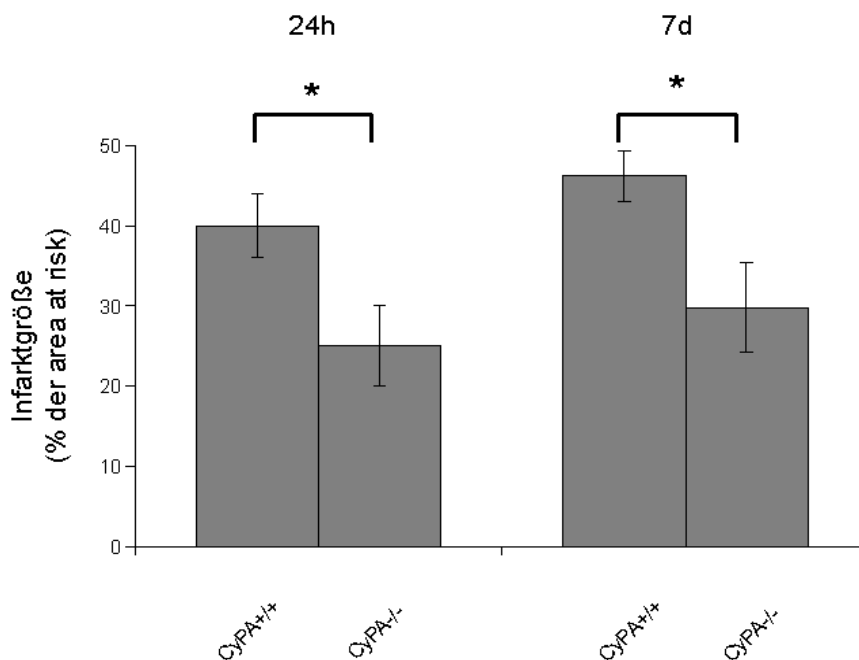
## Ergebnisse

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Infarktmorphologie CyPA-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion

##### 3.1.1 Beurteilung der Infarktgröße

Vergleicht man die Ergebnisse nach 24h und nach 7d, so zeigt sich jeweils eine signifikante Reduktion der Infarktgrößen. Dabei besteht eine minimale Vergrößerungstendenz. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen bleibt praktisch gleich.



**Abb. 4** Quantitative Auswertung der Infarktgrößen von CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen nach Ischämie/Reperfusion: Die LAD wurde für 30min ligiert bei CyPA<sup>+/+</sup> und CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen. Während der OP wurde eine Evans Blue-Färbung zur Abgrenzung der „area at risk“ durchgeführt. Eine quantitative Analyse der Infarktgröße (bezogen auf die „area at risk“ in %) zeigt bei CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen 24h und 7d nach I/R eine signifikante Reduktion der Infarktgröße gegenüber der Kontrollgruppe (p<0,05; n=7). Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der quantitativen Analyse der Infarktgrößen in Bezug auf die „area at risk“ zeigen eine geringe Größenzunahme bei in etwa gleich bleibendem Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ochmann.

## Ergebnisse

Während die Herzen und linken Ventrikel der Mäuse ähnlich groß sind, können die Koronargefäße sehr variabel verlaufen, so dass die „area at risk“ trotz zuverlässiger Ligatur an ähnlicher Stelle zwischen den Individuen deutlich Unterschiede aufweisen kann. Durch eine Relation des Infarktareals zur „area at risk“ wird diese Variable im Vergleich der Versuchstiere eliminiert und die Infarktgröße in Bezug auf das gefährdete Areal gemessen.

Deshalb ist die Bestimmung der Infarktgröße bezogen auf die „area at risk“ repräsentativer als eine Flächenmessung oder eine Bestimmung der Infarktgröße bezogen auf den linken Ventrikel oder das ganze Herz.

### 3.1.2 HE-Färbung im Grenzbereich des Infarkts

Die bekannten Ergebnisse liefern nur eine begrenzte Interpretationsmöglichkeit der pathophysiologischen Vorgänge. Aus diesem Grund werden Mäuseherzen nach I/R in Paraffin eingebettet und anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Von diesen Herzen werden vier  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt und mit HE-gefärbt.

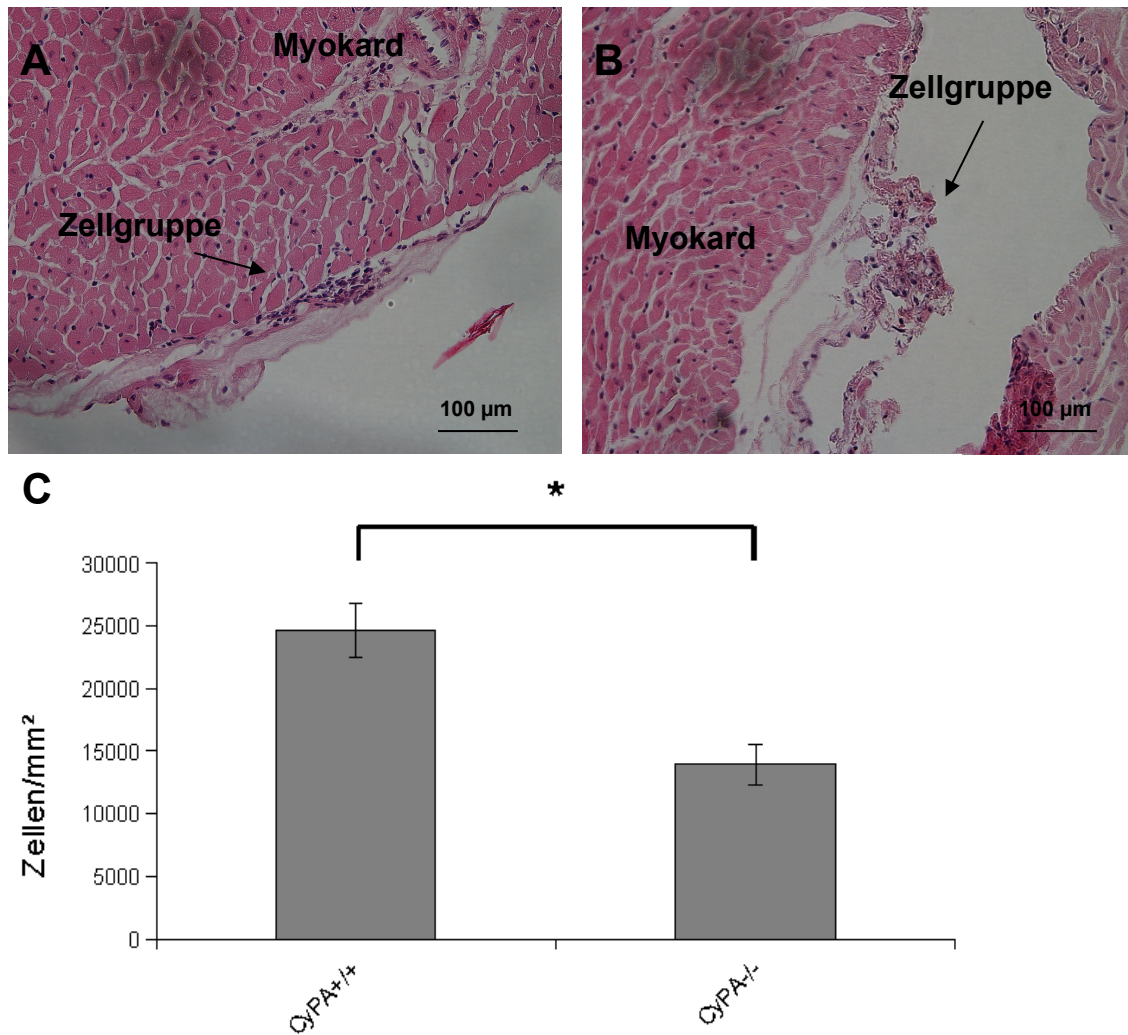
Lichtmikroskopisch zeigen sich im Grenzbereich des Infarktareals jeweils Zellgruppen (Abb. 5).

Diese Zellansammlungen sind zwar bei  $\text{CyPA}^{-/-}$  und  $\text{CyPA}^{+/+}$  Mäusen vorhanden, kommen jedoch bei der Kontrollgruppe größer und häufiger vor als bei den  $\text{CyPA}^{-/-}$  Tieren. Zudem sind oft verhältnismäßig wenig Zellen in den gefundenen Zellgruppen der  $\text{CyPA}$ -defizienten Mäuse.

Die Morphologie der Zellansammlungen lässt eine geringere Zelldichte bei  $\text{CypA}^{-/-}$  Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe vermuten.

Zur Bestimmung der Zelldichte dieser Zellgruppen werden im folgenden mehrere Färbungen pro Mausherz vorgenommen und aus sämtlichen gemessenen Werten ein Mittelwert je Maus ermittelt. Dazu werden repräsentative Areale der Infarktarnen zwischen  $10.000$  und  $20.000\mu\text{m}^2$  gewählt und die Zellzahl dieser Areale ermittelt.

## Ergebnisse



**Abb. 5** HE-Färbungen von *CyPA*<sup>-/-</sup> Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion: Die Versuchstiere werden 24h nach I/R euthanasiert. Daraufhin werden die Mäuseherzen in Paraffin fixiert und bei -20°C gelagert. 4 µm dicke Paraffinschnitte werden HE-gefärbt. Die Bilder zeigen Myokard und die beschriebenen Zellgruppen. Das Zytoplasma ist rot angefärbt, Bindegewebe rosa und Zellkerne blau. Die Lichtmikroskopische Betrachtung der im Grenzbereich der Infarktareale befindlichen Zellgruppen zeigt eine Reduzierung der Zelldichte dieser Gruppen bei *CyPA*<sup>-/-</sup> Mäusen (B) gegenüber der Kontrollgruppe (A). Die quantitative Auswertung (C) der Zelldichte zeigt einen signifikante Unterschied ( $p=0,001$ ;  $n \geq 3$ ).

Die Zelldichte in Zählungen/mm<sup>2</sup> beträgt:

*CyPA*<sup>+/+</sup>: 24672,32 ± 2203,81

*CyPA*<sup>-/-</sup>: 13936,13 ± 1654,53

Der Unterschied ist signifikant ( $p=0,001$ ). (Abb. 5)

## Ergebnisse

Die deutlichen Hinweise auf eine morphologische Veränderung bei den CyPA-defizienten Mäusen in der HE-Färbung bestätigt sich in der quantitativen Auswertung. Der Vergleich dieser Mittelwerte zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen CyPA<sup>-/-</sup> und CyPA<sup>+/+</sup> Mäusen. Die Zelldichte der bei CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen gefundenen Zellgruppen beträgt nur etwa 56% gegenüber der Zelldichte der Kontrollgruppe.

### 3.1.3 Immunhistochemie

#### 3.1.3.1 Nachweis von Makrophagen

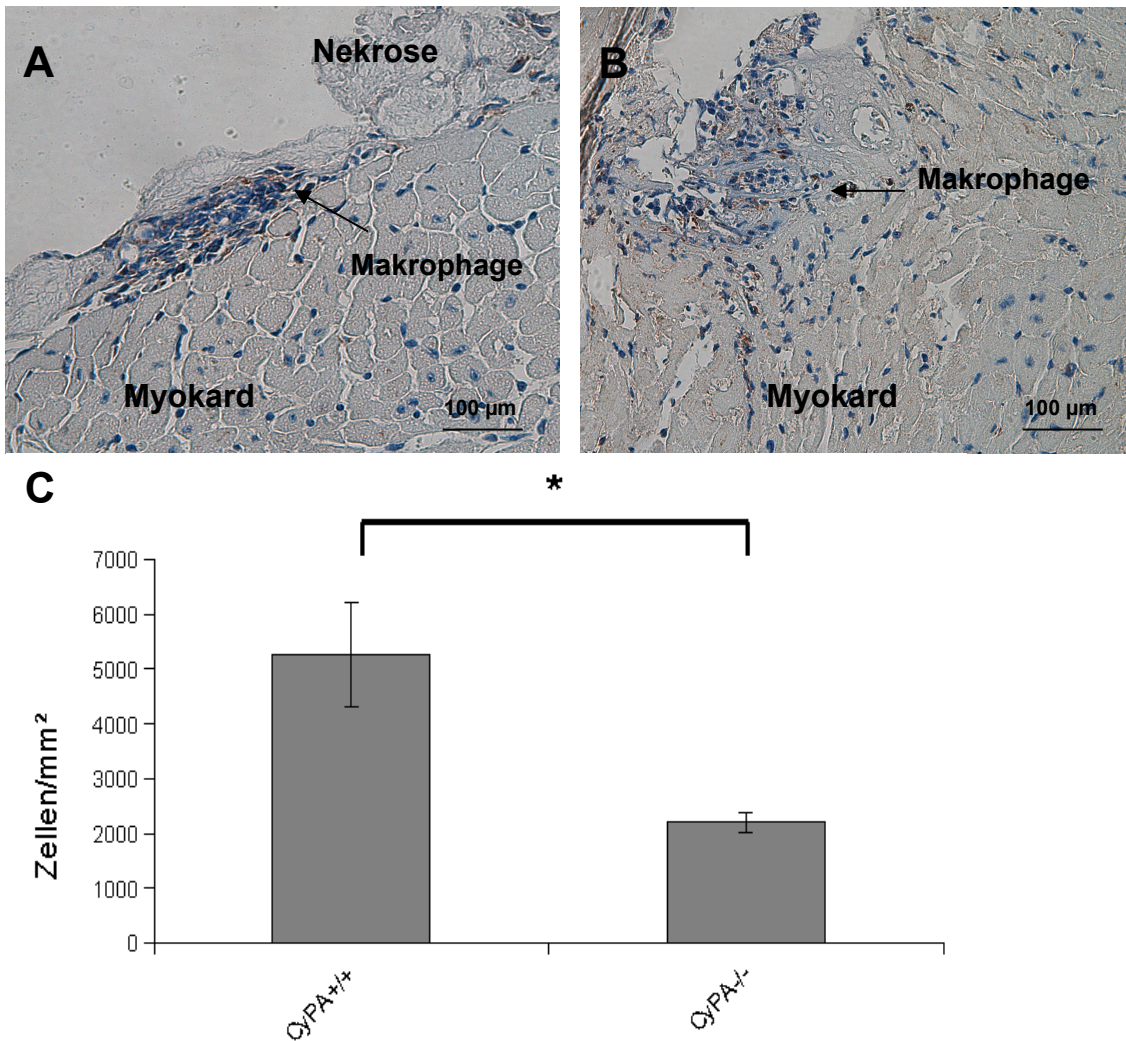
Die Bestimmung der Zelldichte zeigt eine geringere Zelldichte bei CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe. Durch I/R werden Myozyten nekrotisch. Das anfallende nekrotische Material wird von Makrophagen beseitigt. CyPA wiederum hat eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten, die sich zu Gewebsmakrophagen differenzieren.<sup>135,161</sup> Um Makrophagen darzustellen werden von den Zellgruppen der HE-Färbungen zum Nachweis von Makrophagen immunhistochemische Färbungen des Makrophagenmarkers Mac3 mit dem anti-Mac3 durchgeführt (Abb. 6).

In der Betrachtung der anti-Mac3-Färbungen fällt neben dem oben ausführlich beschriebenen Unterschied hinsichtlich der Zelldichte der im Grenzbereich des Infarktareals aufzufindenden Zellgruppen auch auf, dass sich deutlich weniger Makrophagen in den Zellgruppen der CyPA<sup>-/-</sup> Mäuse befinden als in denen der Kontrollgruppe.

Letztendlich bedarf diese Beobachtung einer quantitativen Analyse für die zwei Möglichkeiten diskutiert wurden:

- 1) Die Makrophagen werden in % aller Zellen der Zellgruppe gemessen.
- 2) Die Makrophagendichte wird analog zur Zelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup> bestimmt.

## Ergebnisse



**Abb. 6** Infiltration von Makrophagen bei CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion: Komplementär zu den HE-Färbungen hergestellte repräsentative anti-Mac3-Färbungen 24h nach I/R. Die Zellkerne sind blau angefärbt. Die mit dem Antikörper markierten Zellen weisen eine bräunliche Färbung auf. Die Bilder zeigen Myokard, die untersuchten Zellgruppen sowie randständige Nekrosen. Die CyPA<sup>-/-</sup> Mäuse (B) weisen weniger Makrophagen auf als die Färbungen der Kontrollgruppe (A). Bei der quantitativen Analyse (C) zeigt sich eine signifikante Reduktion der Makrophagendichte ( $p=0,006$ ;  $n \geq 3$ ).

Eine Relation der Makrophagen zu allen in der Zellgruppe vorhandenen Zellen eliminiert die in der Zelldichte bestehenden Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen, birgt jedoch die Möglichkeit signifikant unterschiedliche Werte trotz nicht bestehender Signifikanz und ebenso andersherum zu erhalten.

## Ergebnisse

Letzteres erklärt sich dadurch, dass die anderen Zellen in ihrer Häufigkeit ebenso variieren können wie auch die Makrophagen.

Die Bestimmung der Makrophagendichte betrachtet hingegen nur die Zielzellen und ist nicht von der Bestimmung anderer Zellen abhängig.

Deshalb werden wie auch bei der Bestimmung der Zelldichte die Makrophagen pro Fläche ausgezählt.

Die Dichte an Makrophagen in Zählungen/mm<sup>2</sup> beträgt:

CyPA<sup>+/+</sup>: 5266,22 ± 950,52

CyPA<sup>-/-</sup>: 2202,93 ± 175,7

Der Unterschied ist signifikant (p=0,006) (Abb. 6).

Die statistische Auswertung ergibt einen deutlichen und signifikanten Unterschied. Die Makrophagendichte der CyPA-defizienten Mäuse ist auf ca. 42% im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert. Dieser Unterschied fällt im Vergleich zur Bestimmung der Zelldichte mit einer Reduktion auf ca. 56% noch deutlicher aus.

### 3.1.3.2 Nachweis neutrophiler Granulozyten

Nach der Migration von Makrophagen in das Infarktgebiet wandern neutrophile Granulozyten ein, die einen großen Anteil am Reperfusionsschaden nehmen.<sup>68</sup>

CyPA wirkt zudem chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten.<sup>135,161</sup> Deshalb erfolgt eine immunhistochemische anti-PMN-Färbung, die neutrophile Granulozyten anfärbt, um die Beeinflussung einer CyPA-Defizienz auf das Migrationsverhalten von neutrophilen Granulozyten nach I/R zu untersuchen (Abb. 7). Die Auswertung erfolgt analog zu der bereits erläuterten Bestimmung der Makrophagendichte als Dichte neutrophiler Granulozyten.

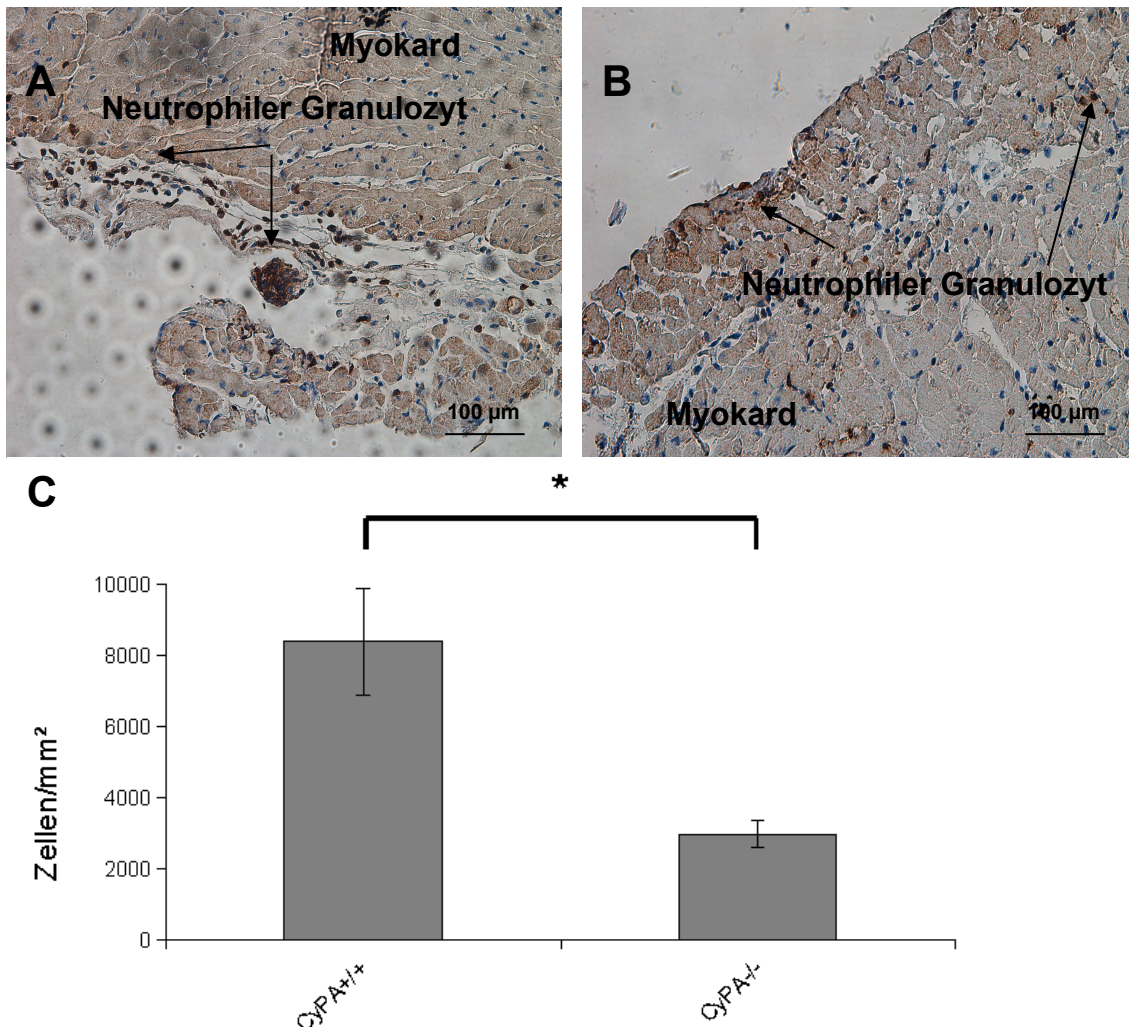
Die Dichte an neutrophilen Granulozyten in Zählungen/mm<sup>2</sup> beträgt:

## Ergebnisse

CyPA<sup>+/+</sup>: 8384,02 ± 1502,01

CyPA<sup>-/-</sup>: 2963,07 ± 384,61

Der Unterschied ist signifikant (p=0,004) (Abb. 7).



**Abb. 7** Infiltration neutrophiler Granulozyten bei CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion: Repräsentative immunohistochemische anti-PMN-Färbung. Die Präparate sind komplementär zu den bisher untersuchten Präparaten. Im Bild sind Myokard und transmigrierende neutrophile Granulozyten zu sehen. CyPA<sup>-/-</sup> Mäuse (B) zeigen ein reduziertes Migrationsverhalten von neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu Wildtypmäusen (A). Die quantitative Auswertung (C) zeigt eine signifikante Reduktion der neutrophilen Granulozyten (p=0,004; n≥3).

## Ergebnisse

Die statistische Auswertung der ermittelten Dichten an neutrophilen Granulozyten ergibt eine Reduktion der Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Fläche auf ca. 35% bei CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu CyPA<sup>+/+</sup> Mäusen. Der Versuch zeigt einen signifikanten Unterschied auf. Der Unterschied ist damit nochmals deutlicher als die Reduktion der Makrophagendichte (42%) und der unspezifischen Zelldichte (56%).

Bei der Betrachtung der Zellgruppen fällt auf, dass der Hauptteil der beinhaltenen Zellen Makrophagen und neutrophile Granulozyten sind und die Anzahl dieser Zellen pro Fläche sich im Versuch stärker ändert als die Gesamtzellen pro Fläche. Da die Zellgruppen also nicht nur vor allem aus mit Entzündungsvorgängen assoziierten Zellen bestehen, sondern die Dynamik dieser Zellansammlungen auch im wesentlichen von diesen Zelltypen bestimmt wird, werden die Zellgruppen im folgenden als "inflammatorisches Infiltrat" charakterisiert.

## Ergebnisse

### **3.2 Infarktmorphologie CyPA-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion**

#### **3.2.1 HE-Färbung der Infarktnarbe**

Um ein histologisches Korrelat zu den untersuchten Mäusen zu gewinnen, werden von den Mäuseherzen Paraffinschnitte angefertigt und diese HE-gefärbt (Abb. 8).

