Zentrale Einrichtung Klinische Chemie
des Universitätsklinikums Ulm
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. M.G. Bachem

Regulation der EMMPRIN Expression und Freisetzung durch kultivierte Makrophagen - Interaktion mit koronaren glatten Gefäßmuskelzellen

Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med)
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von Veronika Felicitas Kreutle
geboren in Tettnang

-2004-

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Bachem

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Marx

Tag der Promotion: 29.06.06

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis..... 3

1. Einleitung..... 5

1.1 Pathogenese der Atherosklerose..... 5

1.2 Plaqueinstabilität..... 6

1.3 Matrixmetalloproteinasen (MMPs)..... 7

1.4 EMMPRIN..... 7

1.5 Fragestellung..... 8

2. Material und Methoden..... 10

2.1 Material..... 10

2.1.1 Reagenzien..... 10

2.1.2 Antikörper..... 13

2.1.3 Lösungen und Puffer..... 13

2.1.4 Verbrauchsmaterial..... 17

2.1.5 Geräte..... 17

2.2 Methoden..... 18

2.2.1 Zellisolation..... 18

2.2.2 Zellkultur..... 19

2.2.3 Stimulation der Zellen..... 20

2.2.4 EMMPRIN-Isolierung aus Makrophagen-Überstand..... 22

2.2.5 EMMPRIN-Immundepletion aus Makrophagen-Überstand..... 22

2.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration..... 23

2.2.7 Fluorometrische Bestimmung des DNA-Gehalts..... 23

2.2.8 Nachweis von MMPs..... 24

2.2.9 Nachweis von EMMPRIN im Zellkulturüberstand..... 26

2.2.10 Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von membrangebundenem EMMPRIN..... 26

2.2.11 Immunpräzipitation und Western Blot zum Nachweis von membrangebundenem und löslichem EMMPRIN..... 27

2.2.12 PCR..... 28

2.3 Statistik..... 29

3. Ergebnisse.....30
3.1 Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die Expression von MMPs..... 30
3.2 Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die Expression von EMMPRIN durch Makrophagen..... 33
3.3 Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die mRNA-Synthese von EMMPRIN in Makrophagen..... 38
3.4 Einfluss von MMPs auf die Expression von membrangebundenem und löslichem EMMPRIN durch Makrophagen.....39
3.5 Interaktion von Makrophagen und humanen koronaren glatten Muskelzellen..... 48

4. Diskussion.....52
4.1 Isolierung und Kultivierung von Makrophagen..... 52
4.2 Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf Makrophagen..... 53
4.2.1. Einfluss auf die Synthese von MMPs
4.2.2. Einfluss auf die Expression von EMMPRIN
4.3 Shedding – Freisetzung von löslichem EMMPRIN durch MMPs..... 55
4.4 Interaktion zwischen Makrophagen und hcSMCs.....60
4.5 Homophile Interaktion 61

5. Zusammenfassung..... 62

6. Literaturverzeichnis..... 64

7. Danksagung.....75

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
B-FGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EMMPRIN	Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer
ELISA	Enzym-linked immunabsorbent assay
FN	Fibronektin
FITC	Fluoroscein isothiocyanate
FCS	Fötales Kälberserum
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Stimulating Factor
HcSMC	Human Coronary Smooth Muscle Cell
HRP	Horseradish peroxidase
IFN-γ	Interferon-γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
LDL	Low-density-lipoprotein
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
M-CSF	Macrophage Stimulating Factor
MMP	Matrixmetalloproteinase
M-RNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MT-MMP	Membrane-Type Metalloproteinase
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat buffered saline
PBST	Phosphat buffered saline mit Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion

PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RIPA	Radioimmune precipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Chain-Reaction
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium-dodecyl-sulfate
SN	Zellkulturüberstand
TCSF	Tumor-cell-derived Collagenase Stimulatory Factor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TGF-α	Transforming Growth Factor-α
TGF-β1	Transforming Growth Factor-β1
TNB	Tris-bufferd saline containing bovine serum albumin
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α
TR-FIA	Time-Resolved Fluorescens Immunoassay
TSA	Tyramid Signal Amplification
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TWEEN	Polyoxyethyenesorbitanmonolaurat
U/min	Umdrehungen pro Minute
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1

1. Einleitung

1.1 Pathogenese der Atherosklerose

Atherosklerotische Gefäßveränderungen sind die häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität in den westlichen Industrienationen und die weltweite Bedeutung von Gefäßerkrankungen ist steigend [2, 42]. Die Pathogenese der Atherosklerose ist noch nicht vollständig geklärt. Fest steht, dass bestimmte Faktoren das Risiko erhöhen, atherosklerotische Gefäßerkrankungen zu entwickeln und an ihnen zu sterben. Solche Risikofaktoren sind: Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Alter, hoher oxidativer Stress [19], erhöhtes LDL, familiäre Belastung, erhöhte Spiegel von Entzündungsmediatoren [43].