Bei der Betrachtung der HE-Färbungen fällt lichtmikroskopisch auf, dass sich das Infarktareal umgestaltet hat und von zellreichem Bindegewebe dominiert wird. Diese Strukturen grenzen sich gegenüber vital anmutendem Myokard ab und imponieren als narbiger Defekt. Im folgenden werden sie als „Infarktnarbe“ bezeichnet.

In Vergleich scheint ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der Größe der Infarktnarben zu bestehen. Dies entspricht den bereits bekannten Untersuchungen zur Infarktgröße aus unserer Arbeitsgruppe.<sup>131</sup>

Die zur quantifizierenden Betrachtung der Differenz der Zelldichte zu messende Fläche ist im Vergleich zu den inflammatorischen Infiltraten, die nach 24h ausgemessen wurden, allerdings ungleich größer. Eine komplette Messung scheint nicht sinnvoll. Von daher werden repräsentative Areale aus der Infarktnarbe ausgewählt und die Zellen dieser Areale gezählt.

Zu Beginn der Auszählung wird eine Größe für die Auswertungsareale zwischen 10.000 und 20.000µm<sup>2</sup> gewählt. Bei dieser Größe lassen sich pro Schnitt mehrere Messungen durchführen. So kann der für jede Maus errechnete Mittelwert aus vielen Messungen bestimmt werden.

Die Zelldichte in Zählungen/mm<sup>2</sup> beträgt:

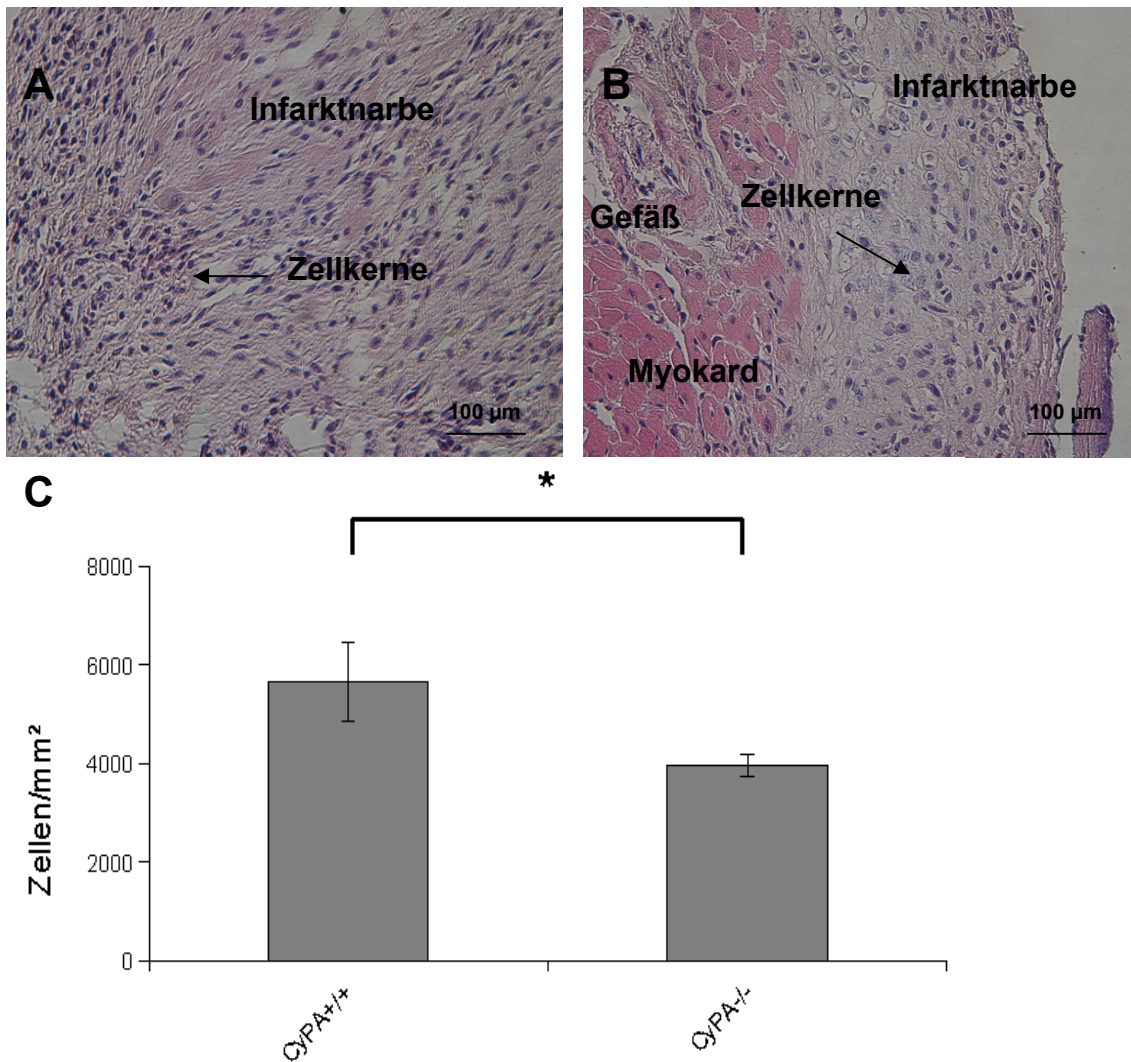
CyPA<sup>+/+</sup>: 5672,71 ± 804,85

CyPA<sup>-/-</sup>: 3969,15 ± 225,38

Der Unterschied ist signifikant (p=0,007) (Abb. 8).

## Ergebnisse

Die Zelldichte der  $CyPA^{-/-}$  Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe ist signifikant reduziert. Im Mittel zeigt sich eine Abnahme der Zellzahl von 30%. Ein Vergleich mit den Untersuchungen nach 24h ist nicht sinnvoll, da unterschiedliche Areale gemessen werden.



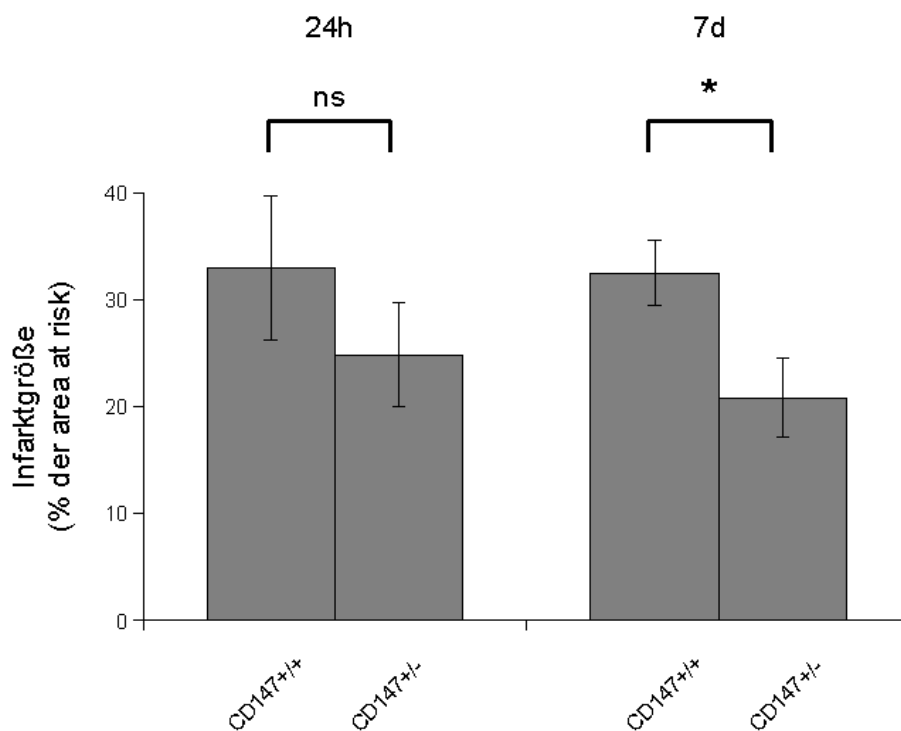
**Abb. 8** HE-Färbungen von  $CyPA^{-/-}$  Mäusen 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion: Die Mäuse werden 7d nach I/R euthanasiert. Die Mäuseherzen werden daraufhin in Paraffin fixiert und bei  $-20^{\circ}C$  gelagert. Paraffinschnitte mit 4  $\mu m$  Dicke werden HE-gefärbt. Repräsentative HE-Färbungen zeigen zellärmere Strukturen bei  $CyPA^{-/-}$  (B) Mäusen als bei  $CyPA^{+/+}$  Mäusen (A). Auf den Bildern ist Bindegewebe von unterschiedlicher Zelldichte (A+B) sowie Myokard (B) zu sehen. Bei der quantitativen Analyse (C) der Infarkttnarben anhand repräsentativer Areale zeigt sich eine signifikante Reduktion der Zelldichte der Infarkttnarbe ( $p=0,007$ ;  $n \geq 4$ ).

## Ergebnisse

### 3.3 Infarktmorphologie von CD147<sup>+/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion

#### 3.3.1 Beurteilung der Infarktgröße

Versuche unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass sich die Infarktgröße 7d nach I/R bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen im Vergleich zu CD147<sup>+/+</sup> Mäusen signifikant reduziert. Dies ist insofern bemerkenswert, da 24h nach I/R kein signifikanter Unterschied messbar war (Abb. 9). Es fällt auf, dass zwischen 24h und 7d nach I/R das Infarktareal der Kontrollgruppe nahezu unverändert bleibt, während sich die Infarktgröße der CD147 heterozygoten Mäuse um fast ein Drittel reduziert.



**Abb. 9** Quantitative Auswertung der Infarktgrößen von CD147<sup>+/-</sup> Mäusen nach Ischämie/Reperfusion: Die LAD wurde für 30min ligiert bei CD147<sup>+/+</sup> und CD147<sup>+/-</sup> Mäuse. Während der OP wurde eine Evans Blue-Färbung zur Abgrenzung der „area at risk“ durchgeführt. Zu sehen ist eine Gegenüberstellung der quantitativen Analyse der Infarktgrößen bezogen auf die „area at risk“ von CD147<sup>+/+</sup> und CD147<sup>+/-</sup> Mäusen 24h und 7d nach I/R. Während die Infarktgröße 24h nach I/R nur tendenziell verringert ist ( $p > 0,05$ ;  $n \geq 6$ ), ist sie 7d nach I/R signifikant verringert ( $p < 0,05$ ;  $n \geq 5$ ). Die Infarktgröße der

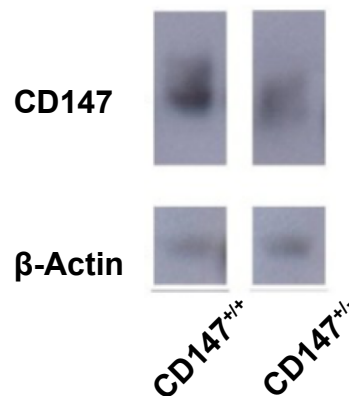
## Ergebnisse

Kontrollgruppe ist nahezu unverändert. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ochmann.

### 3.3.2 Westernblot

Zur Interpretation der in 3.3.1 gezeigten Infarktgrößen fehlt eine Aussage über das Maß der verminderten Expression von CD147. Da es sich wie erwähnt bei den Versuchstieren um CD147 Heterozygotie handelt, muss das CD147-Expressionslevel dieser Mäuse initial geklärt werden.

Deshalb werden Milzen von CD147<sup>+/+</sup> und CD147<sup>+/-</sup> Mäusen entnommen und Westernblots angefertigt (Abb. 10).



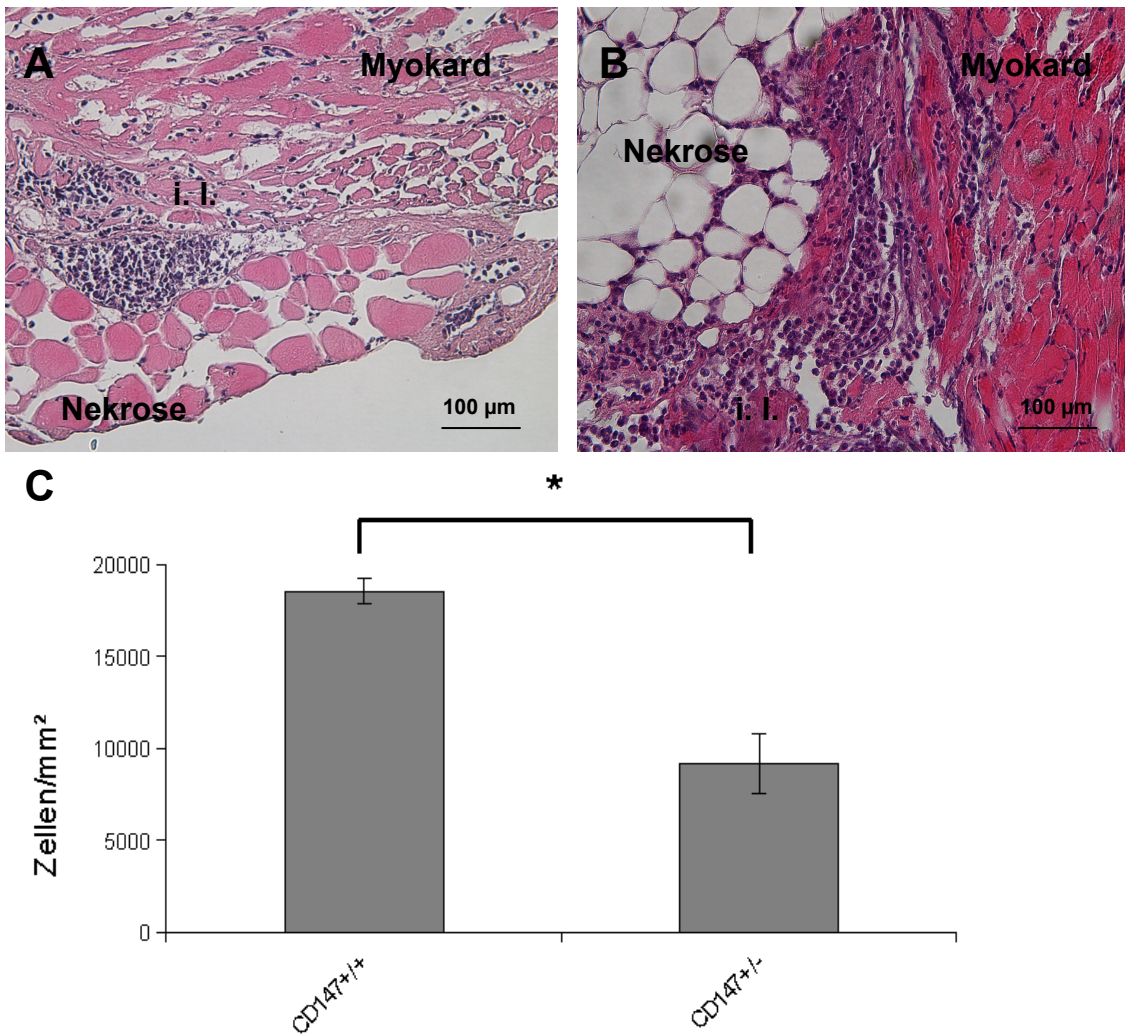
**Abb. 10** CD147 Expression von CD147<sup>+/-</sup> Mäusen: Zu sehen sind Repräsentative Westernblots (n=3) von Milzen von CD147<sup>+/+</sup> und CD147<sup>+/-</sup> Mäusen. Die CD147-heterozygoten Mäuse zeigen eine deutlich geminderte CD147-Expression gegenüber den Wildtypmäusen.

Die untersuchten Tiere zeigen eine deutliche Minderung der CD147-Expression bei den CD147<sup>+/-</sup> Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe. Eine quantifizierende Aussage lässt sich anhand dieser Versuchsreihe jedoch nicht tätigen.

## Ergebnisse

### 3.3.3 HE-Färbung des inflammatorischen Infiltrats

Der ermittelte Unterschied der Infarktgrößen ist 24h nach I/R nicht signifikant. Jedoch ist nicht geklärt, inwieweit der beobachtete Unterschied in der CD147-Expression eine Auswirkung auf die inflammatorischen Prozesse nach I/R hat. Deshalb werden HE-Färbungen von Mäuseherzen 24h nach I/R angefertigt, um die inflammatorischen Prozesse besser untersuchen zu können (Abb. 11).



**Abb. 11** HE-Färbungen von CD147<sup>-/-</sup> Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion: Mäuseherzen werden 24h nach I/R in Paraffin eingebettet und bei -20°C gekühlt. Paraffinschnitte mit 4 µm Dicke werden HE-gefärbt. Repräsentativen Präparate von CD147<sup>-/-</sup> Mäusen (B) und CD147<sup>+/+</sup> Mäusen (A) zeigen Myokard und Nekrosen im Grenzbereich des Infarktareals. Dazwischen ist inflammatorisches Infiltrat (i. l.) sichtbar. Es zeigt sich in der

## Ergebnisse

quantitativen Analyse (C) eine signifikante Verminderung der Zelldichte bei den CD147<sup>+/-</sup> Mäusen ( $p=0,000$ ;  $n=5$ ).

Man erkennt deutlich Zellgruppen, die sich an der Grenze zwischen vital anmutendem Myokard und nekrotischen Zellen ansammeln. Die vorgefundenen inflammatorischen Infiltrate scheinen bei den Mäusen mit verminderter CD147-Expression eine geringere Zelldichte aufzuweisen. Diese Beobachtung ist jedoch nicht quantifizierend. Deshalb wird als quantifizierende Methode ähnlich wie bei der Versuchsreihe zur CyPA-Defizienz eine Bestimmung der Zelldichte gewählt.

Die Zelldichte in Zählungen/mm<sup>2</sup> beträgt:

CD147<sup>+/+</sup>: 18538,05 ± 693,8

CD147<sup>+/-</sup>: 9165,53 ± 1640,29

Der Unterschied ist signifikant ( $p=0,000$ ) (Abb. 11).

Die morphologischen Unterschiede in der HE-Färbung spiegeln sich in einer signifikanten Reduktion der Zelldichte von CD147<sup>+/-</sup> gegenüber der Kontrollgruppe wider. Die Verminderung auf 49% der Zellzahl gegenüber der Kontrollgruppe fällt damit noch deutlicher aus als die Reduktion bei CyPA-defizienten Mäusen auf 56% gegenüber der Kontrollgruppe. Dies ist insofern bemerkenswert, da die Infarktgröße der CD147 Versuchsreihe keinen signifikanten Unterschied zeigt. Zudem sind bei CyPA Mäusen beide Genloci inaktiv, während die CD147 Mäuse heterozygot inaktiv sind. Wie viel CD147 wirksam ist, lässt sich mit den durchgeführten Versuchen nicht bestimmen. Der Westernblot liefert nur den qualitativen Nachweis, dass ein Unterschied besteht (Abb. 10).

## Ergebnisse

### 3.3.4 Immunhistochemie

#### 3.3.4.1 Nachweis von Makrophagen

Die Beobachtungen hinsichtlich der Zelldichte fordern eine genauere Charakterisierung der in den inflammatorischen Infiltraten enthaltenen Zellen.

Bei CyPA-defizienten Mäusen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Makrophagendichte der inflammatorischen Infiltrate (Abb. 6). Von daher ist zu untersuchen, ob die verminderte Expression von CD147 bei dessen bekannter Interaktion mit CyPA<sup>167</sup> einen ähnlichen Effekt auf das Migrationsverhalten der Makrophagen hat. Deshalb wird zum Nachweis von Makrophagen eine immunhistochemische Färbung des Makrophagenantigens Mac3 mit anti-Mac3 durchgeführt (Abb. 12).

Die anti-Mac3-Färbungen zeigen inflammatorische Infiltrate, die sich an der Grenze zwischen nekrotischem Material und scheinbar intaktem Myokard befinden. Die in Abb. 12 gewählten, repräsentativen Färbungen lassen vermuten, dass die Dichte der Makrophagen sich stark unterscheidet. Dieser Unterschied scheint noch stärker ausgeprägt als der oben beschriebene Unterschied in der Zelldichte (Abb. 11).

Eine Bestimmung der Makrophagendichte erfolgt analog zu den bisherigen Untersuchungen.

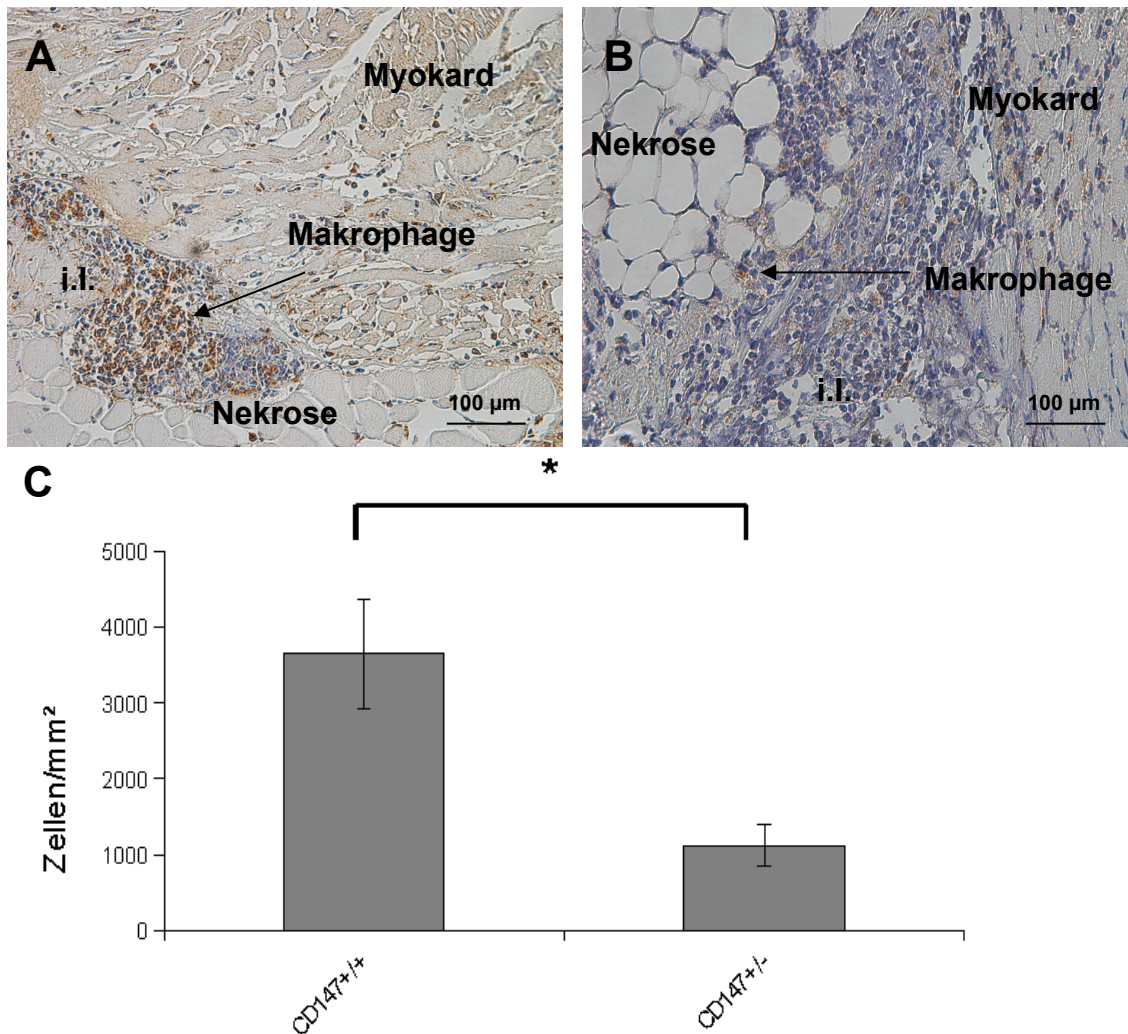
Die Zelldichte an Makrophagen in Zählungen/mm<sup>2</sup> beträgt:

CD147<sup>+/+</sup>: 3646,64 ± 712,83

CD147<sup>+/-</sup>: 1116,66 ± 273,84

Der Unterschied ist signifikant (p=0,016) (Abb. 12).

## Ergebnisse



**Abb. 12** Infiltration von Makrophagen bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion: Paraffinschnitte von CD147<sup>+/+</sup> und CD147<sup>+/-</sup> Mäuseherzen 24h nach I/R anti-Mac3 angefärbt. Die repräsentativen anti-Mac3-Färbung sind komplementär zu den bereits gezeigten HE-Präparaten. Es sind jeweils ein inflammatorisches Infiltrat (i.l.) mit nekrotischen Zellen gegenüber scheinbar vitalem Myokard zu sehen. Man sieht gegenüber dem sehr makrophagenreichen Infiltrat der Kontrollgruppe (A) eine starke Reduktion der Makrophagen bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen (B). Eine Bestimmung der Dichte der Makrophagen in den inflammatorischen Infiltraten durch quantitative Auswertung (C) der lichtmikroskopischen Messungen ergibt einen signifikanten Unterschied ( $p=0,016$ ;  $n=3$ ).

Wie die Betrachtung der immunhistochemischen Präparate nahegelegt hat, ist die Zelldichte der CD147<sup>+/-</sup> Mäuse in den inflammatorischen Infiltraten signifikant verringert. Die Reduktion der Makrophagendichte auf etwa 31%

## Ergebnisse

gegenüber der Kontrollgruppe präsentiert sich deutlicher als die Reduktion der Zelldichte auf 49% gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 11).

Gegenüber den CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen fällt die Reduktion der Zelldichten ebenfalls deutlicher aus. Sie beträgt 42% für die Makrophagendichte (Abb. 6) und 59% (Abb. 5) für die Zelldichte gegenüber den Kontrollgruppen.

Die unterschiedliche Reduktion der Makrophagendichte im Vergleich zur Zelldichte ist vergleichbar groß ausgeprägt in beiden Versuchsreihen.

### 3.3.4.2 Nachweis neutrophiler Granulozyten

Die Anfärbung der CD147 Präparate auf Makrophagen zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe, der ähnliche Dimensionen aufweist wie bei den zuvor untersuchten CyPA Mäusen. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich auch im Migrationsverhalten der neutrophilen Granulozyten ein Unterschied findet, der bei den CyPA Mäusen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe ebenfalls auffällig ist.

Deshalb werden die Präparate zum Nachweis neutrophiler Granulozyten mit anti-PMN-gefärbt sowie die Neutrophilendichte der inflammatorischen Infiltrate bestimmt (Abb. 13).

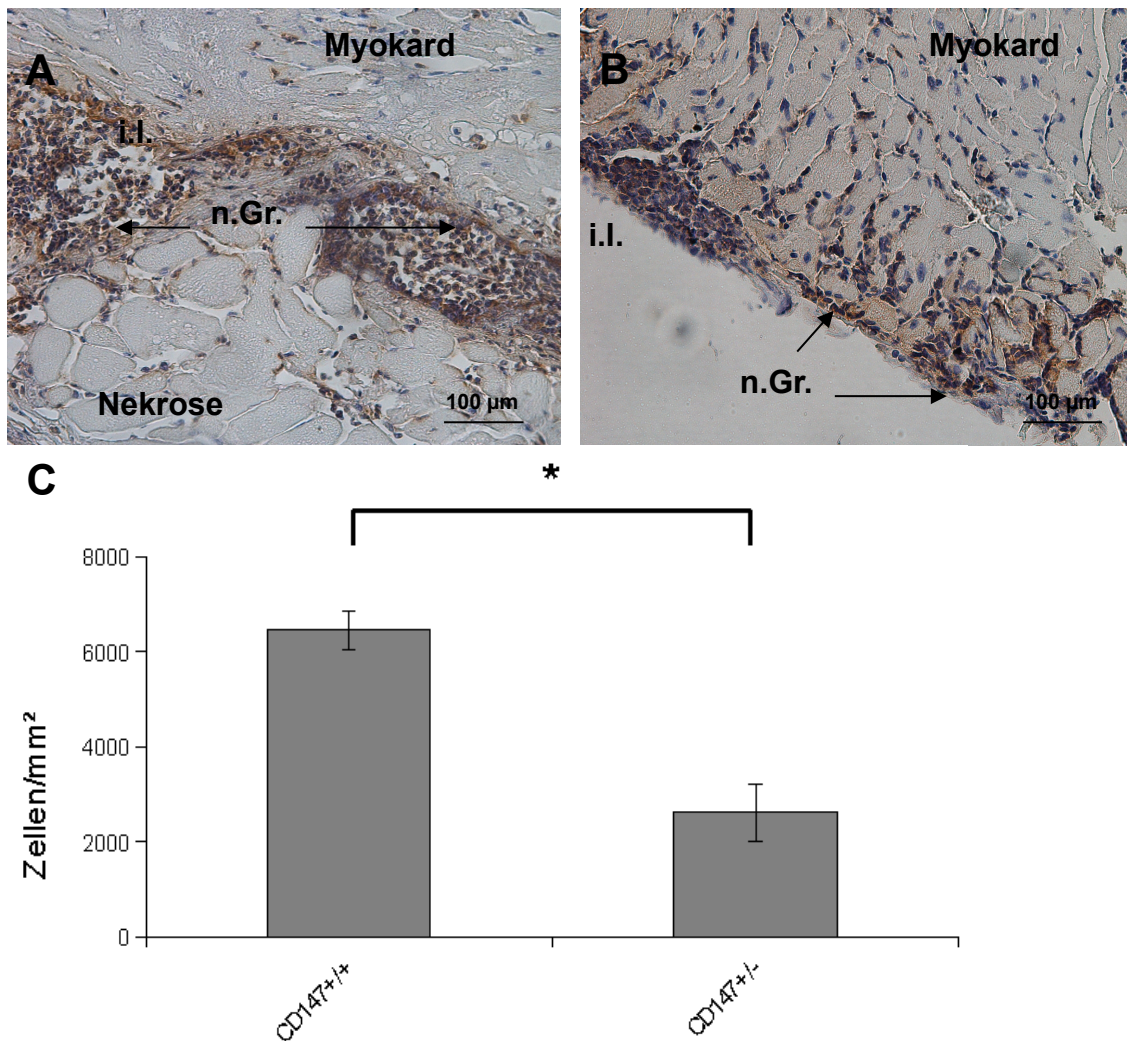
Die Zelldichte an neutrophilen Granulozyten in Zählungen/mm<sup>2</sup> beträgt:

CD147<sup>+/+</sup>: 6455,73 ± 417,85

CD147<sup>+/-</sup>: 2615,71 ± 591,75

Der Unterschied ist signifikant (p=0,001)

## Ergebnisse



**Abb. 13** Infiltration neutrophiler Granulozyten bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion: Komplementär zu den bisherigen Präparaten mit anti-PMN angefärbten Paraffinschnitten von Mäusen mit verminderter CD147-Expression (B) und Wildtypmäusen (A) 24h nach I/R. Diese repräsentativen Färbungen zeigen jeweils die Infiltration (i.l.) von neutrophilen Granulozyten (n.Gr.) in Myokard. Zudem sind Nekrosen sichtbar (A). Die quantitative Analyse (C) der lichtmikroskopische Messung der Zelldichte an neutrophilen Granulozyten zeigt eine signifikante Reduktion bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen (p=0,001; n=3).

Die CD147<sup>+/-</sup> Mäuse weisen gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Verminderung der Neutrophilendichte auf. Die Reduktion auf ca. 41% ist mit der Reduktion der Zelldichte auf 49% (Abb. 11) vergleichbar. Neutrophile Granulozyten werden also ähnlich stark in ihrem Migrationsverhalten

## Ergebnisse

beeinflusst wie die übrige Zellpopulation.

Dieser Effekt ist bei CyPA-defizienten Mäusen stärker ausgeprägt. Die neutrophilen Granulozyten sind auf 35% reduziert (Abb. 7) gegenüber den Zellen auf 56% (Abb. 5).

### 3.3.4.3 Nachweis von MMP9-positiven Zellen

Die bisherigen Untersuchungen zeigen einen deutlichen Effekt einer verminderten Expression von CD147 auf die Zusammensetzung und die Zahl der Zellen des inflammatorischen Infiltrats. Dabei wird jedoch keine weitere Erkenntnis über deren Aktivität und Migrationsverhalten gewonnen.

Eine der wichtigsten Funktionen von CD147 ist die Induktion von MMP9.<sup>144,80,163</sup> MMP9 ist an pathologischen Erneuerungsprozessen wie dem Remodelling beteiligt, indem freigesetztes MMP9 Zellen der angeborenen Immunität hilft, die Extrazellulärmatrix zu degradieren und ins Gewebe zu migrieren, um nekrotisches Material zu phagozytieren.<sup>158</sup>

Eine immunhistochemische anti-MMP9-Färbung zeigt jedoch nur das Ausmaß der MMP9 produzierenden Zellen und korreliert nicht direkt mit erhöhter MMP9-Aktivität im Myokard (Abb. 14).

Die untersuchten Präparate weisen einen scheinbar deutlichen Unterschied in der MMP9 Expression auf. Dieser Eindruck lässt sich durch eine Messung der MMP9 freisetzenden Zellen pro Fläche quantifizieren.

Die Zelldichte MMP9-positiver Zellen in Zählungen/mm<sup>2</sup> beträgt:

CD147<sup>+/+</sup>: 5615,19 ± 705,83

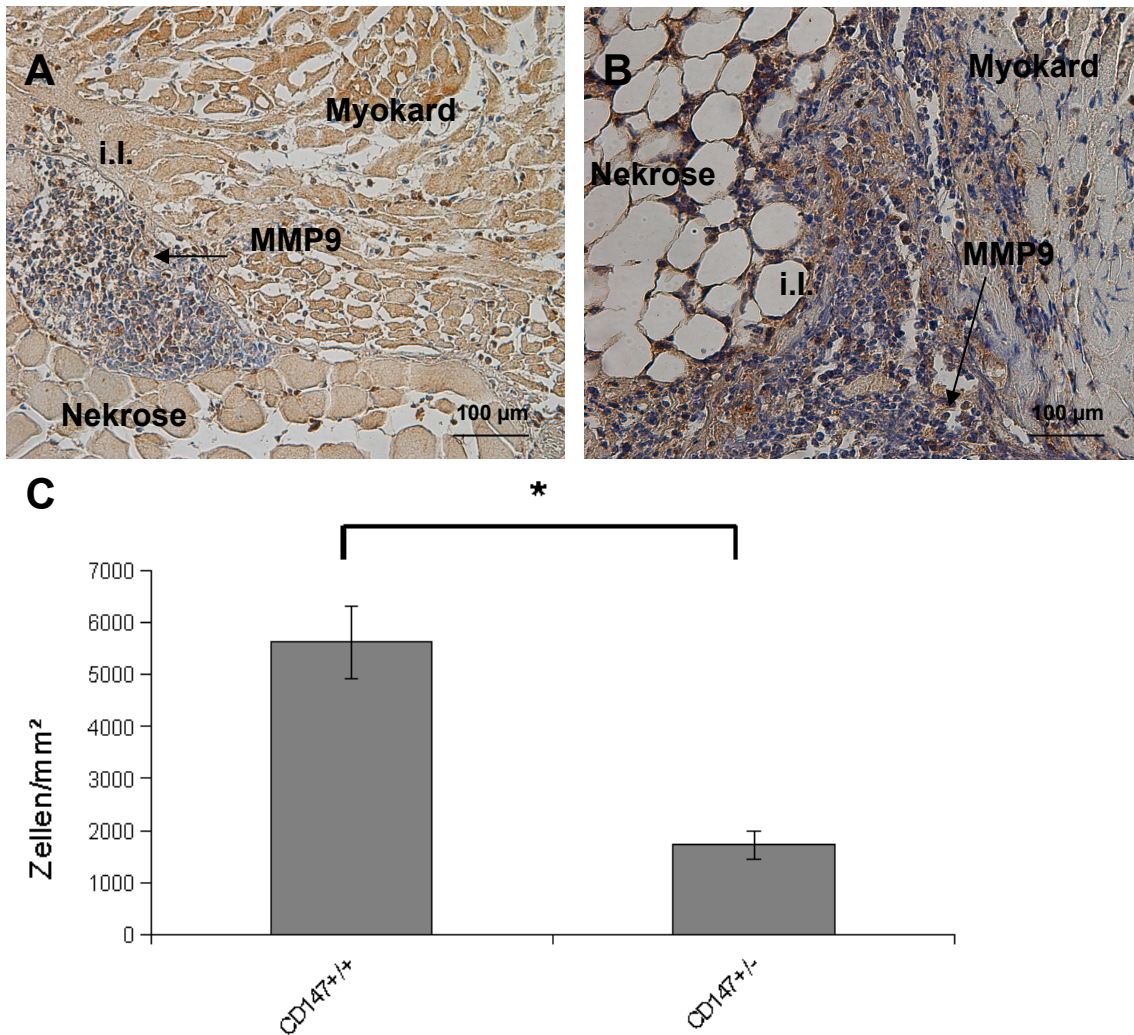
CD147<sup>+/-</sup>: 1718,34 ± 264,66

Der Unterschied ist signifikant (p=0,005) (Abb. 14).

Die Zelldichte der MMP9 freisetzenden Zellen reduziert sich bei den Mäusen mit verminderter CD147-Expression signifikant. Diese Reduktion auf 31% ist

## Ergebnisse

größer als die Reduktion der Zelldichte auf 49% (Abb. 11). Die CD147 Heterozygotie geht also auch mit einer deutlichen Verminderung der MMP9 Expression einher.



**Abb. 14** Infiltration MMP9-positiver Zellen bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen 24 Stunden nach I/R: Komplementär zu den übrigen Färbungen ausgewählte Paraffinschnitte von CD147<sup>+/+</sup> (A) und CD147<sup>+/-</sup> (B) Mäuseherzen 24h nach I/R werden mit anti-MMP9 gefärbt. Repräsentative Präparate zeigen Nekrose, inflammatorisches Infiltrat (i.l.) und ins Myokard migrierende Zellen. Die statistische Auswertung (C) der Messung MMP9-positiver Zellen/mm<sup>2</sup> im inflammatorischen Infiltrat weist bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen eine signifikant geringere Dichte auf (p=0,005; n=3).

## Ergebnisse

### 3.3.4.4 Nachweis von CyPA

CyPA spielt bei der Rekrutierung von Leukozyten eine wichtige Rolle.<sup>5</sup> Unter anderem sorgen inflammatorische Stimuli für eine Liberation von CyPA aus Makrophagen.<sup>135</sup> Für seine Aktivität benötigt CyPA CD147. Deshalb soll untersucht werden, inwieweit sich eine verminderte Expression von CD147 auf die CyPA-Expression des inflammatorischen Infiltrats auswirkt.

Dazu werden immunhistochemische anti-CyPA-Färbungen von Mäuseherzen 24h nach I/R angefertigt (Abb. 15).

Morphologisch stellt sich anhand dieser Färbungen ein deutlich sichtbarer Unterschied in der Expression von CyPA im inflammatorischen Infiltrat dar. Die Kontrollgruppe weist gegenüber den CD147 heterozygoten Mäusen deutlich mehr CyPA-positive Zellen auf. Diese Beobachtung wird durch die statistische Auswertung bestätigt (Abb. 15).

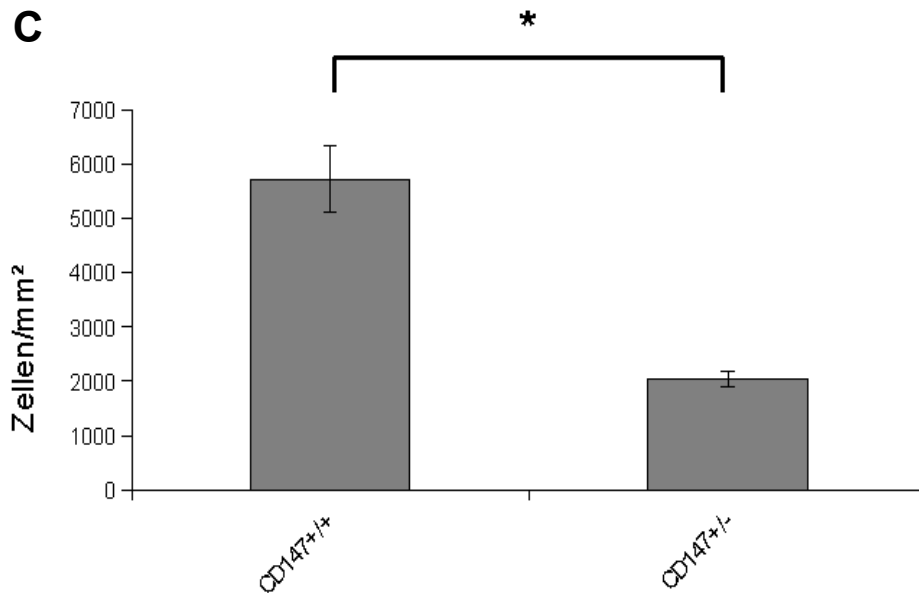
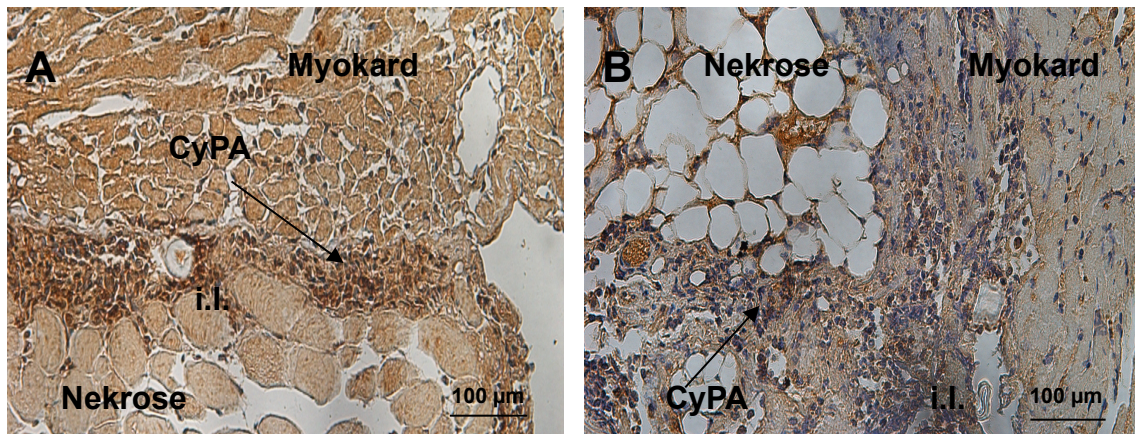
Die Zelldichte CyPA-positiver Zellen in Zählungen/mm<sup>2</sup> beträgt:

CD147<sup>+/+</sup>: 5719,16 ± 614,74

CD147<sup>+/-</sup>: 2050,87 ± 138,47

Der Unterschied ist signifikant (p=0,007).

## Ergebnisse



**Abb. 15** Infiltration CyPA-positiver Zellen bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen 24 Stunden nach I/R: Repräsentative anti-CyPA-Färbung von Paraffinschnitten von Wildtyp (A) und CD147<sup>+/-</sup> (B) Mäuseherzen 24h nach I/R. Die Präparate sind komplementär zu den vorangegangenen Versuchsreihen. Es sind jeweils Nekrose, inflammatorisches Infiltrat (i.l.) und Myokard im Bild. Die quantitative Auswertung (C) zeigt eine signifikant reduzierte Dichte an CyPA-positiven Zellen im inflammatorischen Infiltrat bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen (p=0,007; n=3).

## Ergebnisse

### **3.4 Infarktmorphologie von CD147<sup>+/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion**

#### **3.4.1 HE-Färbung der Infarktnarbe**

Bei CyPA-defizienten Mäusen ergibt sich 7d nach I/R ein signifikanter Unterschied der Zelldichte der Infarktnarben (Abb. 8). Dementsprechend wird auch bei den CD147<sup>+/-</sup> Mäusen 7d nach I/R eine Bestimmung der Zelldichte der Infarktnarbe vorgenommen, um zu untersuchen, ob sich die Unterschiede im Remodelling, die sich bei CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen ergeben, auch bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen auftreten.

Dafür werden HE-Färbungen der Herzen von 7d nach I/R geopfert Mäusen hergestellt (Abb. 16). Die Infarktnarben der CD147<sup>+/-</sup> Mäuse sind deutlich inhomogener als die der CD147<sup>+/+</sup> Mäuse. Während die Narben der Kontrollgruppe sehr zellreich sind, fallen in den Infarktnarben der für CD147 heterozygoten Mäuse große zellarme Areale auf.

Anhand dieser Präparate wird analog zu der Bestimmung der Zelldichte bei den CyPA<sup>+/+</sup> und CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen auch bei den CD147<sup>+/+</sup> und CD147<sup>+/-</sup> Mäusen die Zelldichte ermittelt.

Die Zelldichte in Zählungen/mm<sup>2</sup> beträgt:

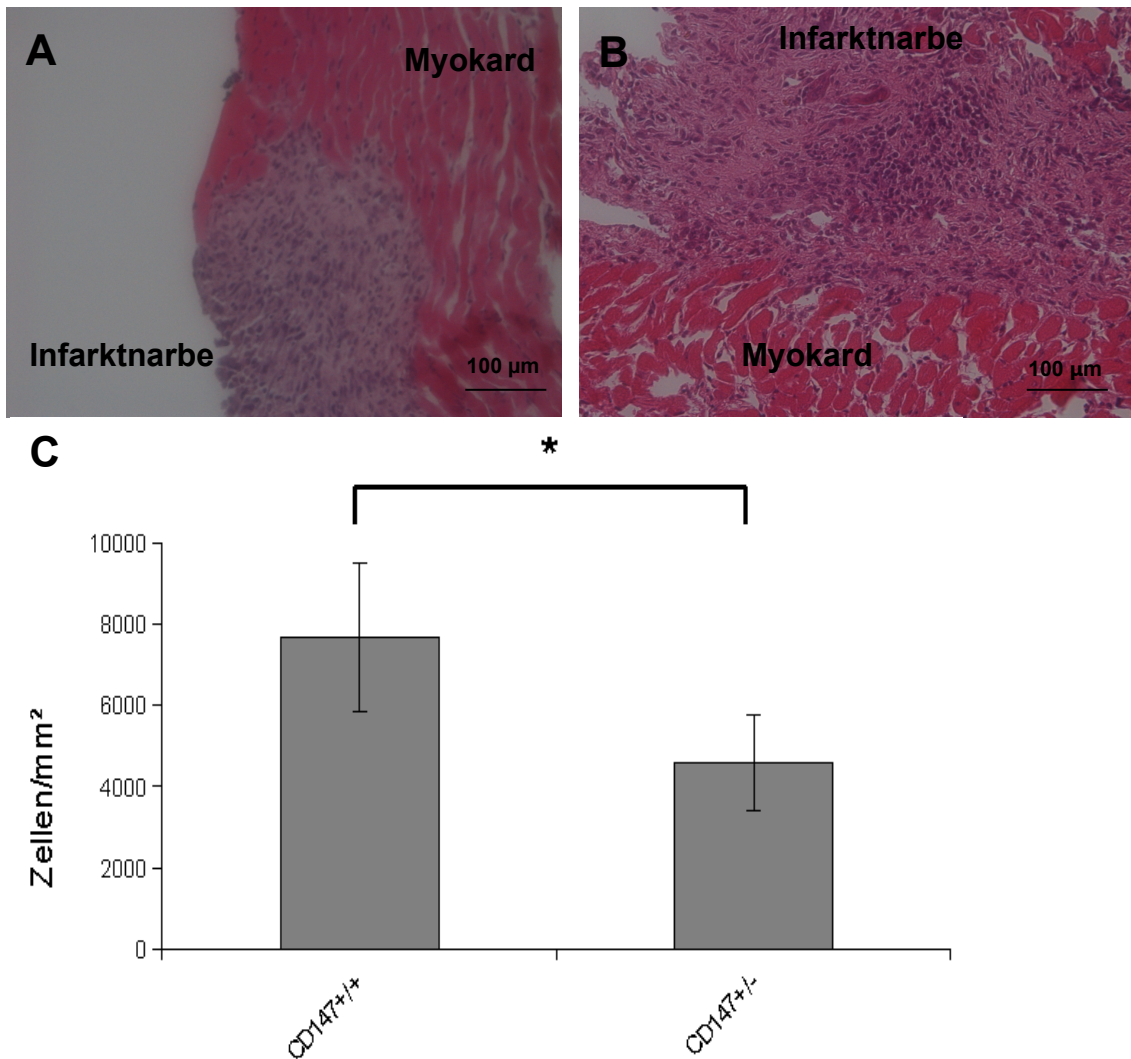
CD147<sup>+/+</sup>: 7658,48 ± 1831,41

CD147<sup>+/-</sup>: 4569,3 ± 1173,68

Der Unterschied ist signifikant (p=0,015) (Abb. 16).