Die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen ist ein langwieriger Prozess. Oben genannte Risikofaktoren führen zu einer verstärkten Bildung von freien Sauerstoffradikalen durch Endothel- und glatte Gefäßmuskelzellen und dadurch zu Endothelschäden. Unter Mitwirkung von Adhäsionsmolekülen z.B. VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) durch Endothelzellen kommt es zur Bindung von Monozyten an die Gefäßwand. Proinflammatorische Zytokine wie z.B. TNF-α und IL-1β und oxidierte Lipoproteine führen zu einer gesteigerten VCAM-1 Expression [42]. Die Monozyten können mit Hilfe von MCP-1 (monocyte-chemoattractant protein-1) in die Intima einwandern. In der Gefäßwand stimuliert M-CSF bei Monozyten und Makrophagen die Expression von Scavanger-Rezeptoren mit deren Hilfe die Zellen die modifizierten Lipoproteine aufnehmen und sich dann zu Schaumzellen umwandeln. Diese setzen proinflammatorische Zytokine (TNF-α, IL-1β) frei und verstärken so den Entzündungsprozess in der atherosklerotischen Läsion. Diese zahlreichen Prozesse führen schließlich zur Bildung der atherosklerotischen Frühläsion (Fatty Streaks) [43].

Wenn sich die glatten Gefäßmuskelzellen teilen und sich unter die extrazelluläre Matrix (ECM) lagern, beginnt die fibröse Umwandlung der Gefäßwand. Sowohl das geschädigte Endothel als auch die Makrophagen setzen Wachstumsfaktoren frei, die die Proliferation und die Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima stimulieren [42, 54]. Das Kollagen in der atherosklerotischen Plaque stammt hauptsächlich von glatten Muskelzellen [57]. Diese Zellen bilden zusammen mit den Schaumzellen die Intermediärläsion der Atherosklerose. Bleiben die Risikofaktoren bestehen, kommt es zu

einem Wachstum der atherosklerotischen Läsion und somit zu einer zunehmenden Lumeneinengung [43].

1.2 Plaqueinstabilität

Es stellt sich nun die Frage, warum es nach Jahren völliger Beschwerdefreiheit plötzlich zu einer Ruptur der atherosklerotischen Plaque mit thrombotischen Gefäßverschluss und als Folge hiervon zu akuten Ereignissen wie instabiler Angina pectoris, akutem Herzinfarkt und plötzlichen Herztod kommen kann. Entscheidend ist nicht allein der Stenosegrad, d.h. die Plaquegröße, sondern v.a. die Verletzlichkeit der atherosklerotischen Läsion [7, 85]. Lipidreiche und weiche Plaques sind vulnerabler als kollagenreiche und harte Plaques. Es scheint drei kritische Hauptkomponenten für eine erhöhte Plaquevulnerabilität zu geben:

- die Größe und die Konsistenz der Lipidkerns
- die Dicke der fibrösen Kappe, die den Kern bedeckt
- Entzündungs- und Reparaturprozesse in der fibrösen Kappe

Lipidanreicherung, Ausdünnung der fibrösen Kappe, insuffiziente Reparaturprozesse und von Makrophagen induzierte Entzündungsprozesse erhöhen das Risiko einer Plaqueruptur [42, 85]. Prädilektionsstelle für eine Ruptur der Kappe ist die Schulterregion der atherosklerotischen Plaque. In der Schulterregion, in der es an kollagenproduzierenden glatten Muskelzellen mangelt und in der die meisten Makrophagen zu finden sind, weist die fibröse Kappe den geringsten Kollagengehalt auf [7, 57]. Den aktivierten Makrophagen kommt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von thrombotischen Komplikationen der Atherosklerose zu, da diese matrixdegradierende MMPs freisetzen und es somit zu einer Erweichung der fibrösen Kappe kommen kann, wenn gleichzeitig proinflammatorische Zytokine, wie z.B. Interferon-γ (INF-γ), die Synthese von Kollagen durch glatte Muskelzellen behindern. Reißt die atherosklerotische Plaque, kommt das Blut mit Gewebsthromboplastin, einem stark koagulationsförderndem Protein, in Kontakt, das ebenfalls von Makrophagen produziert wird [42]. Eine Überexpression von prothrombotischen Faktoren durch Plaquezellen erleichtert die Thrombusbildung [58]. Nicht jeder thrombotische Prozess wird klinisch manifest. Ein Thrombus kann auch wieder resorbiert werden. Es folgt dann ein Wundheilungsprozess, bei dem es, bedingt durch verschiedene Wachstumsfaktoren, wie PDGF und TGF-β, die von aktivierten Thrombozyten freigesetzt werden, zu Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen und somit durch eine gesteigerte Kollagensynthese zu einer weiteren Verdickung der Intima und Lumeneinengung kommt [58].