Die Versuchsgruppe zeigt gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der Zelldichte. Die Zelldichte ist bei vermindert CD147 exprimierenden Mäusen auf etwa 60% im Vergleich zu 70% bei CyPA<sup>-/-</sup> reduziert (Abb. 8). Damit liegen vergleichbare Größenordnungen vor, obwohl die Versuche für die Infarktgröße unterschiedlich ausgeprägte Ergebnisse aufweisen (3.1.1 und 3.3.1).

## Ergebnisse



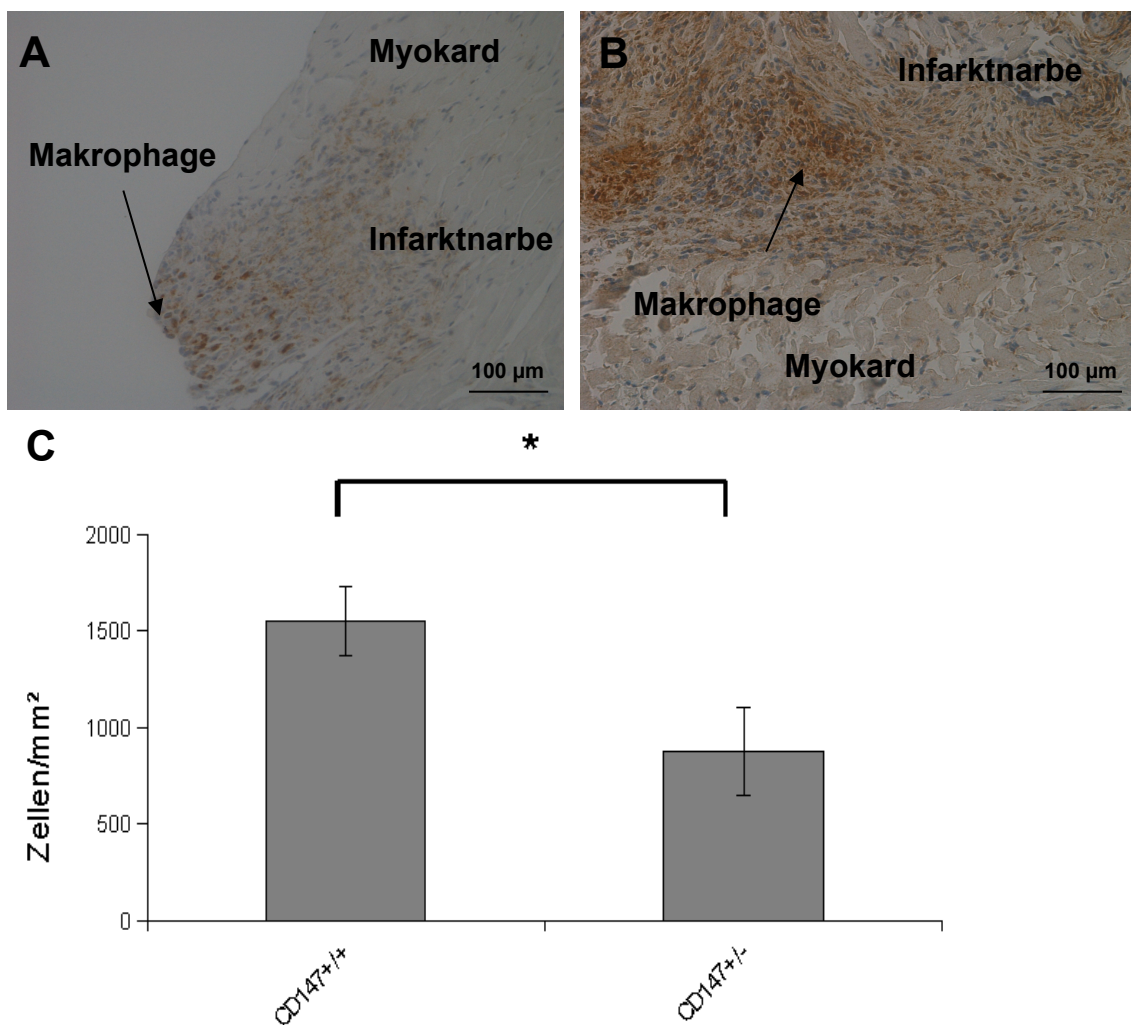
**Abb. 16** HE-Färbungen von CD147<sup>+/+</sup> Mäusen 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion: Repräsentative HE-gefärbte Paraffinschnitte von CD147<sup>+/+</sup> (A) und CD147<sup>+/-</sup> (B) Mäuseherzen 7d nach I/R euthanasierter Mäuse. Im Bild jeweils Infarkt Narbe und Myokard. Die Kontrollgruppe zeigt eine homogene, zellreiche Narbe. Die Infarkt Narbe der CD147<sup>+/-</sup> Maus weist zellreiche und zellarme Areale auf.(C) Quantitative Auswertung von HE-Färbungen von Mäuseherzen 7d nach I/R. Repräsentative Areale der Infarkt Narben werden ausgewählt und deren Zellzahl bestimmt. Die statistische Auswertung zeigt eine signifikante Minderung der Zelldichte bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen (p=0,015; n<sub>≥</sub>5).

## Ergebnisse

### 3.4.2 Immunhistochemie

#### 3.4.2.1 Nachweis von Makrophagen

Ebenso wie bei den CD147<sup>+/+</sup> und CD147<sup>+/-</sup> Mäusen 24h nach I/R wird zum Makrophagennachweis eine immunhistochemische Färbung des Makrophagenantigens Mac3 mit anti-Mac3 durchgeführt (Abb. 17). Dies soll Aufschluss darüber geben, ob eine verminderte Expression von CD147, die einen deutlichen Unterschied im Migrationsverhalten 24h nach I/R zeigt, binnen 7d kompensiert werden kann oder weiter besteht.



**Abb. 17** Infiltration von Makrophagen bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion: Repräsentative Paraffinschnitte von CD147<sup>+/+</sup> (A) und CD147<sup>+/-</sup> (B) Mäuseherzen 7d nach I/R anti-Mac3-gefärbt. Die Präparate sind komplementär zu den vorher untersuchten HE-Färbungen. Die Bilder zeigen

## Ergebnisse

Infarkt Narben im Myokard. Vor allem bei den CD147<sup>+/-</sup> Mäusen fällt in den zellreichen Arealen eine hohe Makrophagendichte auf. (C) Bestimmung der Makrophagen pro Fläche anhand repräsentativer Areale der Infarkt Narbe anti-Mac3-gefärbter Präparate von Mäuseherzen 7d nach I/R. Die Makrophagendichte ist in der quantitativen Analyse bei CD147<sup>+/-</sup> signifikant verringert ( $p=0,007$ ;  $n \geq 3$ ).

Bei der Betrachtung der Bilder fallen bei der Kontrollgruppe ähnlich wie bei der HE-Färbung homogene Narben auf, in denen sich Makrophagen gleichmäßig verteilen. Die von ihrer Zelldichte inhomogenen Narben der CD147<sup>+/-</sup> Mäuse weisen in den zellreichen Arealen eine sehr hohe Makrophagendichte auf. In den zellarmen Arealen hingegen finden sich nur wenige Makrophagen.

Die Auswertung erfolgt daher, um die Beobachtungen zu quantifizieren durch eine Bestimmung der Makrophagendichte anhand repräsentativer Areale zwischen 10.000 und 20.000  $\mu\text{m}^2$  der Infarkt Narben.

Die Dichte an Makrophagen in Zählungen/ $\text{mm}^2$  beträgt:

CD147<sup>+/+</sup>: 1551,92  $\pm$  176,77

CD147<sup>+/-</sup>: 872,69  $\pm$  227,12

Der Unterschied ist signifikant ( $p=0,007$ ) (Abb. 17).

Die Auswertung zeigt, dass die Infarkt Narben trotz punktuell höherer Makrophagendichte generell eine Minderung der Makrophagendichte aufweist. Insgesamt wird diese auf ca. 56% gesenkt. Im Vergleich zur Senkung der Zelldichte von etwa 60% sind die Makrophagen nur geringfügig stärker gesenkt. Die Makrophagendichte ist also ähnlich stark reduziert wie auch die Zelldichte. Dies passt zu der anfänglichen Beobachtung, dass sich in den zellreichen Arealen ähnlich viele Makrophagen wie in der Kontrollgruppe finden, allerdings die zellärmeren Areale auch deutlich weniger Makrophagen aufweisen.

## Ergebnisse

### 3.4.2.2 Nachweis MMP9-positiver Zellen

Die bisherigen Untersuchungen zeigen einen deutlichen Effekt einer verminderten Expression von CD147 auf die Zelldichte und Makrophagendichte der Infarktzone. Dabei wird jedoch keine weitere Erkenntnis über deren Aktivität und Migrationsverhalten gewonnen. Um die Extrazellulärmatrix zu degradieren, benötigen inflammatorische Zellen MMP9.<sup>158</sup> Eine der wichtigsten Funktionen von CD147 ist die Induktion von MMP9.<sup>144,80,163</sup>

Deshalb ist von Interesse, ob die MMP9-Aktivität ähnlich wie im inflammatorischen Infiltrat 24h nach I/R durch die verminderte Expression von CD147 der CD147<sup>+/-</sup> Mäuse entscheidend beeinträchtigt ist.

Eine immunhistochemische anti-MMP9-Färbung zeigt jedoch nur das Ausmaß der MMP9 produzierenden Zellen und korreliert nicht direkt mit erhöhter MMP9-Aktivität im Myokard (Abb. 18).

Die anti-MMP9-Färbung zeigt eine deutliche Minderung der MMP9 exprimierenden Zellen in den Infarktstellen von CD147<sup>+/-</sup> Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe. Zur statistischen Auswertung werden jeweils mehrere repräsentative Areale pro Präparat mit einer Größe zwischen 10.000 und 20.000µm<sup>2</sup> ausgezählt.

Die Zelldichte MMP9-positiver Zellen in Zählungen/mm<sup>2</sup> beträgt:

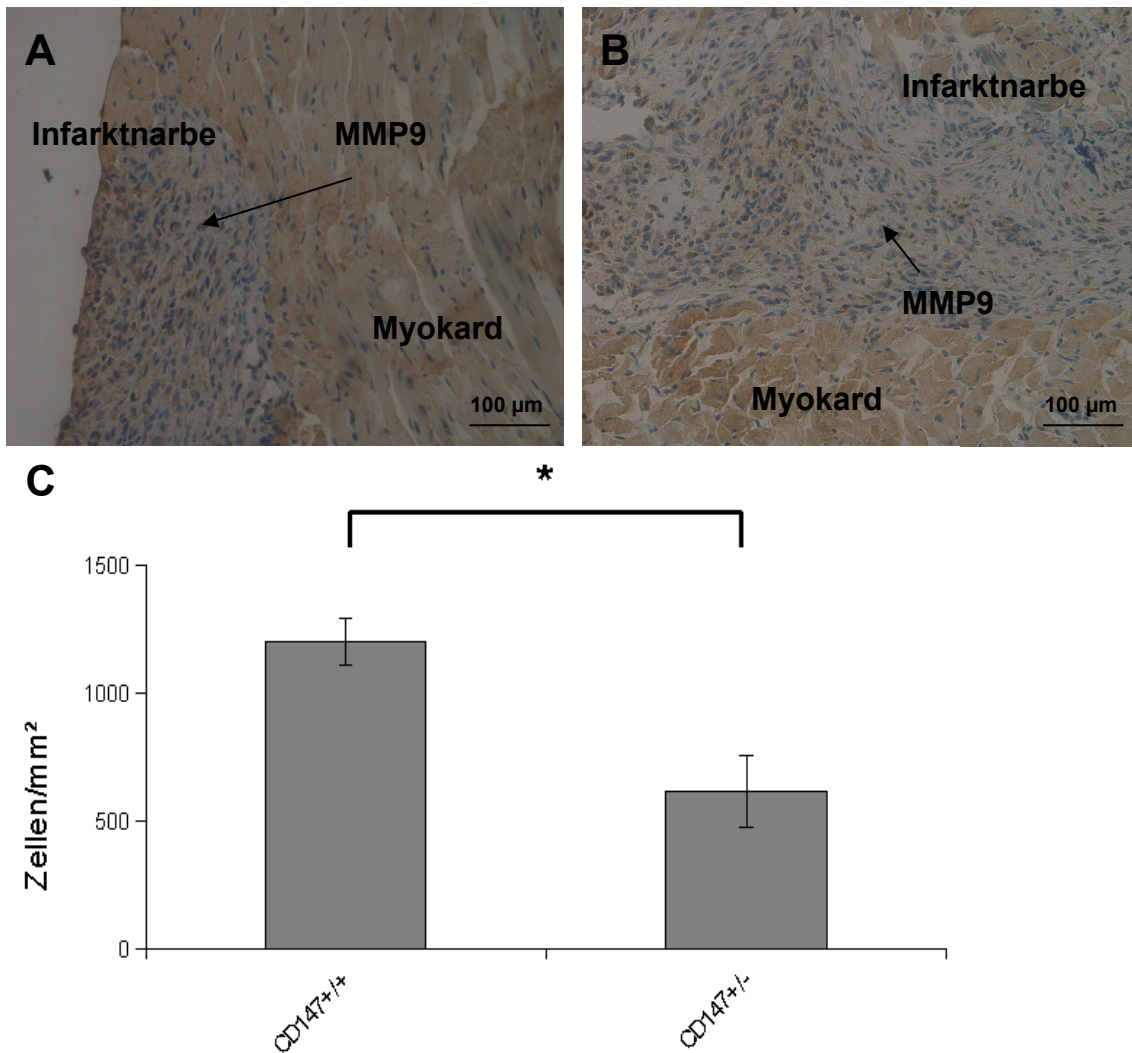
CD147<sup>+/+</sup>: 1198,25 ± 92,5

CD147<sup>+/-</sup>: 614,68 ± 142,27

Der Unterschied ist signifikant (p=0,001) (Abb. 18).

Die Auswertung der betrachteten Areale zeigt eine Reduzierung der Dichte an MMP9-produzierenden Zellen auf ca. 51%. Der Unterschied ist signifikant. Der Effekt ist damit stärker ausgeprägt als die Reduzierung der Zelldichte MMP9-positiver Zellen auf etwa 60% nach 24h (Abb. 14). Somit geht eine verminderte Expression von CD147 sowohl mit einer signifikant niedrigeren MMP9 Expression 24h und 7d nach I/R einher.

## Ergebnisse

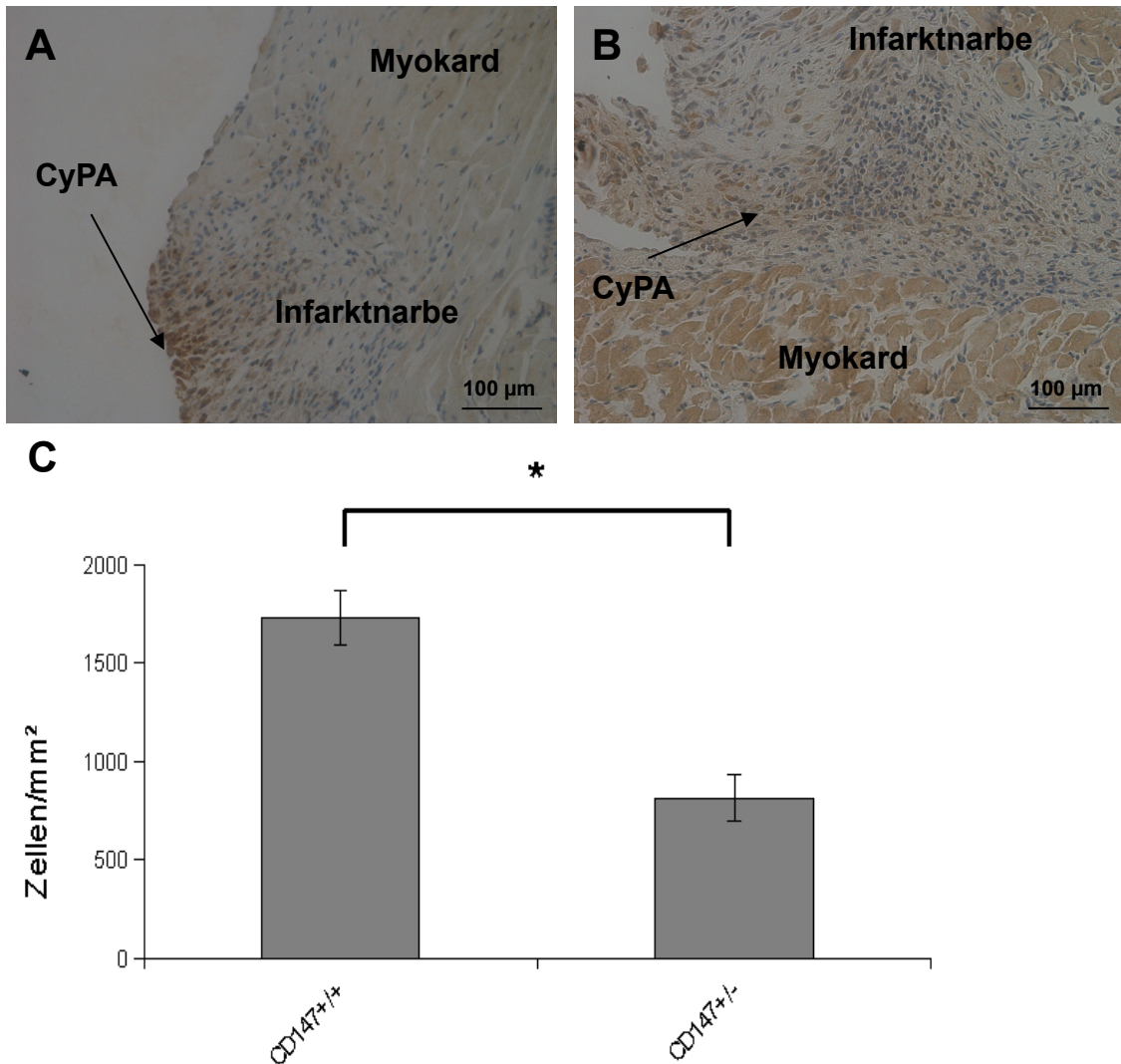


**Abb. 18** Infiltration MMP9-positiver Zellen bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion: Repräsentative anti-MMP9-Färbungen von CD147<sup>+/+</sup> (A) und CD147<sup>+/-</sup> (B) Mäuseherzen 7d nach I/R komplementär zu den vorangegangenen Versuchsreihen. Die Bilder zeigen jeweils Infarkt Narbe im Myokard. Es finden sich bei den CD147<sup>+/-</sup> Mäusen weniger MMP9 exprimierende Zellen in ähnlich großen Arealen. (C) Statistische Auswertung der MMP9-Dichte anhand von anti-MMP9-gefärbter Mausherzpräparate. CD147<sup>+/-</sup> Mäuse weisen eine signifikant geringere MMP9-Dichte auf (p=0,001; n≥3).

## Ergebnisse

### 3.4.2.3 Nachweis von CyPA

Der Unterschied in der CyPA-Expression 24h nach I/R und die nach 7d weiter bestehende Minderung der MMP9 Aktivität macht einen Effekt auf die CyPA-Expression 7d nach I/R ebenfalls wahrscheinlich. Deshalb werden von den Präparaten immunhistologische anti-CyPA-Färbungen angefertigt (Abb. 19).



**Abb. 19** Infiltration CyPA-positiver Zellen bei CD147<sup>+/-</sup> Mäuse 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion: Gezeigt werden repräsentative anti-CyPA-Färbungen von CD147<sup>+/+</sup> (A) und CD147<sup>+/-</sup> (B) Mäuseherzen 7d nach I/R komplementär zu den vorangegangenen Versuchsreihen. Im Bild sind jeweils Infarkttnarben im Myokard gezeigt. Die Kontrollgruppe zeigt teils hohe Konzentrationen CyPA sezernierender Zellen auf, während die CD147<sup>+/-</sup> Mäuse relativ gleichmäßig über die Infarkttnarbe verteilt wenige CyPA-positive Zellen aufweisen. (C) Die

## Ergebnisse

quantitative Auswertung der CyPA-Dichte zeigt eine signifikante Reduktion bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen ( $p=0,001$ ;  $n\geq 3$ ).

Die Färbungen zeigen ähnlich wie bei den Makrophagen eher ein unterschiedliches Verteilungsmuster. Die Präparate der Kontrollgruppe weisen verhältnismäßig zeldichte Areale in den Infarktarnen zusätzlich zu einer tendenziell erhöhten Dichte angefärbter Zellen auf. Die CD147<sup>+/-</sup> Mäuse hingegen fallen durch ein eher homogenes Verteilungsmuster auf.

Die Präparate werden zur genaueren Beurteilung ausgewertet, indem die Anzahl anti-CyPA-gefärbter Zellen in repräsentativen Arealen zwischen 10.000 und 20.000  $\mu\text{m}^2$  ausgezählt wird.

Die Zelldichte CyPA-positiver Zellen in Zählungen/ $\text{mm}^2$  beträgt:

CD147<sup>+/+</sup>:  $1726 \pm 138,84$

CD147<sup>+/-</sup>:  $815,43 \pm 119,91$

Der Unterschied ist signifikant ( $p=0,001$ ) (Abb. 19).

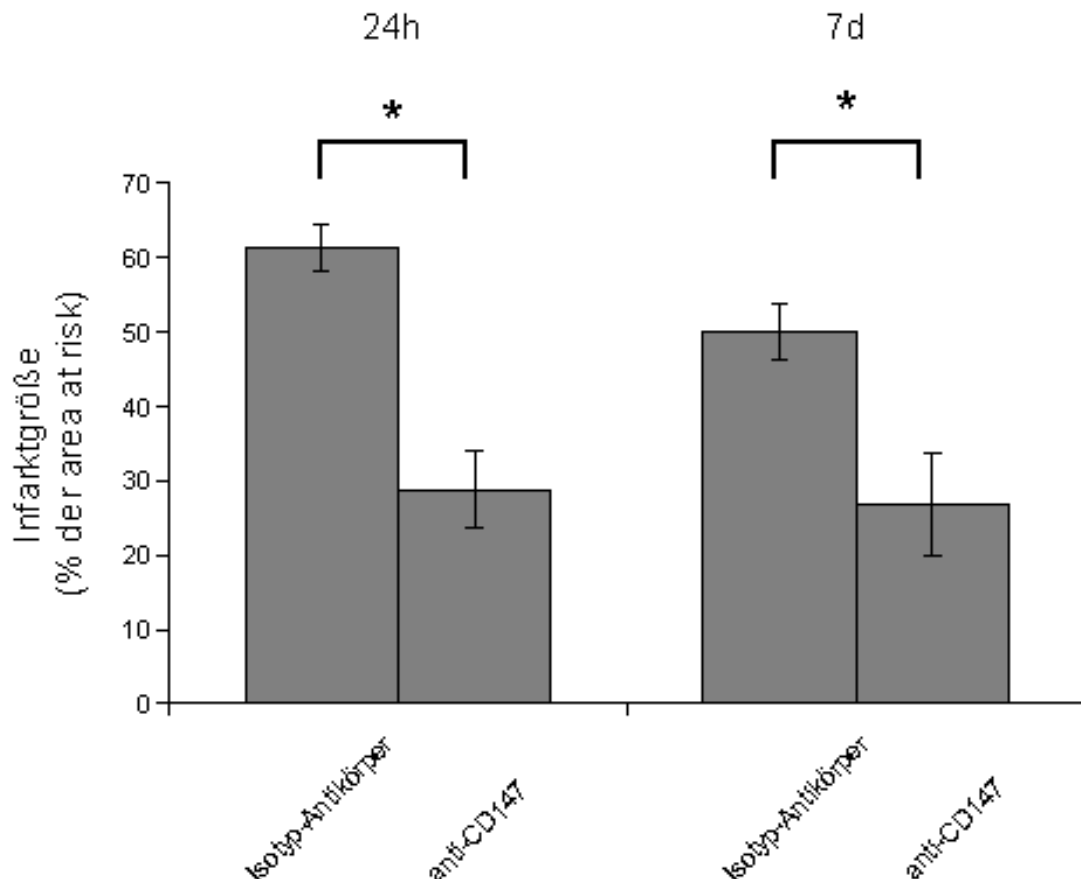
Die statistische Auswertung bestätigt den in der Übersicht gewonnenen Eindruck dahingehend, dass die CyPA-Dichte der CD147<sup>+/-</sup> Mäuse auf etwa 48% im Vergleich zur CyPA-Dichte von CD147<sup>+/+</sup> Mäusen reduziert ist. Dieser Unterschied ist signifikant. Die Zelldichte war dagegen 24h nach I/R im Vergleich zur Kontrollgruppe nur auf ca. 60% (Abb. 15) reduziert.