1.3 Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

Am Abbau der Extrazellularmatrix sind verschiedene Enzyme beteiligt: Serin-Proteasen, Cystein-Proteasen und Metalloproteinasen. MMPs können Komponenten der Extrazellularmatrix degradieren, welche fibrilläres und nicht fibrilläres Kollagen, Gelatine, Fibronektin, Laminin und Basalmembranglykoproteine beinhalten [35, 38, 72, 78, 81]. Hierdurch spielen sie eine wichtige Rolle in zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen wie Entzündung, Tumorausbreitung, Atherosklerose, Myokardfibrose, Herzinsuffizienz, Wundheilung und Organentwicklung [16, 38, 72, 78, 86]. Es wurden mehr als 20 menschliche MMPs identifiziert und, ihre Hauptstruktur betreffend, in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, membrangebundene und andere MMPs eingeteilt [9, 45, 72, 78]. Die genaue Regulation der Produktion und Aktivierung von MMPs ist wichtig, um den richtigen Wirkungsort und das Wirkungsausmaß zu gewährleisten. Überschreitet die Zahl aktiver Metalloproteinasen die der endogenen Inhibitoren der MMPs, der sogenannten tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs), kommt es zu vermehrtem Kollagenabbau [9, 32, 43, 72]. Die Aktivität der MMPs wird auf mehreren Ebenen, wie z.B. bei der Transkription und Translation sowie nach der Freisetzung in den Extrazellularraum kontrolliert [38, 78]. Die meisten MMPs werden als Proenzym sezerniert und erhalten ihre volle Aktivität durch Abspaltung einer Prodomäne, die am aminoterminalen Ende des Proteins lokalisiert ist [35, 38, 72, 78]. MMPs beeinflussen sich gegenseitig im Aktivierungsprozess [9, 48, 78]. In atherosklerotischen Läsionen werden MMPs vermehrt exprimiert [14-16, 21, 24, 35, 43, 48, 56, 63, 75]. Die MMPs in der atherosklerotischen Plaque stammen hauptsächlich von Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen. Die Produktion der MMPs wird durch Wachstumsfaktoren, Zytokine [15, 35, 40, 42 45, 55, 75], ox-LDL [1, 24-26, 36, 75, 80], Homocystein [22], mechanische Faktoren wie Scherkräfte [66], hämodynamische Komponenten, verstärkten transmuralen Druck [38] und oxidativen Stress [25] sowie durch direkte Zell-Zell-Interaktionen beeinflusst.

1.4 EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer)

Ein weiterer wichtiger Faktor, der MMPs stimuliert, ist EMMPRIN. Die EMMPRIN Aktivität wurde ursprünglich in einer Reihe von Studien entdeckt, die Biswas et al. durchgeführt haben [4]. Diese Studien haben zur Identifikation eines Faktors (TCSF, später in EMMPRIN umbenannt) geführt, der mit der Oberfläche von Tumorzellen assoziiert ist und der die MMP-Synthese in Fibroblasten steigert [4, 31, 37, 87]. Der Faktor wurde

gentechnisch synthetisiert und als transmembranäres Glykoprotein identifiziert. EMMPRIN ist mittlerweile auf verschiedenen Zellen wie Leukozyten, Keratinozyten, Endothelzellen v.a. aber auf zahlreichen Tumorzellen entdeckt worden [5, 6, 8, 17, 28, 33, 39, 53, 59, 60, 62, 70- 72, 74, 87]. Neben seiner Rolle bei der Tumorprogression scheint EMMPRIN auch bei entzündlichen Prozessen wie rheumatoider Arthritis [73] oder Atherosklerose [11, 20, 41, 47], sowie an der Entwicklung einer Herzinsuffizienz [38] beteiligt zu sein, da bei diesen Prozessen erhöhte Expressionen von EMMPRIN und MMPs gefunden werden.

EMMPRIN ist ein N-glykosyliertes Protein, das aus 269 Aminosäuren besteht [49]. Das EMMPRIN Gen ist auf Chromosom 19 lokalisiert [27] und wurde von Guo et al. isoliert und charakterisiert [18]. CD147 hat die typische Struktur eines Typ I integralen Membranproteins. Die extrazelluläre Domäne besteht aus zwei Ig-ähnlichen Domänen. [68]. EMMPRIN ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie [4]. Die Immunglobulinsuperfamilie besteht aus verschiedenen Molekülen, die an Zelloberflächen-Interaktionen und an der immunologischer Erkennung beteiligt sind, z.B. Igs, T-Zell-Rezeptoren, MHC I und MHC II Antigene, CD4, CD8 und neurale Zelladhesionsmoleküle (N-CAM) [18, 49]. Die Extrazellulärdomäne umfasst 185 Aminosäuren. Die zytoplasmatische Region von EMMPRIN ist kurz und besteht aus nur 40 Aminosäuren, die transmembranäre Domäne aus 24 Aminosäuren. Die Aminosäuren der zytoplasmatischen Domäne und der transmembranären Domäne sind beim Menschen, der Maus und beim Huhn stark konserviert. Interessanterweise enthält die transmembranäre Domäne Glutaminsäure, was auf die Wichtigkeit dieser Region für die Funktion des Moleküls schließen lässt [49, 50], da geladene Aminosäuren in der Mitte der transmembranären Domäne für Proteine, die die Membran nur einmal durchspannen nicht üblich sind [50].

1.5 Fragestellung

Auf der Basis der vorliegenden Daten, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob EMMPRIN aus Makrophagen-Überständen die Sekretion von Metalloproteinasen durch humane koronare glatte Muskelzelle (hcSMCs) beeinflußt. Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss haben Zytokine und Wachstumsfaktoren bei Makrophagen auf die Expression von MMPs?
2. Welchen Einfluss haben Zytokine und Wachstumsfaktoren bei Makrophagen auf die Sekretion von EMMPRIN (CD 147)?

3. Führen die Entzündungsmediatoren TNF-α und IL-1β zur Abspaltung von EMMPRIN von der Zelloberfläche bei Makrophagen?
4. Steigert isoliertes EMMPRIN aus Makrophagen-Überstand bei hcSMCs die Sekretion von Metalloproteinasen?
5. Welchen Einfluss haben konditionierte Makrophagen-Überstände auf die Freisetzung von MMPs bei hcSMCs?

Durch die Beantwortung dieser Fragen sollte geklärt werden, ob eine Interaktion von Makrophagen und hcSMCs über EMMPRIN besteht und ob diese bei der Entstehung einer Plaqueruptur möglicherweise eine Rolle spielen könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1. Reagenzien

Aceton	Fluka, Seelze
AEBSF	Merck, Darmstadt
Albumin, bovines Fraktion V	SERVA, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Amphotericin B	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Merck, Darmstadt
BioRad D_c Proteinassay 500-0007	BioRad, Inc. Hercules, USA
BisBenzimid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Bromophenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
CloneticsTN Smooth Muscle Cell Basal Medium	Cambrex BioScience,Verviers, Belgien
Coomassie Brilliant Blue R-250	BioRad Laboratories, Hercules, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DNS-Standard vom Kalbsthymus	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Endoglykosidase F	Roche Diagnostics, Deutschland
Enhancement-Lösung	Delfia Wallac, Turku, Finnland
Essigsäure 99,8%	Sigma-Aldrich Chemie, Seelze
Ethylentriamintetraessigsäure (EDTA)	Riedel-de-Haen, Seelze
EZ-Link™ sulfo-NHS-LC-LC-Biotin	Pierce, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Ficoll-Paque Plus	Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg
Gelatine, Typ B aus Rinderhaut	Sigma Chemical, St.Louis, MO, USA
GelStar	Biozym, Germany
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma, Deisenhofen
Human coronary Smooth Muscle Cells	Clonetics, USA
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics, Deutschland
ImmunoPure® IgG Elution Buffer	Pierce, USA
ImmunoPure® Protein G IgG Plus Orientation Kit	Pierce, USA