## Ergebnisse

### 3.5 Infarktmorphologie anti-CD147-behandelter Mäuse 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion

#### 3.5.1 Beurteilung der Infarktgröße

CD147 ist ein extrazelluläres Protein. Deshalb lässt sich CD147 mit einem anti-CD147 Antikörper binden. Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Infarktgröße 24h und 7d nach I/R bei mit anti-CD147 behandelten Mäusen signifikant gegenüber den mit der Isotypkontrolle behandelten Mäusen verringert ist (Abb. 20). Jede Maus wurde eine Stunde vor, sowie sechs und 18 Stunden nach chirurgischem Eingriff mit anti-CD147-Antikörper behandelt.



**Abb. 20** Quantitative Auswertung der Infarktgrößen anti-CD147-behandelter Mäuse nach Ischämie/Reperfusion: Die Gegenüberstellung der quantitativen Analysen der Infarktgrößen in Bezug auf die „area at risk“ 24h und 7d nach I/R zeigt eine Minderung der relativen Infarktgröße der Kontrollgruppe bei annähernd gleichbleibender Infarktgröße der Versuchsgruppe. Der Unterschied ist dennoch jeweils signifikant. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ochmann.

## Ergebnisse

### 3.5.2 HE-Färbung des inflammatorischen Infiltrats

Anti-CD147-behandelte Mäuse zeigen 24h nach I/R eine signifikante Reduzierung der Infarktgrößen. Eine genauere histologische Untersuchung der Herzen kann Aufschluss darüber geben, ob die Minderung der Infarktgröße mit einem Effekt auf das Migrationsverhalten im inflammatorischen Infiltrat korreliert.

Dazu werden HE-Färbungen der Mäuseherzen angefertigt (Abb. 21).

Die Betrachtung der HE-Färbung zeigt einen deutlichen Unterschied hinsichtlich der Organisation des inflammatorischen Infiltrats, das bei den anti-CD147-behandelten Mäusen einer lockeren Zellansammlung gleicht, während die inflammatorischen Infiltrate der Isotypkontrollen sehr zellreiche Infiltrate aufweisen. Die Auswertung der HE-Färbung erfolgt mittels Bestimmung der Zelldichte der inflammatorischen Infiltrate.

Die Zelldichte des inflammatorischen Infiltrats in Zählungen/mm<sup>2</sup> beträgt:

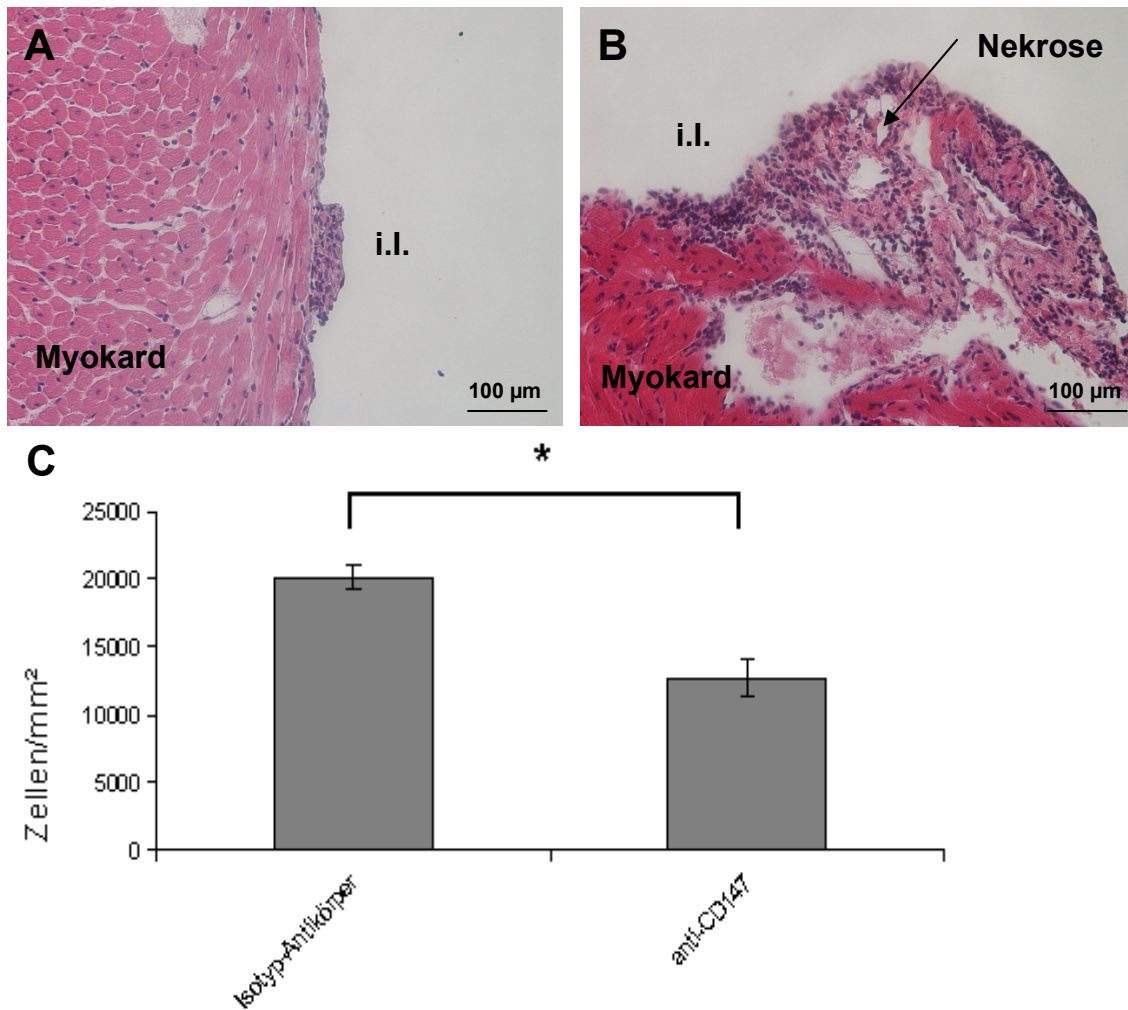
C57Bl/6J, behandelt mit anti-CD147-Antikörper: 12732,13 ± 1389,88

C57Bl/6J, behandelt mit CD147-Isotyp: 20123,91 ± 865,21

Der Unterschied ist signifikant ( $p=0,000$ ) (Abb. 21).

Die Zelldichte der inflammatorischen Infiltrate reduziert sich signifikant bei den anti-CD147-behandelten Mäusen. Die Reduktion erfolgt im Mittel auf ca. 63%. Die Reduktion der Zelldichte ist damit allerdings weniger ausgeprägt im Vergleich zu der Reduktion bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen auf 49% (Abb. 11) und CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen auf 56% (Abb. 5). Dies geht mit der oben beschriebenen etwas anders gearteten Morphologie der inflammatorischen Infiltrate der anti-CD147-behandelten Mäuse einher.

## Ergebnisse



**Abb. 21** HE-Färbungen von anti-CD147-behandelten Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion: Repräsentative HE-Färbungen von mit anti-CD147 (A) und mit der Isotypkontrolle (B) behandelten Mäuseherzen 24h nach I/R, die mit 3 Injektionen anti-CD147 behandelt sind. Man erkennt inflammatorische Infiltrate (i.I.) und Myokard. Färbung B zeigt einzelne Nekrosen. Es fällt auf, dass das Infiltrat in Färbung A sehr kompakt und zellreich ist, während das Infiltrat in Färbung B einen eher lockeren Zellverbund zeigt. (C) Die quantitative Auswertung der Zelldichte der inflammatorischen Infiltrate von anti-CD147-behandelter Mäusen zeigt 24h nach I/R eine signifikant erniedrigte Zelldichte ( $p=0,000$ ;  $n\geq 6$ ).

## Ergebnisse

### 3.5.3 Immunhistochemie

#### 3.5.3.1 Nachweis von Makrophagen

Um die untersuchten inflammatorischen Infiltrate hinsichtlich ihrer Zellen zu charakterisieren wird eine anti-Mac3-Färbung angefertigt, die den Makrophagenmarker Mac3 der Präparate markiert (Abb. 22).

Die Sichtung der anti-Mac3-gefärbten Präparate lässt einen deutlichen Unterschied der Makrophagendichte vermuten. Ein solcher kann angesichts der bisherigen Untersuchungen von CyPA-defizienten Mäusen und Mäusen mit verminderter CD147-Expression und einem ähnlichen Verhalten der Zelldichte als wahrscheinlich angenommen werden.

Zur Quantifizierung erfolgt eine Messung der Makrophagendichte.

Die Zelldichte an Makrophagen des inflammatorischen Infiltrats in Zählungen/mm<sup>2</sup> beträgt:

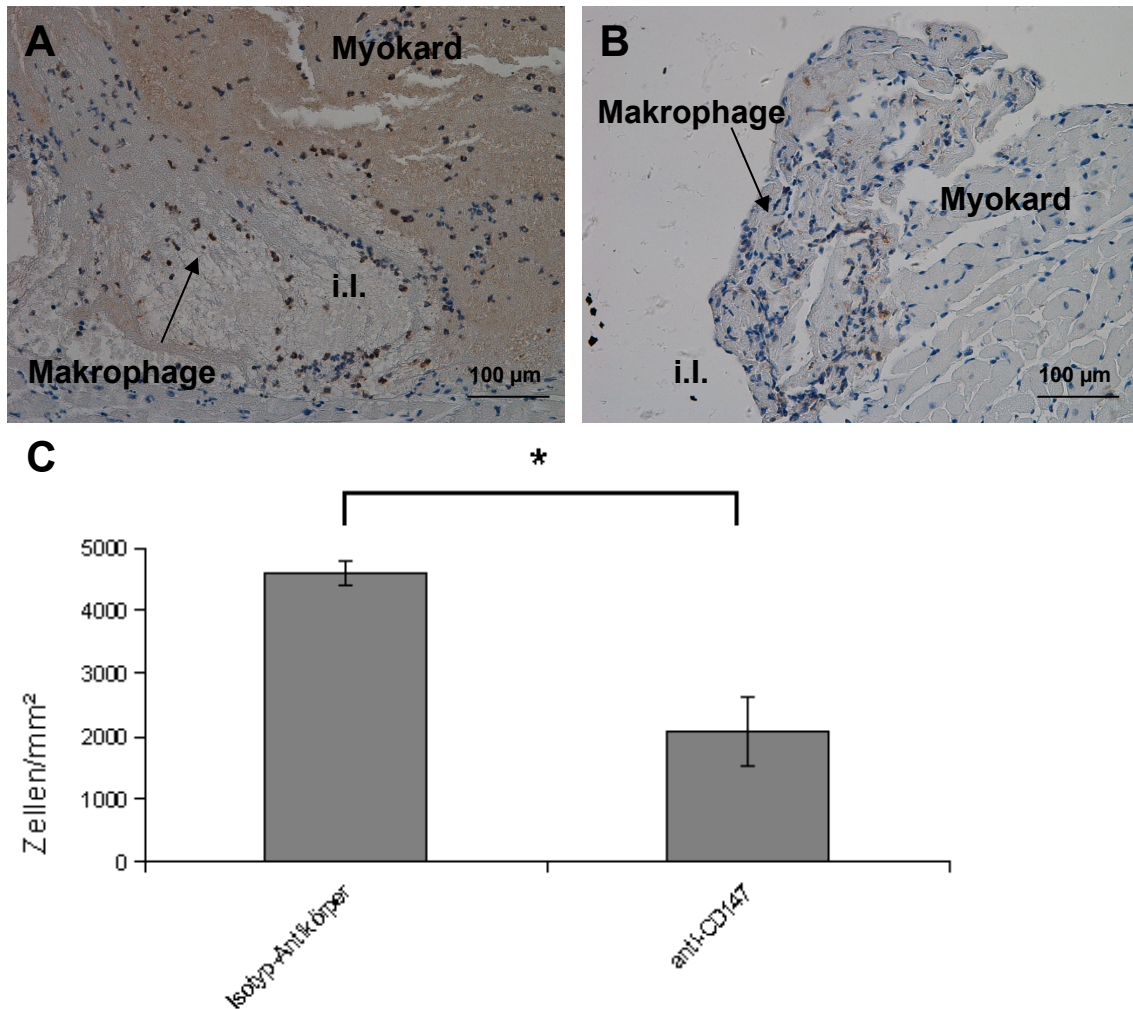
C57Bl/6J, behandelt mit anti-CD147-Antikörper: 2067,55 ± 552,02

C57Bl/6J, behandelt mit CD147-Isotyp: 4598,68 ± 186,61

Der Unterschied ist signifikant ( $p=0,001$ ) (Abb. 22).

Die Makrophagendichte der anti-CD147-behandelten Mäuse ist gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert. Die mittlere Reduzierung beträgt etwa 45%. Diese Verminderung der Makrophagendichte fällt gegenüber einer Reduzierung der Zelldichte auf etwa 63% deutlicher aus. In den anderen Versuchen 24h nach I/R ergab sich eine Reduktion der Makrophagendichte auf 42% bei CyPA-defizienten Mäusen (Abb. 6) und 31% bei Mäusen mit verminderter CD147-Expression (Abb. 12). Die anti-CD147-behandelten Mäuse erreichen damit ähnliche Werte wie die CyPA<sup>-/-</sup> Mäuse.

## Ergebnisse



**Abb. 22** Infiltration von Makrophagen bei anti-CD147-behandelten Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion: Zu sehen sind repräsentative anti-Mac3-gefärbte Präparate von anti-CD147-behandelten Mäuseherzen 24h nach I/R komplementär zu den vorher untersuchten HE-Färbungen. Die Präparate zeigen inflammatorische Infiltrate (i.l.) mit Nekrose und Myokard. Die Antikörper-behandelten Mäuse (A) zeigen nur relativ sporadisch Makrophagen im Gegensatz zu den mit der Isotypkontrolle behandelten Versuchstiere (B). (C) Quantitative Auswertung der Makrophagendichte der inflammatorischen Infiltrate. Die inflammatorischen Infiltrate der anti-CD147-behandelten Mäuse weisen eine signifikant verringerte Makrophagendichte auf ( $p=0,001$ ;  $n=4$ ).

## Ergebnisse

### 3.5.3.2 Nachweis neutrophiler Granulozyten

Die übrigen Versuchsreihen zeigen eine signifikante Minderung neutrophiler Granulozyten 24h nach I/R im inflammatorischen Infiltrat. Aufgrund von bereits oben beschriebenen Auffälligkeiten des Migrationsverhalten von Zellen der angeborenen Immunität bei anti-CD147-behandelten Mäusen 24h nach I/R folgt eine anti-PMN-Färbung zur Untersuchung neutrophiler Granulozyten im inflammatorischen Infiltrat (Abb. 23).

Anti-CD147-behandelte Mäuse zeigen gegenüber der Kontrollgruppe eine deutliche Minderung der neutrophilen Granulozyten im inflammatorischen Infiltrat. Dies zeigt sich auch bei der statistischen Auswertung.

Die Zelldichte des inflammatorischen Infiltrats in Zählungen/mm<sup>2</sup> beträgt:

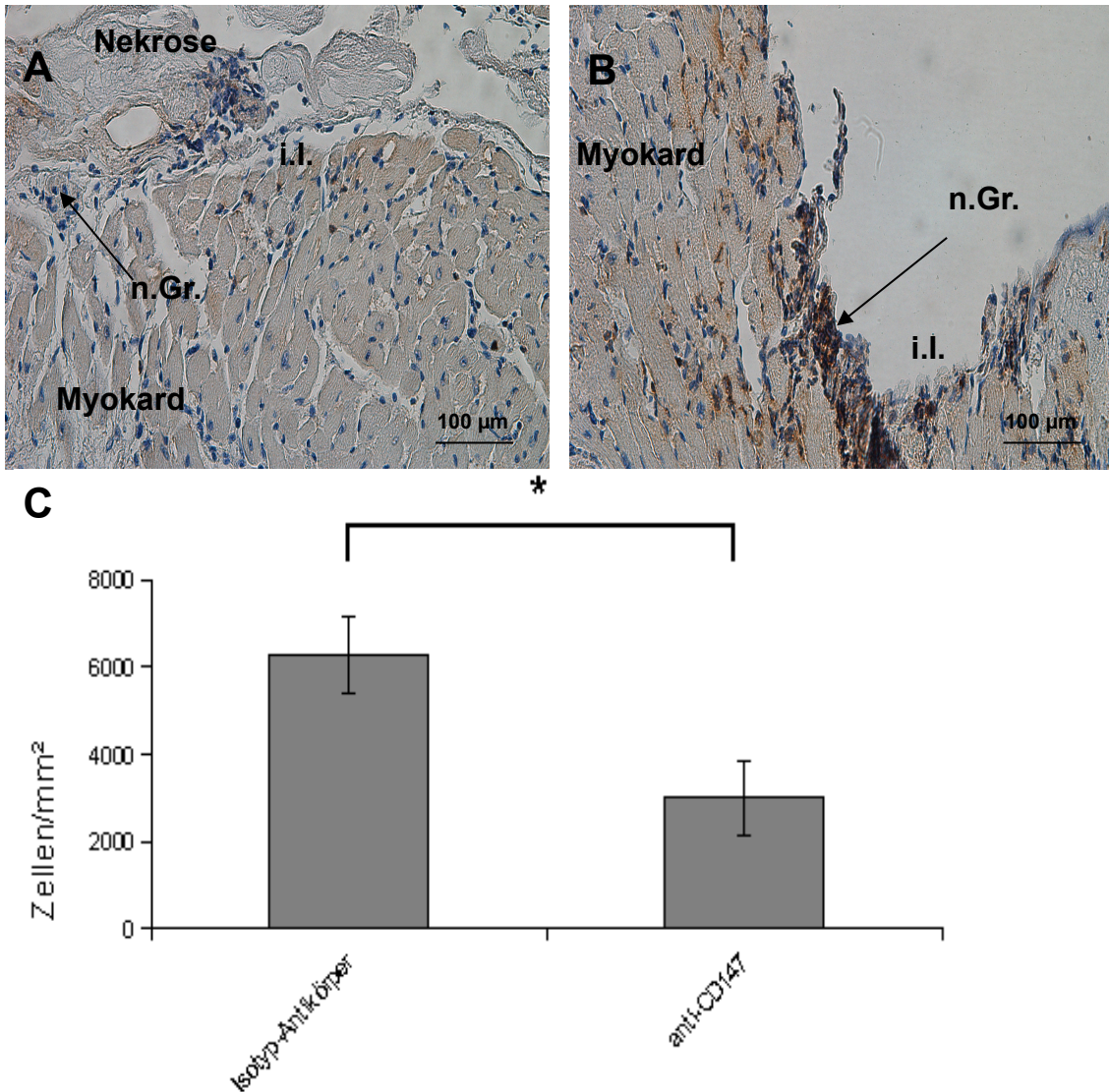
C57Bl/6J, behandelt mit anti-CD147-Antikörper: 3002,57 ± 861,09

C57Bl/6J, behandelt mit CD147-Isotyp: 6278,22 ± 877,33

Der Unterschied ist signifikant ( $p=0,001$ ) (Abb. 23).

Die Neutrophilendichte ist bei anti-CD147-behandelten Mäusen signifikant reduziert. Die Neutrophilendichte beträgt etwa 48% im Vergleich zu 35% bei CyPA-defizienten Mäusen (Abb. 7) und 41% bei vermindert CD147 exprimierenden Mäusen (Abb. 13). Ähnlich wie bei den Makrophagen fällt die Reduzierung also etwas weniger deutlich aus als bei den anderen beiden Versuchsreihen.

## Ergebnisse



**Abb. 23** Infiltration von neutrophilen Granulozyten bei anti-CD147-behandelten Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion: Zu sehen sind repräsentative anti-PMN-gefärbte Präparate von anti-CD147-behandelten Mäuseherzen 24h nach I/R komplementär zu den vorangegangenen Versuchsreihen. Die Präparate zeigen inflammatorische Infiltrate (i.l.) mit Nekrose und Myokard. In den inflammatorischen Infiltraten der anti-CD147-behandelten Versuchstiere (A) sind deutlich weniger neutrophile Granulozyten (n.Gr.) als bei der Kontrollgruppe (B) zu erkennen. (C) Die quantitative Analyse der Neutrophilendichte der inflammatorischen Infiltrate zeigt eine signifikante Reduktion bei anti-CD147-behandelten Mäusen ( $p=0,001$ ;  $n\geq 4$ ).

## Ergebnisse

### **3.6 Infarktmorphologie anti-CD147-behandelter Mäuse 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion**

#### **3.6.1 HE-Färbung der Infarktnarbe**

Anti-CD147-behandelte Mäuse weisen 7d nach I/R und anti-CD147-Behandlung signifikant verminderte Infarktgrößen auf. Die untersuchten Mäuseherzen werden zur histologischen Aufarbeitung in Paraffin eingebettet und bei -20°C gekühlt, um 4µm dicke Präparate herzustellen, die HE-gefärbt werden, um die Infarktnarben zu untersuchen (Abb. 24).

Die angefertigten Präparate zeigen ein ähnliches Bild wie die Präparate der CD147 und CyPA Mäuse 7d nach I/R.

Die Auswertung erfolgt, indem die Zellen repräsentativer Areale aus der Infarktnarbe mit einer Fläche zwischen 10.000 und 20.000µm<sup>2</sup> ausgezählt werden.

Die Zelldichte der Infarktnarbe in Zählungen/mm<sup>2</sup> beträgt:

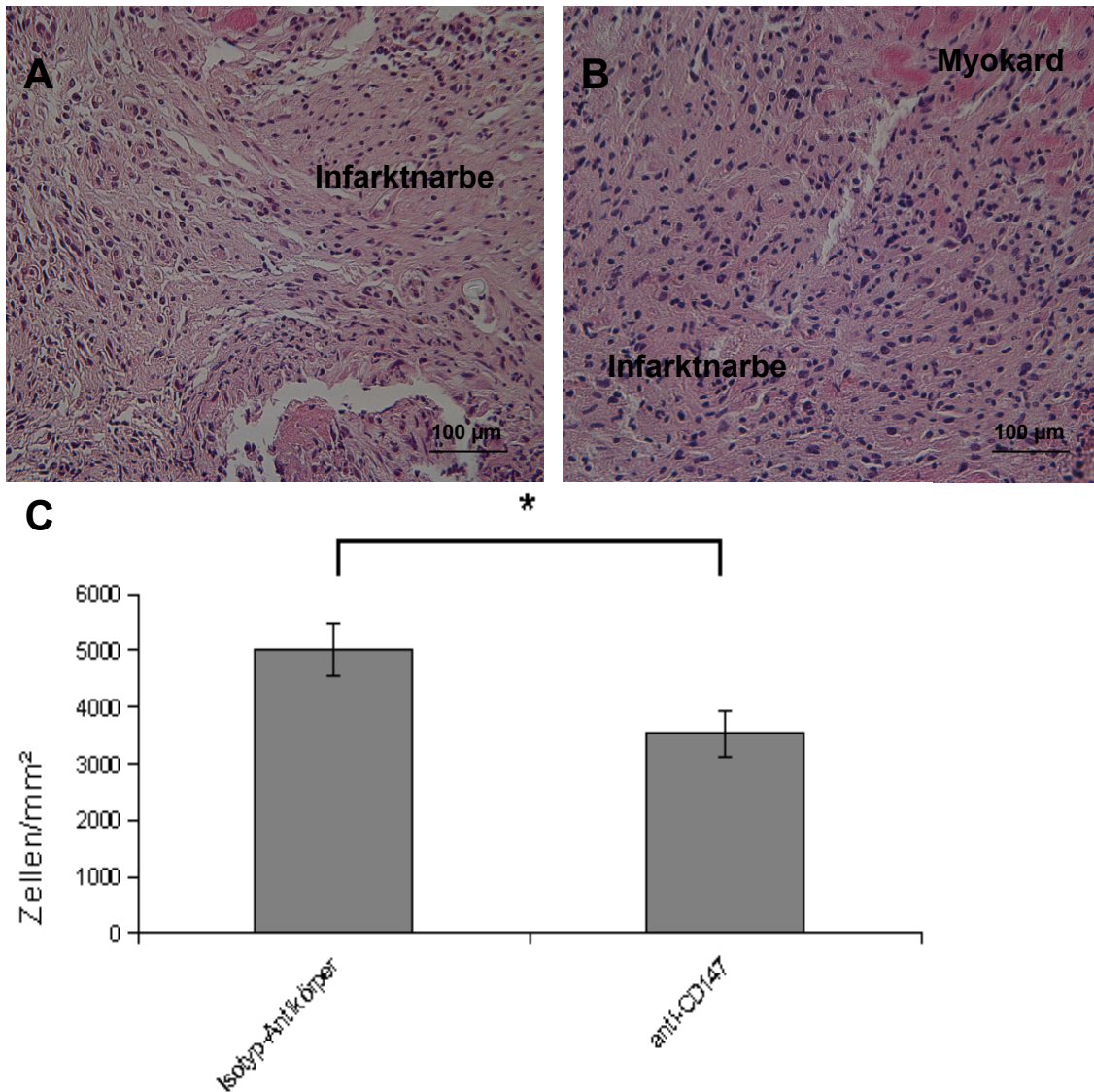
C57Bl/6J, behandelt mit anti-CD147-Antikörper: 3521,61 ± 399

C57Bl/6J, behandelt mit CD147-Isotyp: 5015,12 ± 469,51

Der Unterschied ist signifikant (p=0,003) (Abb. 24).

Die anti-CD147-behandelten Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion der Zelldichte. Die Zelldichte der anti-CD147-behandelten Mäuse beträgt im Mittel etwa 70% der Zelldichte der Kontrollgruppe. Der Unterschied fällt im Vergleich zu CD147<sup>+/-</sup> Mäusen mit einer Reduktion der Zelldichte auf 60% (Abb. 17) und CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen mit einer Reduktion der Zelldichte auf 70% (Abb. 8) gleich groß aus.

## Ergebnisse



**Abb. 24** HE-Färbungen von anti-CD147-behandelten Mäusen 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion: Repräsentative HE-Färbungen von mit anti-CD147 (A) und mit der Isotypkontrolle (B) behandelten Mäusen 7d nach I/R. Im Bild sind Infarktstellen im Myokard gezeigt. Die Zelldichte der anti-CD147-behandelten Mäuse scheint deutlich erniedrigt gegenüber der Kontrollgruppe. (C) Die quantitative Auswertung zeigt eine signifikante Minderung der Zelldichte bei anti-CD147-behandelten Mäusen ( $p=0,003$ ;  $n=4$ ).

Damit zeigen sowohl eine verminderte Expression von CD147, CyPA-Defizienz als auch anti-CD147-Behandlung einen kardioprotektiven Effekt, indem die Infarktgröße sich gegenüber den Kontrollgruppen reduziert. Ebenso ist die Zelldichte des inflammatorischen Infiltrats 24h nach I/R als auch die Zelldichte

## Ergebnisse

der Infarkt Narben 7d nach I/R signifikant vermindert. Diese Ergebnisse bestätigen sich dadurch, dass in allen drei Versuchsreihen, die Makrophagendichte und Neutrophilendichte des inflammatorischen Infiltrats für die CD147<sup>+/-</sup> und CyPA<sup>-/-</sup> Mäuse bzw. die anti-CD147-behandelten Mäuse verringert ist.

Zudem ist bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen die MMP9-Aktivität sowohl im inflammatorischen Infiltrat als auch in der Infarkt Narbe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Ebenso exprimieren diese Mäuse weniger CyPA.

## Diskussion

### 4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die pathophysiologische Rolle des Rezeptors CD147 und seines Liganden CyPA bei der Regulation des Ausmaßes myokardialer Schädigung nach I/R im Mausmodell zu untersuchen. Die Infarktgröße ist einer der besten prognostischen Marker für Infarktpatienten. Von daher ist das Verständnis der Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts wichtig, um Strategien für zukünftige therapeutische Regimes entwickeln zu können.

Dazu wurde anhand verschiedener Mausmodelle im Rahmen der Ischämie/Reperfusion der Effekt einer CyPA-Defizienz und einer verminderten Expression von CD147 sowie einer Blockierung von CD147 durch monoklonale anti-CD147 Antikörper beobachtet.

Dieser Antikörper hemmt spezifisch die CD147-vermittelte Leukozytenchemotaxis ohne die MMP-Regulation entscheidend zu beeinflussen.

#### 4.1 Das Versuchsmodell

##### 4.1.1 Die Maus als Versuchstier

CD147 heißt bei der Maus Basigin (Bsg). Für die Versuche der durchgeführten Studie wurden Mäuse vom Stamm C57 Bl/6J bzw. vermindert CD147 exprimierende Mäuse als Bsg<sup>+/-</sup>, in dieser Arbeit als CD147<sup>+/-</sup> bezeichnet, verwendet. Die aus dem Mausstamm 129S6/SvEv<sup>24</sup> gezüchteten Cg-Ppia<sup>tm1Lubn</sup>/J Mäuse heißen nach dem für CyPA kodierenden Gen Ppia<sup>-/-</sup> oder CyPA<sup>-/-</sup>. Im folgenden werden die Versuchstiere mit CyPA<sup>-/-</sup> benannt.

Es gibt die Möglichkeit verschiedener Tiermodelle für den akuten Myokardinfarkts. Nachdem ursprünglich vor allem Hunde eingesetzt wurden, etablierten sich im Verlauf aufgrund des öffentlichen Drucks Schweine als Versuchstiere. Das bei Schweinen dem Menschen ähnliche Verhältnis von Herzgröße zum Körpergewicht von 5g/kg gilt jedoch nur für Versuchstiere mit

## Diskussion

einem Körpergewicht zwischen 25-30kg. Ein einjähriges Schwein erreicht jedoch ein Körpergewicht von 150kg, während das Verhältnis des Herzgewicht zum Körpergewicht schon bei 100kg auf die Hälfte des menschlichen Verhältnisses sinkt.<sup>156</sup> Bei Mäusen beträgt das Herzgewicht variierend je nach Mausstamm 5-6g/kg.<sup>49</sup>

Auch Ratten und Kaninchen sind im Ischämie/Reperfusionmodell genutzt worden. Die Nutzung dieser Modelle war von der Entwicklung der für die Mikrochirurgie und die Messung des regionalen Metabolismus benötigten Instrumente abhängig.<sup>156</sup> Ratten waren in der jüngeren Vergangenheit das gegenüber der Maus für kardiale Chirurgie bevorzugte Modell. Der Hauptvorteil lag darin, dass die Ratte im Durchschnitt etwa zehnmal größer als die Maus ist, so dass der für die Ischämie/Reperfusion nötige Eingriff leichter durchzuführen war. Die Entwicklung von mikrochirurgischen Instrumenten neuerer Generation hat den Schweregrad des Eingriffs der Ischämie/Reperfusion an Mäusen dem an Ratten angeglichen.<sup>151,86</sup>

Die Entwicklung transgener Mäuse machte die Maus zum bevorzugten Modell für Ischämie/Reperfusion. Die ausführliche Charakterisierung des Mausgenoms und dessen verhältnismäßig einfache Manipulation sowie die kurze Reproduktionszeit (21 Tage) bei leichter Führbarkeit der Versuchstiere lassen die Maus als Versuchstier anderen Säugetieren überlegen erscheinen.<sup>159,151,35</sup>

Mäuse eignen sich zudem als Versuchstiere wegen ihrer im Vergleich zu anderen Versuchstieren wie z.B. Kaninchen oder Schweinen geringeren Haltungskosten. Dies erklärt sich unter anderem durch geringeren Futtermittelverbrauch und geringeren Platzbedarf.<sup>151</sup>

Die Anatomie des Mäuseherzens weist prinzipiell einen im Vergleich zum Menschenherz ähnlichen Aufbau mit zwei Kammern und zwei Vorhöfen auf. Die Struktur der Ventrikel sowie der Verlauf der Koronargefäße ist durchaus vergleichbar.<sup>159</sup> Es existieren jedoch auch anatomische Unterschiede, so bestehen eine singuläre Pulmonalvene,<sup>159</sup> eine separat das Septum

## Diskussion

versorgenden Koronararterie,<sup>79</sup> eine Positionierung des Sinusknotens in der Vena Cava Superior<sup>82</sup> und ein höherer Gehalt des Myokards an Mitochondrien bei der Maus.<sup>8</sup>

Die Reaktion auf inflammatorische Prozesse weicht von der Reaktion des Menschen oder anderer größerer Säugetiere teilweise jedoch nicht grundlegend ab. Unterschiede eine schnellere Angiogenese und Bildung von Granulationsgewebe betreffend wurden unter anderem beschrieben. Diese Unterschiede sind jedoch nicht so gravierend, als dass Mäuse als ungeeignet für den Vergleich zum humanen Myokardinfarkt angesehen werden können.<sup>26</sup>

Dennoch liegen Unterschiede zwischen dem Mausmodell und einer Studie an Menschen auf der Hand. Im Mausmodell gewonnene Erkenntnisse sind bestenfalls vergleichbar mit ähnlichen Versuchen an anderen Versuchstieren, mit großer Wahrscheinlichkeit jedoch nicht übertragbar.

Aus diesem Grund ist eine Fortführung der Versuche zunächst mit anderen Versuchstieren wie z.B. Kaninchen oder Schweinen anzustreben. Das Erzielen vergleichbarer Ergebnisse in mehreren Tiermodellen würde eher einen Rückschluss auf eine Übertragbarkeit zur Pathophysiologie des humanen Myokardinfarkts zulassen als die isolierte Betrachtung im Mausmodell.

### **4.1.2 Heterozygote CD147 Mäuse**

Die Versuchsreihe der verminderten Expression von CD147 weist lediglich heterozygote und nicht homozygote, also CD147-defiziente Tiere auf. Dies liegt an der oben beschriebenen problematischen Anzucht der Tiere und den neurologischen Auffälligkeiten, die die Mäuse zeigen.<sup>102,60,123</sup>

Dies bedeutet für die durchgeführten Untersuchungen, dass nur schwer eine quantitative Aussage über das Ausmaß der CD147-Expression in CD147<sup>+/-</sup> Mäusen getroffen werden kann. Es existieren zahlreiche Beispiele, in denen bei Heterozygotie eines Gens ein Allel das nicht funktionstüchtige andere Allel teilkompensieren oder vollständig kompensieren kann.

## Diskussion

Der durchgeführte Westernblot von Milzen von CD147<sup>+/+</sup> und CD147<sup>+/-</sup> Mäusen zeigt einen Unterschied in der Expression von CD147. Das Versuchsmodell zeigt damit, dass die Heterozygotie mit einem deutlichen, wenn auch nicht exakt bestimmten, Unterschied an CD147 einhergeht.

Es ist jedoch nicht bekannt, ob das Ausmaß der verminderten Expression bei allen untersuchten Mäusen gleich groß ist. Da jedoch alle Mäuse aus demselben Stamm rekrutiert werden, darf angenommen werden, dass keine zu große genetische Variabilität vorhanden ist, die beispielsweise in einer Überkompensation eines Allels oder in einer Minderfunktion (multiple Allelie) resultieren könnte. Demzufolge wäre die verminderte Expression von CD147 bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen jeweils vergleichbar stark ausgeprägt. Dies legitimiert somit einen Rückschluss der Auswirkungen einer verminderten Expression von CD147 auf die Mechanismen der Ischämie/Reperfusion, wenn auch eine exakte Bestimmung des Ausmaßes der Expressionsminderung wünschenswert wäre.

Sicherheit bezüglich des Ausmaßes der verminderten Expression von CD147 kann nur durch homozygote Defizienz von CD147 erreicht werden.

Die Anzucht von CD147<sup>-/-</sup> Tieren ist aufgrund der hohen intrauterinen und perinatalen Sterblichkeit nicht praktikabel. Die beschriebenen Defizite der überlebenden Tiere lässt ein Überleben der für die Versuche nötigen Eingriffe unwahrscheinlich erscheinen.<sup>60</sup>

Somit ist die Entscheidung, CD147<sup>+/-</sup> Mäuse zu untersuchen sinnvoll, da CD147<sup>-/-</sup> Mäuse nur unter Vorbehalt mit Wildtypmäusen vergleichbar sind.

### **4.1.3 Ligatur der LAD als Ischämie/Reperfusionsmodell**

Die Simulation eines akuten Myokardinfarkts im Tierexperiment gestaltet sich schwierig. Einem akuten Myokardinfarkt geht eine meist jahrelange Grunderkrankung voraus. Der akute Myokardinfarkt selbst ist zeitlich nicht exakt vorhersehbar. In einer Studie, die einen „natürlich“ entstehenden akuten

## Diskussion

Myokardinfarkt im Tiermodell untersucht, müssten die Versuchstiere zum Beispiel unter Bewegungsmangel und Übergewicht leiden. Diese Tiere müssten unter ständigem (EKG-)Monitoring stehen, so dass der Zeitpunkt des akuten Myokardinfarkts terminierbar ist. Eine anti-CD147-Injektion vor dem Infarkt wie in der vorliegenden Studie wäre nicht gezielt durchführbar.

Ebenso wäre der Aufwand immens. Eine Standardisierung der Tiere, was Größe oder Lokalisation des Infarkts angeht, wäre nicht möglich. Die Lokalisation und Größe des Infarkts sind jedoch ausschlaggebend für die spätere Klinik und damit für die Prognose.

Daher scheint eine Näherung wie durch eine Koronargefäßligatur sinnvoll. Die dafür nötige Operation bedeutet zwar für die Tiere zusätzlichen Stress, garantiert aber bei erfahrenem Operateur eine hohe Vergleichbarkeit. Die LAD ist verhältnismäßig gut auffindbar und lässt sich gut ligieren. Somit befindet sich die „area at risk“ zuverlässig im linken Ventrikel. Die Betrachtung der Infarktgrößen verschiedener Studien zeigt jedoch eine große Streubreite. Dies erklärt sich einerseits durch anatomische Normvarianten der LAD der Maus, die ähnlich ausgeprägt sind wie beim menschlichen Herz. Andererseits können minimale Abweichungen beim Setzen der Ligatur, die von der Erfahrung des Operateurs oder dem Grad der Standardisierung des Eingriffs abhängen können, in großen Schwankungen der Infarktgröße in Verhältnis zum linken Ventrikel resultieren.<sup>29,46,119</sup> Dementsprechend können entsprechend der Infarktgröße Subgruppen gebildet werden.<sup>119</sup>

Eine weitere Möglichkeit bietet die in dieser Studie vorgenommene Betrachtung der „area at risk“. Bei diesem Verfahren wird während einer erneuten Ligatur das perfundierte Myokard mit Evans Blue angefärbt, so dass sich ein Negativ des durch das ligierte Gefäß perfundierten Gewebes ergibt. Setzt man die Infarktgröße in Relation zu dieser „area at risk“, eliminiert man bei der Auswertung der Versuchstiere eventuelle Abweichungen durch unterschiedlich große Infarkte bei variierenden Stromgebieten und unpräziser Ligatur.

Neben der guten operativen Standardisierung ist damit auch der Zeitpunkt der

## Diskussion

Ligatur immer klar definiert, so dass die Angaben 24 Stunden oder sieben Tage nach I/R zuverlässig sind.

Wie oben beschrieben existieren bei grundlegender Vergleichbarkeit der Koronargefäße zwischen Maus und Mensch jedoch Unterschiede betreffend der Septumversorgung. Daraus resultiert, dass die Ligatur der LAD im Gegensatz zu einem akuten Myokardinfarkt der menschlichen LAD das Septum meist nicht betrifft.<sup>79</sup> Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollten demzufolge nicht explizit als „LAD Infarkte“ betrachtet werden, da die Vergleichbarkeit bis zu diesem Punkt zwischen Mensch und Maus nicht gegeben ist.

Desweiteren darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei den durchgeführten Versuchen eben um Ischämie/Reperfusion eines Koronargefäßes handelt und nicht um einen akuten Myokardinfarkt. Die Tiere sind zudem vor der Operation gesund und nicht über einen langen Zeitraum systemerkrankt wie ein Patient mit einem akuten Myokardinfarkt.

Eine weitere Methode der I/R ist die Ischämie durch Kryotechnik. Diese weist zwar bei verringerter Mortalität ähnliche Funktionseinschränkungen auf,<sup>155</sup> dennoch ahmt die LAD Ligatur zur Ischämie/Reperfusion die Pathophysiologie eines akuten Myokardinfarkts noch eher nach als die Ischämie durch Kryotechnik.

Demzufolge ist die Ligatur der LAD das dem akuten Myokardinfarkt am nächsten kommende Modell bei gleichzeitig hoher Standardisierung. Die Bestimmung des Infarktausmaßes kann, wie durch die Versuche unserer Arbeitsgruppe geschehen, durch Sonographie und Mikroskopie erfolgen, bevor z.B. Immunhistologien angefertigt werden.<sup>131</sup>

Damit kommt das Modell der Ischämie/Reperfusion mittels LAD Ligatur bei der Maus der Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts beim Menschen am nächsten durch die relativ hohe Vergleichbarkeit der Anatomie und Physiologie. Gleichzeitig führt die gute Standardisierbarkeit zu möglichst hoher Verlässlichkeit der Ergebnisse. Letztendlich bestehen beim Mausmodell zudem Vorteile aufgrund der ausführlichen Charakterisierung des Mausgenoms und

## Diskussion

dessen verhältnismäßig einfacher Manipulation, so dass bei größtmöglicher Nähe zum klinischen Setting des akuten Myokardinfarkts eine gute Durchführbarkeit gegeben ist.

### **4.2 Auswirkung einer verminderten Expression von CD147 oder CD147-Inhibition und einer CyPA-Defizienz nach Ischämie/Reperfusion**

#### **4.2.1 Auswirkungen auf die Infarktgrößen**

Es wurde bereits anhand von Mausmodellen gezeigt, dass die Expression von CyPA und CD147 im Myokard von Mäusen nach I/R verstärkt ist.<sup>131</sup>

Die Versuche der vorliegenden Studie zeigen zusammen mit den gezeigten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, dass das Fehlen von CyPA in CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen oder das geminderte Expressionslevel von CD147 in CD147<sup>+/-</sup> Mäusen sich protektiv auf myokardiale Schädigung nach I/R im Sinne einer reduzierten Infarktgröße auswirkt. Dieser Effekt zeigt sich bei einer verminderten Expression von CD147 jedoch erst signifikant nach sieben Tagen, während nach 24h eine tendenziell verringerte Infarktgröße messbar ist.

Die pharmakologische Inhibition der chemotaktischen Funktion von CD147 mit mAb anti-CD147 resultiert ebenso in einer geringeren Infarktgröße.

Auffällig ist, dass sich ein Effekt auf die Infarktgröße bei verminderter Expression von CD147 erst nach sieben Tagen zeigt, während sich diese Effekte bei CyPA-Defizienz und der pharmakologischen Inhibition von CD147 bereits nach 24h zeigen.

Dies kann in der noch vorhandenen Aktivität von CD147 bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen begründet sein. Die Beobachtung, dass die pharmakologische Inhibition von CD147 schon nach 24h in einer verminderten Infarktgröße resultiert, legt die Vermutung nahe, dass die pharmakologische Inhibition von CD147 in der applizierten Dosis CD147 in größerem Maße inaktiviert als durch die CD147 Heterozygotie vermindert exprimiert wird.

## 4.2.2 Auswirkung auf inflammatorische Prozesse

### 4.2.2.1 Versuchsreihen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion

Bei der Auswertung der Zelldichte der inflammatorischen Infiltrate zeigt sich eine signifikante Minderung der Zelldichte der inflammatorischen Infiltrate 24h nach I/R bei CD147<sup>+/-</sup> gegenüber CD147<sup>+/+</sup>, bei CyPA<sup>-/-</sup> gegenüber CyPA<sup>+/+</sup> und bei anti-CD147-behandelten gegenüber mit dem Isotyp Antikörper behandelten Mäusen.

Gleichermaßen zeigt sich in diesen Versuchsreihen eine signifikant reduzierte Zelldichte an Makrophagen/Monozyten sowie an neutrophilen Granulozyten in den inflammatorischen Infiltraten. Zudem lässt sich eine signifikante Verminderung MMP9 und CyPA-positiver Zellen bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe feststellen.

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass der oxidative Stress, gemessen bei der Expression von 3-Nitrotyrosin Rückständen, bei mit mAb anti-CD147-behandelten Mäusen geringer ist als bei der IgG Kontrolle.<sup>131</sup>

Die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Zymographien von Myokardproben von mit mAb anti-CD147- und Isotyp IgG-behandelten Wildtypmäusen zeigen 24 Stunden nach I/R keinen signifikanten Unterschied in der MMP Aktivität.<sup>131</sup> Dies unterstreicht die bisher beschriebene, die Chemotaxis inhibierende Wirkung des mAb anti-CD147.<sup>25</sup> Die verminderte Rekrutierung von Makrophagen/Monozyten und neutrophilen Granulozyten kann daher unter Umständen Ausdruck des reduzierten oxidativen Stresses sein, der bei der Messung der 3-Nitrotyrosin Expression beobachtet wurde.

Diese Studien sowie die vorliegende Arbeit können zwar die Rolle leukozytärer Rekrutierung oder leukozytärer Subtypen im Rahmen der I/R nicht vollends aufklären, dennoch gilt es als etabliert, dass CD147 Bindung durch seinen extrazellulären Liganden CyPA leukozytäre Chemotaxis aktiviert.<sup>20</sup>

In vitro Experimente unserer Arbeitsgruppe unterstützen dieses Konzept. Es konnte gezeigt werden, dass die Chemotaxis von Monozyten gegenüber

## Diskussion

Homogenat CyPA<sup>-/-</sup> Herzen im Vergleich zu dem Homogenat von CyPA<sup>+/+</sup> Herzen eingeschränkt ist. Gleichzeitig reduziert die Gegenwart von mAb anti-CD147 die Chemotaxis der Monozyten bei CyPA<sup>+/+</sup> Homogenat, während sie keinen Effekt auf CyPA<sup>-/-</sup> Homogenat hat. Die Gabe von rekombinantem CyPA hingegen wirkt die Chemotaxis anregend. Die Versuche zeigen weiterhin, dass CyPA die Akt-Phosphorylierung in Monozyten induziert. Dahingegen inhibiert Ly294002 die CyPA induzierte Chemotaxis. Neben der Auswirkung auf Chemotaxis induziert CyPA monozytäres Rolling und Adhäsion von Endothelzellen (HUVEC) unter arteriellen Flussbedingungen CD147 abhängig.<sup>131</sup>

Diese Daten werden durch die Arbeit von Berk und Mitarbeitern unterstützt, die CyPA<sup>-/-</sup> Mäuse für zwei kardiovaskuläre Modelle benutzten: Das Fehlen von CyPA resultierte in einer verminderten Angiotensin II induzierten Aneurysmaformation<sup>122</sup> und in einer reduzierten Atherosklerose bei ApoE/CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen.<sup>106</sup> In beiden Modellen war der klinische Benefit mit einer reduzierten leukozytären Rekrutierung assoziiert. Allerdings unterscheiden diese beiden Studien weder zwischen intra- und extrazellulären Effekten von CyPA noch untersuchen sie die Rolle von CD147.

### **4.2.2.2 Versuchsreihen 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion**

Die durchgeführten Versuche zeigen eine signifikante Verminderung der Zelldichte der Infarktarnen für CD147<sup>+/-</sup>, CyPA<sup>-/-</sup> und anti-CD147-behandelte Mäuse gegenüber den Kontrollgruppen.

Bei der detaillierten Betrachtung fällt auf, dass die Rekrutierung der Makrophagen/Monozyten bei CD147<sup>+/-</sup>, CyPA<sup>-/-</sup> und anti-CD147-behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant eingeschränkt ist.

Die Dichte an CyPA- und MMP9-positiven Zellen hingegen ist bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen 7d nach I/R ebenso wie 24h nach I/R signifikant gegenüber CD147<sup>+/+</sup> Mäusen verringert.

## Diskussion

Unter der Annahme, dass CD147 für die Induktion der Transkription von MMP9<sup>144,110,163</sup> und die Signalkaskaden von CyPA<sup>166,116,167</sup> essentiell ist, weist dies darauf hin, dass die im Westernblot beobachtete reduzierte Expression von CD147 ausreichend ist, um einen deutlichen Effekt auf die Regulationsmechanismen inflammatorischer Prozesse im Rahmen des Remodelling zu nehmen.

### 4.2.3 Limitation der Studie

Die durchgeführte Studie betrachtet den Effekt einer CyPA-Defizienz und einer verminderten Expression von CD147 sowie die pharmakologische Inhibition von CD147 in Wildtypmäusen.

Ergänzende Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe zeigen keine signifikante Reduzierung der Infarktgrößen bei anti-CD147-behandelten CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber der mit dem Isotyp Antikörper behandelten Kontrollgruppe.<sup>131</sup> Dies beweist die Annahme, dass CD147 und CyPA einen gemeinsamen Stoffwechselweg haben.

Die pharmakologische Inhibition von CD147 lässt sich variieren. In den durchgeführten Versuchen wurde anti-CD147 präoperativ appliziert, so dass dies dem klinischen „Setting“ der Infarkttherapie nahekommt.

Nachdem durch Klinik, EKG und Labor die Diagnose eines akuten Myokardinfarkts gestellt wird, steht zunächst die möglichst zeitnahe Reperfusion des Infarktgefäßes möglichst mittels primärer Ballondilatation und Stentimplantation im Vordergrund. Alle Patienten sollten so zeitnah wie möglich mit Acetylsalicylsäure, einem Thienopyridinderivat (Clopidogrel, Prasugrel), sowie einer Antikoagulation (unfraktioniertes Heparin, Bivalirudin – im Falle einer Fibrinolyse fibrinspezifisch mit Heparin oder Enoxaparin) therapiert werden. Neben der Gabe von analgetischen Substanzen und nasalem Sauerstoff bei gesenkter Sauerstoffsättigung erfolgt die Applikation von ACE-Hemmern bei deutlicher LV-Dysfunktion und Statinen bald möglichst.<sup>57</sup>

## Diskussion

Diese forcierte medikamentöse Therapie, die in der Praxis in der frühen Hospitalisierungsphase beginnt, ließe sich leicht um die Gabe von anti-CD147 erweitern. Somit bestünde, weiterführende Studien vorausgesetzt, eine gute ins klinische Setting passende Ergänzungsmöglichkeit der Therapie des akuten Myokardinfarkts durch präoperative anti-CD147 Applikation.

Ebenso ist eine „postoperative Gabe“, also eine Applikation von anti-CD147, nach erfolgreicher Reperfusion mittels Koronarintervention zu erwägen. Weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass sich bei anti-CD147 Gabe nach I/R ebenfalls eine vergleichbar reduzierte Infarktgröße zeigt.<sup>131</sup>

Die durchgeführten Versuche zeigen jeweils einen kardioprotektiven Effekt in Bezug auf die Infarktgröße sowie den Zellreichtum der inflammatorischen Infiltrate und der Infarktfolgen der Versuchsgruppen gegenüber den Kontrollgruppen.

Die Studie betrachtet diese Effekte über sieben Tage. Ein längerer Beobachtungszeitraum steht noch aus. Eine längerfristige Betrachtung würde ausschließen, dass die beobachteten kardioprotektiven Effekte sich über einen längeren Beobachtungszeitraum angleichen. Eine Versuchsreihe unserer Arbeitsgruppe zeigt in Bezug auf die „therapeutische“ Inhibition von CD147 mittels anti-CD147 28 Tage nach I/R eine signifikante Reduzierung der Infarktgröße.<sup>131</sup> Dies lässt die Vermutung zu, dass auch in den Versuchsreihen der vorliegenden Studie die Reduzierung der Infarktgröße dauerhaft ist, muss aber dennoch einzeln untersucht werden.

Allerdings ist die Infarktgröße kein klinisch gebräuchliches Maß, um die Funktion des Ventrikels nach einem akuten Myokardinfarkt zu beurteilen. Ebenso lässt sich von immunhistologischen Präparaten kein Rückschluss auf die Funktionsfähigkeit des linken Ventrikels ziehen. Der klinisch bedeutsamste prognostische Faktor zur Abschätzung der Funktionsfähigkeit des linken Ventrikels nach akutem Myokardinfarkt ist das mittels Echokardiographie bestimmte „fractional shortening“ des linken Ventrikels. Das „fractional

## Diskussion

shortening“ (Verkürzungsfraction) ist ein Maß für die Kontraktilität und damit die systolische Funktion des linken Ventrikels.

Versuchsreihen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die histologischen Beobachtungen und die beschriebene Reduzierung der Infarktgröße auch mit einem signifikant erhöhtem „fractional shortening“ einhergehen.<sup>131</sup>

Die Versuche der vorliegenden Arbeit sind „in vivo“-Experimente. Die für diese Studie verwendeten Erkenntnisse wurden jedoch zu einem Großteil aus in vitro Experimenten gewonnen. Ein Beweis für die bereits beschriebene CD147-CyPA-Interaktion existiert in vivo bisher nicht.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Studie zeigen, wie oben beschrieben, eine vergleichbare Reduzierung der Infarktgröße und der leukozytären Rekrutierung bei verminderter Expression von CD147 und CyPA-Defizienz sowie der pharmakologischen Inhibition von CD147. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen in gleichen Versuchsmodellen zudem eine vergleichbar verbesserte linksventrikuläre Funktion der Versuchsgruppe.<sup>131</sup> Diese Effekte verstärken sich jedoch nicht bei pharmakologischer CD147-Inhibition bei CyPA-defizienten Mäusen. Dies beweist die durch in vitro Experimente begründete Annahme, dass CD147 und CyPA einem gemeinsamen Stoffwechselweg folgen.

Diese Beobachtungen lassen eine zukünftige therapeutische Strategie bei Menschen (im Rahmen einer Koronarintervention) möglich erscheinen. Selbstverständlich ist die experimentelle Grundlage für derartige Versuche zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht gegeben.

### **4.3 CD147 und CyPA bei kardiovaskulären inflammatorischen Prozessen**

Die bereits ausführlich beschriebene CD147-CyPA-Interaktion spielt eine wichtige Rolle bei der leukozytären Rekrutierung. Die vorliegende Studie betrachtet dieses Geschehen jedoch nur im Rahmen von Ischämie/Reperfusion, um einen akuten Myokardinfarkt zu simulieren. Die inflammatorische Kardiomyopathie (ICD10 I42.0) und die virale Myokarditis

## Diskussion

(ICD10 I51.4) sind weitere Erkrankungen, in deren Pathophysiologie Inflammation eine wichtige Rolle spielt. Dementsprechend kann sowohl die inflammatorische Kardiomyopathie als auch die virale Myokarditis durch immunhistologische Färbungen von Myokardbiopsien diagnostisch gesichert werden.<sup>55</sup>

Es ist bekannt, dass CD147 und CyPA in der inflammatorischen Kardiomyopathie hochreguliert sind.<sup>129</sup> Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen anhand von immunhistochemischer Färbungen humaner Endomyokardbiopsien, dass CD147 sowohl bei inflammatorischer als auch nicht inflammatorischer Kardiomyopathie erhöht ist. CD147 scheint somit ein möglicher Marker für myocardiales Remodelling zu sein.<sup>129</sup> CyPA zeigte sich hingegen nur bei der inflammatorischen Kardiomyopathie erhöht und scheint damit als spezifischer Marker für kardiale Inflammation dienen zu können.<sup>129</sup>

Die Diagnostik der inflammatorischen Kardiomyopathie gestaltet sich in der Praxis schwierig. Die Anwesenheit von T-Zellen und Makrophagen gilt zusammen mit erhöhter Expression von HLA II Molekülen als etabliertes Kriterium für kardiale Inflammation. Weitere Studien müssen zeigen, ob CyPA als Marker für kardiale Inflammation sensitiver als die bisher gebräuchlichen diagnostischen Parameter ist und ob die Inhibition der CD147-CyPA-Achse den Verlauf dieser Krankheit beeinflussen kann.<sup>129</sup>

Ebenso zeigen Versuche unserer Arbeitsgruppe zur viralen Myokarditis, dass ein ähnliches Eingreifen wie in der vorliegenden Studie in die inflammatorischen Regulationsmechanismen im Rahmen des CD147-CyPA-Stoffwechselweges bei der viralen Myokarditis die leukozytäre Rekrutierung bedeutend reduziert.<sup>130</sup> Eine Fortführung dieser Untersuchungen kann unter Umständen die Erkenntnis bringen, dass eine gezielte Störung der inflammatorischen Prozesse mit einer geringeren myokardialen Schädigung einhergeht.

## Diskussion

### 4.4 Interaktion mit weiteren Cyclophilinen

Es existieren einige etablierte Inhibitoren von CyPA, wie Cyclosporin A (CsA) oder sein Analogon NIM811. Zusätzlich zu der Blockade extracellulärer CyPA-Interaktionen mit CD147 können diese Arzneimittel verschiedene intrazelluläre Aktivitäten von CyPA behindern, wie die Inhibition der Calcium-aktivierten Protein Phosphatase Calcineurin, der Proteinfaltung (PPlase Aktivität) und der Inhibition intrazellulärer CyPD-gesteuerter Prozesse einschließlich der „mitochondrial permeability transition pore“ (MPTP).<sup>3,4</sup>

Diese CyPD-gesteuerte Inhibition der MPTP bietet einen wirkungsvollen Schutz gegen Ischämie.<sup>56</sup> Die Behandlung mit CsA oder mit NIM811 zeigt einen effektiven Schutz vor myokardialen Schäden in Mausmodellen der I/R.<sup>3,4</sup> Ebenso vermindert CsA die Infarktgröße bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt.<sup>114</sup> Es wird angenommen, dass die CyPD-vermittelte Inhibition von MPTP hauptsächlich protektive Auswirkungen verursacht.

Die MPTP scheint eine gewichtige Rolle in der Regulation des nekrotischen Zelltodes zu haben. Bei ihrer Öffnung kommt es zu einem irreversiblen Verlust des Membranpotentials der inneren mitochondrialen Membran durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausfluß. CyPD ist eine Matrix Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase, die die Öffnung der MPTP desensibilisiert und damit die Prolongation der Nekrose verhindern kann. Dementsprechend zeigen CyPD<sup>-/-</sup> Mäuse gegenüber der Wildtypkontrolle erhöhte kardiale Hypertrophie und kardiale Fibrose sowie eine geminderte myokardiale Funktion als Reaktion auf hohe Blutdruckbelastung.

Die Versuchstiere zeigen im Stoffwechsel einen Substratwechsel hin zu einer gesteigerten Oxidation von Glucose, während die Oxidation von Fettsäure reduziert ist. Daraus resultiert myokardiale Fibrose und die Unfähigkeit, hohe Belastungen zu tolerieren.<sup>31</sup>

Das Augenmerk der vorliegenden Arbeit ist, die Rolle des extrazellulären Rezeptors von CyPA, CD147 (EMMPRIN, Basigin), unter Vermeidung potentieller intrazellulärer Kreuzreaktionen – spezifisch CyPD-vermittelter mitochondrialer Effekte – aufzuklären. Aus diesem Grund kommt eine

## Diskussion

pharmakologische Inhibition von CyPA mit CsA nicht infrage. Durch die bekannte Wirkung auf CyPA ist nicht aufzuklären, welcher der beiden Isomerasen die detektierten Effekte zuzuschreiben sind. Es gibt keine bisher bekannte direkte Interaktion zwischen CyPA und CyPD, z.B. keine bekannten Effekte von CyPA auf die MPTP. Deshalb entschieden wir, zusätzlich zu der Betrachtung von CD147<sup>+/-</sup> und CyPA<sup>-/-</sup> Mäusen, den extrazellulären Gegenspieler von CyPA pharmakologisch zu beeinträchtigen.

Die Experimente mit CyPA<sup>-/-</sup> zeigen deutlich die Relevanz des ganzen CyPA-Systems und sollten das CyPD-abhängige MPTP nicht direkt beeinflussen. Die Daten aus den Experimenten mit mAb anti-CD147 und CD147<sup>+/-</sup> Mäusen liefern den eindeutigen Beweis, dass der CD147 vermittelte Stoffwechselweg für die Schädigung des Myokard nach I/R von Relevanz ist.

## Zusammenfassung

### 5 Zusammenfassung

Die vorliegenden Versuchsdaten zeigen, dass CD147 und sein Ligand Cyclophilin A (CyPA) bedeutend in die Prozesse der myokardialen Schädigung nach Ischämie und Reperfusion (I/R) involviert sind. Eine verminderte Expression von CD147 geht ebenso wie seine pharmakologische Inhibition oder die Defizienz seines Liganden CyPA mit einer signifikanten Reduzierung der Infiltration von Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in das betroffene Myokardareal 24h nach I/R einher. Ebenso zeigen anti-CD147-behandelte und CyPA<sup>-/-</sup> Mäuse 24h nach I/R eine signifikant geringere Infarktgröße gegenüber den Kontrollgruppen, während diese auch bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen tendenziell (nicht signifikant) verringert ist.

Eine Woche nach I/R zeigen CyPA<sup>-/-</sup>, CD147<sup>+/-</sup> sowie anti-CD147-behandelte Mäuse eine signifikant verringerte Zelldichte infiltrierender Monozyten/Makrophagen in der Infarkt Narbe gegenüber den Kontrollgruppen. Zudem wird bei allen drei Modellen 7d nach I/R eine signifikante Reduzierung der Zelldichte in den Infarkt Narben und der Infarktgröße gegenüber den Kontrollgruppen beobachtet.

Bei CD147<sup>+/-</sup> Mäusen ist die Zelldichte CyPA- und Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9)-positiver Zellen sowohl im inflammatorischen Infiltrat 24h nach I/R als auch in der Infarkt Narbe 7d nach I/R erniedrigt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Assoziation zwischen der Hemmung von Inflammation nach I/R mit protektiver Wirkung auf Narbenbildung und myokardiales Remodelling.

Die gezielte Inhibition der Inflammation nach dem akuten Myokardinfarkt durch Beeinflussung der CD147-CyPA-Achse könnte folglich eine zukünftige therapeutische Option darstellen.

Die vorliegende Arbeit betrachtet CD147 und CyPA in einem „klinischen Setting“ sowohl in Form der Simulation eines akuten Myokardinfarkts durch Ischämie, als auch in Form der „Therapie“ durch mechanische Reperfusion plus pharmakologische Therapie mit anti-CD147. Diese Studie liefert einen starken

## Zusammenfassung

Hinweis auf die Bedeutung von CD147 und seinem Liganden CyPA für die Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts. Das therapeutische Potential muss allerdings in zukünftigen Studien überprüft werden.

## Abbildungsverzeichnis

### 6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Kardiomyozyten nach globaler Ischämie und Reperfusion (modifiziert nach Nayler).....	11
Abb. 2:	Aufbau des Rezeptors CD147 (Borst, modifiziert nach Nabeshima).....	16
Abb. 3:	Evans-Blue Färbung.....	35
Abb. 4:	Quantitative Auswertung der Infarktgrößen von CyPA <sup>-/-</sup> Mäusen nach Ischämie/Reperfusion.....	41
Abb. 5:	HE-Färbungen von CyPA <sup>-/-</sup> Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion.....	43
Abb. 6:	Infiltration von Makrophagen bei CyPA <sup>-/-</sup> Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion.....	45
Abb. 7:	Infiltration neutrophiler Granulozyten bei CyPA <sup>-/-</sup> Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion.....	47
Abb. 8:	HE-Färbungen von CyPA <sup>-/-</sup> Mäusen 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion.....	50
Abb. 9:	Quantitative Auswertung der Infarktgrößen von CD147 <sup>+/-</sup> Mäusen nach Ischämie/Reperfusion.....	51
Abb. 10:	CD147 Expression von CD147 <sup>+/-</sup> Mäusen.....	52
Abb. 11:	HE-Färbungen von CD147 <sup>+/-</sup> Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion.....	53
Abb. 12:	Infiltration von Makrophagen bei CD147 <sup>+/-</sup> Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion.....	56
Abb. 13:	Infiltration neutrophiler Granulozyten bei CD147 <sup>+/-</sup> Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion.....	58
Abb. 14:	Infiltration MMP9-positiver Zellen bei CD147 <sup>+/-</sup> Mäusen 24 Stunden nach I/R.....	60
Abb. 15:	Infiltration CyPA-positiver Zellen bei CD147 <sup>+/-</sup> Mäusen 24 Stunden nach I/R.....	62
Abb. 16:	HE-Färbungen von CD147 <sup>+/+</sup> Mäusen 7 Tage nach	

## Abbildungsverzeichnis

	Ischämie/Reperfusion.....	64
Abb. 17:	Infiltration von Makrophagen bei CD147+/- Mäusen 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion.....	65
Abb. 18:	Infiltration MMP9-positiver Zellen bei CD147+/- Mäusen 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion.....	68
Abb. 19:	Infiltration CyPA-positiver Zellen bei CD147+/- Mäuse 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion.....	69
Abb. 20:	Quantitative Auswertung der Infarktgrößen anti-CD147-behandelter Mäuse nach Ischämie/Reperfusion.....	71
Abb. 21:	HE-Färbungen von anti-CD147-behandelten Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion.....	73
Abb. 22:	Infiltration von Makrophagen bei anti-CD147-behandelten Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion.....	75
Abb. 23:	Infiltration von neutrophilen Granulozyten bei anti-CD147-behandelten Mäusen 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion	77
Abb. 24:	HE-Färbungen von anti-CD147-behandelten Mäusen 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion.....	79

## Abkürzungsverzeichnis

### 7 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
Bsg	Basigin
°C	Grad Celsius
CsA	Cyclosporin A
CyPA	Cyclophilin A
CyPB	Cyclophilin B
CyPD	Cyclophilin D
EMMPRIN	Extrazellulärer Matrix- Metalloproteinase Rezeptor Induktor
g	Gramm
h	Stunden
HLA	Human Leucocyte Antigen
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
I	Infarktareal
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
i.l.	Inflammatorisches Infiltrat
IL	Interleukin
I/R	Ischämie und Reperfusion
Iso	Isotyp
jew.	Jeweils
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LAD	Left anterior descending
LPS	Lipopolysaccharid
LV	Linker Ventrikel
min	Minuten
m	Milli
M	Molar
mAb	Monoklonaler Antikörper

## Abkürzungsverzeichnis

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP	Monocyte chemotactic protein
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MMP	Matrix Metalloproteinase
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore
MT-MMP	Membranständige MMPs (membrane type-MMPs)
n.Gr.	Neutrophiler Granulozyt
OxLDL	Oxidiertes LDL
PCI	Perkutane Coronare Intervention
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PMN	Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
PPIase	Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
Rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SOD	Superoxid Dismutase
TCSF	Tumor Cell-derived Collagenase Stimulating Factor
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF	Tumornekrosefaktor
V	Volt

## 8 Literaturverzeichnis

1. 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. 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 26:26.
2. Altruda F, Cervella P, Gaeta ML, Daniele A, Giancotti F, Tarone G, Stefanuto G, Silengo L. Cloning of c-DNA for a novel mouse membrane glycoprotein (gp43): shared identity to histocompatibility antigens, immunoglobulins and neural cell adhesion molecules. 1989. Gene 85(2):445-451.
3. Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabresse L, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. 2005. J. Mol. Cell. Cardiol. 38(2):367-74.
4. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisy O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. 2005. Circulation 111(2):194-7.
5. Arora K, Gwinn WM, Bower MA, Watson A, Okwumabua I, MacDonald HR, Bukrinsky MI and Constant SL. Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. 2005. J. Immunol. 175:517-522
6. Baenkler H-W, Goldschmidt H, Hahn J-M, Hinterseer M, Knez A, Lafrenz M, Möhling M, Pfeiffer AFH, Schmidt HH-J, Schmidt M, Spranger J, Witzens-Harig M, Zidek W. 2007. Kurzlehrbuch Innere Medizin. Georg Thieme Verlag 33-40.
7. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. 2002. J. Cell. Sci. 115:3719-3727.
8. Barth E, Stämmler G, Speiser B, Schaper J. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. 1992. J. Mol. Cell. Cardiol. 24(7): 69-681.
9. 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. 1997. J. Biol. Chem. 272:29174-29180.
10. Betsuyaku T, Kadomatsu K, Griffin GL, Muramatsu T, Senior RM. Increased basigin in bleomycin-induced lung injury. 2003. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 28(5):600-606.

## Literaturverzeichnis

11. Billich A, Winkler G, Aschauer H, Rot A, Peichl P. Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. 1997. *J. Exp. Med.* 185:975-980.
12. Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. 1995. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7:728-735.
13. Biswas C, Nnugent MA. Membrane association of collagenase stimulatory factor(s) from B-16 melanoma cells. 1987. *J. Cell. Biochem.* 35(3):247-258.
14. 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. 1995. *Cancer. Res.* 55:434-439.
15. Biswas C. Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts. 1982. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109(3): 1026-1034.
16. Borst O. Neue molekulare Mechanismen zellulärer Interaktionen an der Gefäßwand und ihre Bedeutung für die Pathogenese der Atherosklerose. 2009. Modifiziert nach Nabeshima 2006. <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:21-opus-46234>.
17. Bougateg F, Quemener C, Kellouche S, Naimi B, Podgorniak MP, Millot G, Gabison EE, Calvo F, Dosquet C, Lebbe C, Menashi S, Mourah S. EMMPRIN promotes angiogenesis through hypoxia-inducible factor-2{alpha}- mediated regulation of soluble VEGF isoforms and their receptor VEGFR-2. 2009. *Blood* 114:5547-5556.
18. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. 2000. *Biochim. Biophys. Acta.* 1477:267-283.
19. Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Loushin C, Isner JM. Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions: association of active enzyme synthesis with unstable angina. 1995. *Circ.* 91:2125-2131.
20. Bukrinsky MI. Cyclophilins: unexpected messengers in intercellular communications. 2002. *Trends Immunol.* 23(7):323-5.
21. Cannon CP, Gibson CM, Lambrew CT, Shoultz DA, Levy D, French WJ, Gore JM, Weaver WD, Rogers WJ and Tiefenbrunn AJ. Relationship of symptom-onset-to-balloon time and door-to-balloon time with mortality in patients undergoing angioplasty for acute myocardial infarction. 2000. *JAMA* 283:2941-2947.
22. Cao J, Drews M, Lee HM, Conner C, Bahou WF, Zucker S. The

## Literaturverzeichnis

- propeptide domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase is required for binding of tissue inhibitor of metalloproteinases and for activation of pro-gelatinase A. 1998. *J. Biol. Chem.* 273(52): 34745-34752.
23. Colgan J, Asmal M, Neagu M, Yu B, Schneidkraut J, Lee Y, Sokolkaja E, Andreotti A, Luban J. CypA regulates TCR signal strength in CD4+ T-cells via a proline-directed conformational switch in Itk. 2004. *Immunity* 21:189-201.
  24. Colgan J, Asmal M, Yu B, Luban J. Cyclophilin A-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine. 2005. *J. Immunol.* 174:6030-6038.
  25. Damsker JM, Okwumabua I, Pushkarsky T, Arora K, Bukrinsky MI, Constant SL. Targeting the chemotactic function of CD147 reduces collagen-induced arthritis. 2009. *Immunology.* 126(1):55-62.
  26. Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, Tincey S, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. 2004. *Am. J. Pathol.* 164:665-677.
  27. Dollery CM, Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. 2006. *Cardiovasc. Res.* 69:625-635.
  28. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. 1995. *Circ. Res.* 77:863-868.
  29. Du XJ, Gao XM, Jennings G, Dart AM, Woodcock EA. Preserved ventricular contractility in infarcted mouse heart overexpressing beta(2)-adrenergic receptors. 2000. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279(5): H2456-H2463.
  30. Ducharme A Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P, Lee RT. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. 2000. *J. Clin. Invest.* 106(1):55-62.
  31. Elrod JW, Wong R, Mishra S, Vagnozzi RJ, Sakthivel B, Goonasekera SA, Karch J, Gabel S, Farber J, Force T, Brown JH, Murphy E, Molkentin JD. Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca<sup>2+</sup> exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. 2010. *J. Clin. Invest.* 120(10):3680–3687.
  32. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Guarnieri C, Caldarera CM, Albertinia, Visioli O. Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defences against oxygen toxicity. 1985. *J.*

## Literaturverzeichnis

- Mol. Cellular Cardiol. 17:937-945.
33. Ferrari R, Pepi P, Ferrari F, Nesta F, Benigno M, Visioli O. Metabolic derangement in ischemic heart disease and its therapeutic control. 1998. Am. J. Cardiol. 82:2K-13K.
  34. Ferrari R. Metabolic disturbances during myocardial ischemia and reperfusion. 1995. Am. J. Cardiol. 24:17B-24B.
  35. Field LJ. Transgenic mice in cardiovascular research. 1993. Annu. Rev. Physiol. 55:97-114.
  36. Fischer G, Bang H, Mech C. Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in prolinecontaining peptides. 1984. Biomed. Biochim. Acta. 43:1101-1111.
  37. Foda HD, Rolla EE, Drews M, Conner C, Appelt K, Shalinsky DR, Zucker S. Ventilator-induced lung injury upregulates and activates gelatinases and CD147: attenuation by the synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, Prinomastat. 2001. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 25(6):717-724.
  38. Fossum S, Mallett S, Barclay AN. The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence. 1991. Eur. J. Immunol. 21(3):671-679.
  39. Frangogiannis NG, Smith CW, and Entman M.L. The inflammatory response in myocardial infarction. 2002. Cardiovasc. Res. 53:31-47.
  40. Frantz S, Bauersachs J, and Ertl G. Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. 2009. Cardiovasc. Res. 81:474-481.
  41. Fruman DA, Burakoff SJ, Bierer BE. Immunophilins in protein folding and immunosuppression. 1994. FASEB J. 8:391-400.
  42. Galat A. Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. 1993. Eur. J. Biochem. 216(3):689-707.
  43. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis. The good, the bad, and the ugly. 2002. Circ. Res. 90:251-262.
  44. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E, Libby P. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. 1994. Circ. Res. 75:181-189.
  45. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable

## Literaturverzeichnis

- regions of human atherosclerotic plaques. 1994. *J. Clin. Invest.* 94: 2493-2503.
46. Gao XM, Dart AM, Dewar E, Jennings G, Du XJ. Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice. 2000. *Cardiovasc. Res.* 45(2):330-338.
47. Goldman S, Shalev E. The role of the matrix metalloproteinases in human endometrial and ovarian cycles. 2003. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 111(2):109-121.
48. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitor of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. 1997. *Eur. J. Cell. Biol.* 74:111-122.
49. Gottshall KR, Hunter JJ, Tanaka N, Dalton N, Becker KD, Ross J Jr., Chien KR. Ras-dependent pathways induce obstructive hypertrophy in echo-selected transgenic mice. 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA;* 94(9):4710-4715.
50. Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biswas C. Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. 1997. *J. Biol. Chem.* 272:24-27.
51. Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. 1984. *Science* 226:544-547.
52. Haug C, Lenz C, Diaz F, Bachem MG. Oxidized low-density lipoproteins stimulate extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) release by coronary smooth muscle cells. 2004. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24(10):1823-1829.
53. Hayashidani S, Tsutsui H, Ikeuchi M, Shiomi T, Matsusaka H, Kubota T, Imanaka-Yoshida K, Itoh T, Takeshita A. Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. 2003. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285(3):H1229-H1235.
54. Henke J, Erhardt W. Speziespezifische Anästhetika/ Nager. In: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J. (Hrsg): „Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier“. 2004. Schattauer Verlag, Stuttgart 657.
55. Herold G. Kardiologie. In: Gerd Herold und Mitarbeiter: Innere Medizin. 2011. Herold Köln 2011 140-317.
56. Heusch G, Boengler K, Schulz R. Inhibition of mitochondrial permeability

## Literaturverzeichnis

- transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection. 2010. *Basic Res. Cardiol.* 105(2):151-4.
57. [http://leitlinien.dgk.org/images/pdf/leitlinien\\_volltext/2010-14\\_st.pdf](http://leitlinien.dgk.org/images/pdf/leitlinien_volltext/2010-14_st.pdf)
58. <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Krankheitskosten/Aktuell.psml>.
59. [http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2009/09/PD09\\_\\_344\\_\\_232,templateId=renderPrint.psml](http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2009/09/PD09__344__232,templateId=renderPrint.psml).
60. Igakura T, Kadomatsu K, Kaname T, Muramatsu H, Fan QW, Miyauchi T, Toyama Y, Kuno N, Yuasas S, Takahashi M, Senda T, Taguchi O, Yamamura K, Arimura K, Muramatsu T. A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis. 1998. *Dev. Biol.* 194:152-165.
61. Igakura T, Kadomatsu K, Taguchi O, Muramatsu H, Kaname T, Miyuchi T, Yamamura K, Arimura K, Muramatsu T. Roles of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, in behavior as to an irritating odor, lymphocyte response, and blood-brain barrier. 1996. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224:33-36.
62. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. 1991. *Annu. Rev. Med.* 42:225-246.
63. Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen C, Reimer KA. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury: changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. 1985. *Circ. Res.* 49:892-900.
64. Jennings RB, Steenbergen C Jr., Kinney RB, Hill ML, Reimer KA. Crison of the effect of ischaemia and anoxia on the sarcolemma of the dog heart. 1983. *Europ. heart J.* 4:123-137.
65. Jiang J, Tang J. CD147 and its interacting proteins in cellular functions. 2007. *Acta Physiologica Sinica* 59:517-523.
66. Jin ZG, Lungu AO, Xie L, Wang M, Wong C, Berk BC. Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells. 2004. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:1186-1191.
67. Jin ZG, Melarango MG, Liao DF, Yan C, Haendeler J, Suh YA, Lambeth J D and Berk B C. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. 2000. *Circ. Res.* 87:789-796
68. Jones SP, Lefer DJ. Myocardial reperfusion injury: insights gained from gene-targeted mice. 2000. *News Physiol. Sci.* 15:303-308.

## Literaturverzeichnis

69. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musiak WJ. Oxidative stress and neutrophil activation-the two keystones of ischemia/reperfusion injury. 2002. *Int. J. Cardiol.* 26:41-59.
70. 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. 2002. *Int. J. Cancer.* 99:520-528.
71. Kasinrerker 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. 1992. *J. Immunol.* 149(3): 847- 854.
72. Kasinrerker W, Tokrasinwit N, Phunpae P. CD147 monoclonal antibodies induce homotypic cell aggregation of monocytic cell line U937 via LFA-1/ICAM-1 pathway. 1999. *Immunology* 96(2):184-92.
73. 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. 2005. *Clin. Immunol.* 116:217-224.
74. Kim SH, Lessner SM, Sakurai Y, Galis ZS. Cyclophilin A as a novel biphasic mediator of endothelial activation and dysfunction. 2004. *Am. J. Pathol.* 164:1567-1574.
75. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. 2001. *Circ.* 104:3158-3167.
76. Koch C, Staffler G, Hüttinger R, Hilgert I, Prager E, Cerny J, Steinlein P, Majdic O, Horejsi V, Stockinger H. T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density. 1999. *Int. Immunol.* 11:777-786.
77. Kofron JL, Kuzmic P, Kishore V, Colon-Bonilla E, Rich DH. Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay. 1991. *Biochemistry* 30:6127-6134.
78. Kukielka GL, Hawkins HK, Michael L, Manning AM, Youker K, Lane C, Entman ML, Smith CW, Anderson DC. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ischemic and reperfused canine myocardium. 1993. *J. Clin. Invest.* 92(3):1504-1516.
79. Kumar D, Hacker TA, Buck J, Whitesell LF, Kaji EH, Douglas PS, Kamp TJ. Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction

## Literaturverzeichnis

- consequent to ligation. 2005. *Coron. Artery Dis.* 16(1):41-44.
80. Lai WC, Zhou M, Shankavaram U, Peng G, Wahl LM. Differential regulation of lipopolysaccharide-induced monocyte matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 by p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. 2003. *J. Immunol.* 170(12):6244-6249.
  81. Lamparter S, Maisch B. Bedeutung von Matrix Metalloproteinasen bei kardiovaskulären Erkrankungen. 2000. *Z. Kardiol.* 89:949-957.
  82. Lev M, Thaemert J. The conduction system of the mouse heart. 1973. *Acta. Anat.* 342-352.
  83. Li M, Zhai Q, Bharadwaj U, Wang H, Li F, Fisher WE, Chen C, Yao Q. CypA is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates cell proliferation through CD147. 2006. *Cancer* 106(10): 2284-2294.
  84. Li YY, Feldman AM, Sun Y, McTiernan CF. Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart. 1998. *Circ.* 98(17): 1728-1734.
  85. Li Z, Li L, Zielke HR, Cheng L, Xiao R, Crow MT, Stetler-Stevenson WG, Froehlich J, Lakatta EG. Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. 1996. *Am. J. Pathol.* 148:121-128.
  86. Lin MC, Rockman HA, and Chien KR. Heart and lung disease in engineered mice. 1995. *Nat. Med.* 1:749-751.
  87. Lindsey ML, Escobar GP, Dobrucki LW, Goshorn DK, Bouges S, Mingoia JT, McClister DM, Su H, Gannon J, MacGillivray C, Lee RT, Sinusas AJ, Spinale FG. Matrix metalloproteinase-9 gene deletion facilitates angiogenesis after myocardial infarction. 2006. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290:H232-H239.
  88. Lindsey M, Wedin K, Brown MD, Keller C, Evans AJ, Smolen J, Burns AR, Rossen RD, Michael L, Entman M. Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. 2001. *Circ.* 103:2181-2187.
  89. Liu J, Farmer JDJ, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. 1991. *Cell* 66:807-815.
  90. Ma XL, Lefer DJ, Lefer AM and Rothlein R. Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion. 1992. *Circulation* 86:937-946.

## Literaturverzeichnis

91. Ma XL, Tsao PS, and Lefer AM. Antibody to CD-18 exerts endothelial and cardiac protective effects in myocardial ischemia and reperfusion. 1991. *J. Clin. Invest.* 88:1237-1243.
92. Ma XL, Weyrich AS, Lefer DJ, Buerke M, Albertine KH, Kishimoto TK, and Lefer AM. Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium. 1993. *Circulation* 88:649-658.
93. Malik N, Greenfield BW, Wahl AF, Kiener PA. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. 1996. *J. Immunol.* 156:3952-3960.
94. Maxwell SRJ, Lip GYH. Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease. 1997. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 44:307-317.
95. Maxwell SRJ, Lip GYH. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. 1997. *Int. J. Cardiol.* 58:95-117.
96. Menger MD and Vollmar B. Pathomechanisms of ischemia-reperfusion injury as the basis for novel preventive strategies: is it time for the introduction of pleiotropic compounds? 2007. *Transplant. Proc.* 39:485-488.
97. 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. 1990. *J. Biochem.* 107:316-323.
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. 1991. *J. Biochem.* 110(5):770-774.
99. Murphy G, Willenbrock F. Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. 1995. *Meth. Enzymol.* 248:496-510.
100. Nabeshima K, Suzumiya J, Nagano M, Ohshima K, Toole BP, Tamura K, Iwasaki H, Kikuchi M. Emmprin, a cell surface inducer of matrix metalloproteinases (MMPs), is expressed in T-cell lymphomas. 2004. *J. Pathol.* 202:341-351.
101. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. 1999. *J. Biol. Chem.* 274:21491-21494.
102. Nakai M, Chen L, Nowak RA. Tissue distribution of Basigin and Monocarboxylate Transporter 1 in the adult male mouse: a study using

## Literaturverzeichnis

- the wild-type and Basigin gene knockout mice. 2006. *The Anatomical Record Part A* 288A:527-535.
103. Nardo LG, Nikas G, Makrigiannakis A. Molecules in blastocyst implantation. Role of matrix metalloproteinases, cytokines and growth factors. 2003. *J. Reprod. Med.* 48(3):137-147.
  104. Nayler WG, Elz JS. Reperfusion injury: laboratory artifact or clinical dilemma? 1986. *Circ.* 74:215-221.
  105. Nigam A, and Kopecky S L. Therapeutic potential of monoclonal antibodies in myocardial reperfusion injury. 2002. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 2:367-376.
  106. 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. 2011. *J. Exp. Med.* 208(1):53-66.
  107. Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE, Clowes AW. Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. 1995. *Circ.* 92:1393-1398.
  108. Noguchi Y, Sato T, Hirata M, Harat T, Ohama K, Ito A. Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human endometrium during the menstrual cycle in vivo and in vitro. 2003. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88(12):6063-72.
  109. Ochmann C. CD147 (EMMPRIN) und dessen Ligand Cyclophilin A bestimmen das Ausmaß des myokardialen Schadens nach Ischämie/Reperfusion im Mausmodell. Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät. 2010. <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/12770/>.
  110. Ortega N, Behonick DJ, Stickens D, Werb Z. How proteases regulate bone morphogenesis. 2003. *Ann. NY. Acad. Sci.* 995:109-116.
  111. Ortega N, Behonick DJ, Werb Z Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. 2004. *Trends. Cell. Biol.* 14(2):86-93.
  112. Pathak SK, Basu S, Bhattacharyya A, Pathak S, Banerjee A, Basu J, Kundu M. TLR4-dependent NF-kappaB activation and mitogen- and stress-activated protein kinase 1-triggered phosphorylation events are central to *Helicobacter pylori* peptidyl prolyl cis-, trans-isomerase (HP0175)-mediated induction of IL-6 release from macrophages. 2006. *J. Immunol.* 177:7950-7958.
  113. Payeli SK, Schiene-Fischer C, Steffel J, Camici GG, Rozenberg I, Lüscher TF, Tanner FC. Cyclophilin A differentially activates monocytes and endothelial cells: role of purity, activity, and endotoxin contamination

## Literaturverzeichnis

- in commercial preparations. 2008. *Atherosclerosis* 197:564-571.
114. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, Andre-Fouet X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G, Ovize M. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. 2008. *N. Engl. J. Med.* 359(5):473-81.
  115. Pizzi MA, Crowe MJ. Transplantation of fibroblasts that overexpress matrix metalloproteinase-3 into the site of spinal cord injury in rats. 2006. *J. Neurotrauma* 23:1750-1765.
  116. 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. 2005. *J. Biol. Chem.* 280:27866-27871.
  117. Reimer KA, Jennings RB, Hill ML. Total ischemia in dog hearts, in vitro 2. High energy phosphate depletion and associated defects in energy metabolism, cell volume regulation, and sarcolemmal integrity. 1981. *Circ. Res.* 49:901-911.
  118. Renno T, Wilson A, Dunkel C, Coste I, Maisnier-Patin K, Benoit de Coignac A, Aubry JP, Lees RK, Bonnefoy JY, MacDonald HR, Gauchat JF. A role for CD147 in thymic development. 2002. *J. Immunol.* 168(10):4946-50.
  119. Sam F, Sawyer DB, Chang DI, Eberli FR, Ngoy S, Jain M, Amin J, Apstein CS, Colucci WS. Progressive left ventricular remodeling and apoptosis late after myocardial infarction in mouse heart. 2000. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279(1):H422-8.
  120. Santos-Martinez MJ, Medina C, Jurasz P, Radomski MW. Role of metalloproteinases in platelet function. 2008. *Thromb. Res.* 121:535-542.
  121. Satoh K, Matoba T, Suzuki J, O'Dell MR, Nigro P, Cui Z, Mohan A, Pan S, Li L, Jin Z, Yan C, Abe J, Berk BC. Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation. 2008. *Circ.* 117:3088-3089.
  122. 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. 2009. *Nat. Med.* 15(6):649-56.
  123. Saxena DK, Oh-Oka T, Kadomatsu K, Muramatsu T, Toshimori K. Behaviour of a sperm surface transmembrane glycoprotein basigin during epididymal maturation and its role in fertilization in mice. 2002.

## Literaturverzeichnis

Reproduction 123: 435-444.

124. Schlosshauer B, Bauch H, Frank R. Neurothelin: amino acid sequence, cell surface dynamics and actin colocalization. 1995. *Eur. J. Cell. Biol.* 68:159-166.
125. Schmidt R, Bultmann A, Fischel S, Gillitzer A, Cullen P, Walch A, Jost P, Ungerer M, Tolley ND, Lindemann S, Gawaz M, Schömig A, May AE. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD 147) is a novel receptor on platelets, activates platelets and augments nuclear faktor kappaB-dependent inflammation in monocytes. 2008. *Circ. Res.* 102:302-309.
126. Schmidt R, Bultmann A, Ungerer M, Joghetai N, Bulbul O, Thieme S, Chavakis T, Tool BP, Gawaz M, Schomig A, May AE. Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction. 2006. *Circulation* 113: 834-841.
127. Schmidt R, Redecke V, Breitfeld Y, Wantia N, Miethke T, Massberg S, Fischel S, Neumann F J, Schomig A and May A E. EMMPRIN (CD 147) is a central activator of extracellular matrix degradation by Chlamydia pneumoniae-infected monocytes. Implications for plaque rupture. 2006. *Thromb. Haemost.* 95:151-158.
128. Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, Libby P. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes. 1997. *Circ. Res.* 81: 448-454.
129. Seizer P, Geisler T, Bigalke B, Schneider M, Klingel K, Kandolf R, Stellos K, Schreieck J, Gawaz M, May AE. EMMPRIN and its ligand Cyclophilin A as novel diagnostic markers in inflammatory cardiomyopathy. 2011. *Int. J. Cardiol.* Epub ahead of print.
130. Seizer P, Klingel K, Sauter M, Westermann D, Ochmann C, Schönberger 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. 2012. *J. Mol. Cell Cardiol.* In Press.
131. Seizer P, Ochmann C, Schönberger 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. 2011. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31(6):1377-86.
132. Seizer P, Schonberger T, Schott M, Lang R, Langer H F, Bigalke B,

## Literaturverzeichnis

- 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. 2009 *Atherosclerosis* 1:51-57.
133. Seko Y, Fujimura T, Taka H, Mineki R, Murayama K and Nagai R. Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes. 2004. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317:162-168
134. Seulberger H, Lottspeich F, Risau W. The inducible blood-brain barrier specific molecule HT7 is a novel immunoglobulin-like cell surface glykoprotein. 1990. *EMBO J.* 2151-2158.
135. Sherry B, Yarlett N, Strupp A, Cerami A. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3511-3515.
136. Sidhu SS, Mengistab AT, Tauscher AN, LaVail J, Basbaum C. The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions. 2004. *Oncogene* 23:956-963.
137. Sperti G, Van Leeuwen RT, Quax PH, Maseri A, Kluft C. Cultured rat aortic vascular smooth muscle cells digest naturally produced extracellular matrix. Involvement of plasminogen-dependent and plasminogen-independent pathways. 1992. *Circ. Res.* 71(2):385-392.
138. 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. 2000. *Circ.* 102:1944-1949.
139. Springmann EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen B, Van Wart HE. Multiple methods of activation of latent fibroblast collagenase: evidence for the role of Cys73 active-site zinc complex in latency and a „cysteine-switch“ mechanism for activation. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:364-368.
140. Staun-Ram E, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. 2005. *RBEJ.* 3:56.
141. Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB. Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity. 1985. *Circ. Res.* 57:864-875.
142. Steffensen B, Hakkinen L, Larjava H. Proteolytic events of wound-healing – coordinated interactions among matrix metalloproteinases, integrins, extracellular matrix molecules. 2001. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*

## Literaturverzeichnis

- 12(5):373-398.
143. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. 2001. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17:463-516.
  144. Sun J, Hemler ME. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. 2001. *Cancer Res.* 61:2276-2281.
  145. Suzuki J, Jin ZG, Meoli DF, Matoba T, Berk BC. Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells. 2006. *Circ. Res.* 98:811-817.
  146. Svilaas T, Vlaar PJ, van der Horst IC, Diercks GFH, de Smet BJGL, van den Heuvel AFM, Anthonio RL, Jessurun GA, Tan E-S, Suurmeijer AJH, and Zijlstra F. Thrombus Aspiration during Primary Percutaneous Coronary Intervention. 2008. *NEJM* 358:557-567.
  147. Tang W, Chang SB, Hemler ME. Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. 2004. *Mol. Biol. Cell.* 15:4043-4050.
  148. Tang W, Hemler ME. Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering. 2004. *J. Biol. Chem.* 279:11112-11118.
  149. Tang Y, Nakada MT, Kesavan P, McCabe F, Millar H, Rafferty P, Bugelski P and Yan L. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. 2005. *Cancer Res.* 65:3193-3199.
  150. Tao Z, Cavaasin MA, Yang F, Liu Y, Yang X. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. 2004. *Life Sciences* 74: 1561-1572.
  151. Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. 2004. *Physiol. Genomics* 16:349-360.
  152. Tegeder I, Schumacher A, John S, Geiger H, Geisslinger G, Bang H, Brune K. Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis. 1997. *J. Clin. Immunol.* 17:380-386.
  153. Tolonen H, Dobson A, Kulathinal S. Effect on trend estimates of the difference between survey respondents and non-respondents: Results from 27 populations in the WHO MONICA project. 2005. *Eur J Epidemiol.* 20:887-898.
  154. Tomita T, Nakase T, Kaneko M, Shi K, Takahi K, Ochi T, Yoshikawa H.

## Literaturverzeichnis

- Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. 2002. *Arthritis Rheum.* 46(2):373-378.
155. Van den Bos EJ, Barend ME, De Waard MC, De Crom R, Duncker DJ. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation. 2005. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289:H1291-1300.
  156. Verdouw PD, Van Den Doel MA, De Zeuw S, Duncker DJ. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. 1998. *Cardiovasc. Res.* 39(1):121-135.
  157. Verma S, Fedak WM, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A, Li R, Dhillon B, Yau TM. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. 2002. *Circ.* 105:2332-2336.
  158. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. 2003. *Circ. Res.* 92:827-839.
  159. Webb S, Brown NA, Anderson RH. The structure of the mouse heart in late fetal stages. 1996. *Anat. Embryol. Berl.* 194(1):37-47.
  160. Westermarck J, Kähäri V. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. 1999. *FASEB J.* 13:781-792.
  161. Xu Q, Leiva MC, Fischkoff SA, Handschumacher RE, Lyttle CR. Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. 1992. *J. Biol. Chem.* 267:11968-11971.
  162. Yan L, Zucker S, Toole BP. Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. 2005. *Thromb. Haemost.* 93:199-204.
  163. Yang F, Chen Y, Su J. The role of CD147 in the proliferation, activation and chemotaxis of Jurkat cell induced by CypA. 2008. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 29(12):793-796.
  164. Yang Y, Zhu P. CD147 facilitates Cyclophilin A-induced MMP-9 expression on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis. 2007. *Journal of US-China Medical Science* 4:55-62.
  165. 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. 2000. *Eur. J. Biochem.* 267:4372-4380.
  166. Yurchenko V, Constant S and Bukrinsky M. Dealing with the family: CD147 interactions with cyclosporins. 2006. *Immunology* 117:301-309

## Literaturverzeichnis

167. Yurchenko V, Zybarth G, O'Connor M, Dai WW, Franchin G, Hao T, Guo H, Hung HC, Toole B, Gally P, Sherry B, Bukrinsky M. Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. 2002. *J. Biol. Chem.* 277:22959-22965.
168. Zavadzkas JA, Plyler RA, Bouges S, Koval CN, Rivers WT, Beck CU, Chang EI, Stroud RE, Mukherjee R, Spinale FG. Cardiac-restricted overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer causes myocardial remodeling and dysfunction in aging mice. 2008. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295:H1394-H1402.

## Danksagung

### **9 Danksagung**

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Andreas May dafür danken, dass er mir die Arbeit an diesem spannenden Thema ermöglicht hat.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Meinrad Gawaz für die von ihm geschaffenen Strukturen, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Frau Dr. Carmen Ochmann möchte ich für die gute Zusammenarbeit und das Operieren der Mäuse danken.

Ich danke zudem Herrn Dr. Peter Seizer, der mich während meiner gesamten Promotion betreute und mir bei meiner ersten wissenschaftlichen Arbeit entscheidende Hilfestellung leistete.

Auch Frau Dr. Tanja Schönberger danke ich für Rat und Tat zu jeder Zeit.

Zu guter Letzt möchte ich Frau Silke Mydlar danken, die mich über den gesamten Zeitraum der Promotion vor allem ideell unterstützt hat und somit den Abschluss dieser Dissertation wesentlich ermöglicht hat.

## Lebenslauf

### 10 Lebenslauf

Sebastian Zach

Geboren am 17.02.86 in Bad Oeynhausen

Schulbildung 1992-1996 Wichern Grundschule Bad Oeynhausen  
1996-2005 Immanuel Kant Gymnasium Bad Oeynhausen; Abiturnote 1,0

Zivildienst 2005-2006 Gollwitzer-Meier Klinik Bad Oeynhausen

Studium 01.04.2006 – 22.05.2012 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität-Tübingen; Gesamtnote 2,16

Famulaturen Internistische Intensivstation – Medizinische Klinik Tübingen  
Gynäkologie und Geburtshilfe – Klinikum Braunschweig  
Chirurgische Ambulanz und Notaufnahme – Klinikum Reutlingen  
Allgemeinchirurgie – Klinikum Minden

PJ 02/2011-01/2012  
Gynäkologie und Geburtshilfe – Universitäts Frauenklinik Tübingen  
Innere Medizin – Medizinische Klinik Tübingen  
Chirurgie – Kantonsspital Baden, Schweiz

Extracurriculäre Aktivitäten Studentische Hilfskraft in der Allgemeinchirurgie Tübingen 08/2010-01/2011  
Teilnehmer Theodor-Billroth-Akademie – Tübingen 07-08/2009  
Erasmus intensive program on minimal invasive techniques in gynaecology – Foggia 05/2011

Soziales Engagement Seit 2006 Semestersprecher  
Seit 2009 Behindertenbetreuung – Gustav-Werner-Stiftung