Leupeptin	Sigma, Steinheim
L-Glutamin	GIBCO, Eggenstein
β-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Micro BCA™ Proteinassay Kit 23235	Pierce, Illinois,USA
MMP-1 ELISA Kit	Amersham Bioscience, Uppsala Schweden
MMP-9 ELISA Kit	Oncogene, Darmstadt
Natriumazid (NaN_3)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumbicarbonat ($NaHCO_3$)	Sigma, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Fluka, Seelze
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Natrtriumorthovavadate (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natronlauge	Baker, Deventer, USA
Nonidet NP-40	Sigma, Steinheim
Oligonukleotidprimer	Thermo Hybaid, Deutschland
Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Pepstatin A	Fluka, Seelze
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})	Biochrom AG, Berlin
Prestained SDS Page Standard High Range	BioRad Laboratories, Hercules, USA
Precision Plus Protein™ Standard (Dual Color)	BioRad Laboratories, Hercules, USA
Propidiumjodid	Eugene, Oregon, USA
Purified human MMP-2 CC071	Chemicon, Temecula, Kanada
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Deutschland
Recombinant human Fibronektin	EMP Genetech
Recombinant human FGF basic	R&D Systems, Abingdon, GB
Recombinant human GM-CSF	R&D Systems, Abingdon, GB
Recombinant human IL-1β	BioSource Int., Camarillo,CA,USA
Recombinant human IL-6	BioSource Int., Camarillo,CA,USA
Recombinant human IL-8	BioSource Int., Camarillo,CA,USA
Recombinant human IL-10	BioSource Int., Camarillo,CA,USA
Recombinant human MCP-1	R&D Systems, Abingdon, GB

Recombinant human MMP-1	R&D Systems, Abingdon, GB
Recombinant human MMP-9	R&D Systems, Abingdon, GB
Recombinant human PDGF-AB	BioSource Int., Camarillo,CA,USA
Recombinant human TGF-α	BioSource Int., Camarillo,CA,USA
Recombinant human TGF-β1	BioSource Int., Camarillo,CA,USA
Recombinant human TNF-α	BioSource Int., Camarillo,CA,USA
Reverse Transkriptase	Superscript, Gibco, Deutschland
Rotiphorese 10x SDS-Page Laufpuffer	ROTH, Karlsruhe
Rotiphorese Gel A	ROTH, Karlsruhe
Rotiphorese Gel B	ROTH, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
Sepharose A CL 4B	Amersham Bioscience, Uppsala Schweden
Sequiserve	Vatersetten, Deutschland
Sodium-dodecyl-sulfat (SDS)	Sigma, Steinheim
Silikon	Bayer, Deutschland
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent substrate kit	Pierce, Illinois,USA
Streptavidin-Europium	Delfia Wallac,Turku, Finnland
Streptavidin-FITC	Dako, Hamburg
Streptavidin-HRP	Dako, Hamburg
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris	USB™, Ohio, USA
Triton X-100	Sigma, Missouri, USA
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Österreich
TSA™ Biotin System Reagent	Perkin Elmer Life Science Products,USA
Tween 20	Sigma, Steinheim
X-Vivo 10 Medium	Cambrex BioScience,Verviers, Belgien
Zymogram Entwicklungspuffer (10x)	BioRad Laboratories, Hercules, USA
Zymogram Probenpuffer	BioRad Laboratories, Hercules, USA
Zymogram Renaturationspuffer (10x)	BioRad Laboratories, Hercules, USA

2.1.2 Antikörper

Anti-mouse Biotin	Dako, Hamburg
Anti-Mouse HRP	Dako, Hamburg
Biot. Polyklonaler anti-CD147 (BAF972)	R&D Systems, Abingdon, GB
Biot. Polyklonaler anti-MMP-2 (BAF902)	R&D Systems, Abingdon, GB
Goat anti-human CD147 (SC9754)	Santa Cruz, Biotechnology, Kalifornien, USA
Monoklonaler anti-CD147	R&D Systems, Abingdon, GB
Monoklonaler anti-MMP-2 (MAB9021)	R&D Systems, Abingdon, GB
Mouse anti-human CD147 (MCA1876)	SeroTec, Oxford, GB
Mouse anti-human MMP-2	R&D Systems, Abingdon, GB
Mouse anti-human MMP-9	R&D Systems, Abingdon, GB
Rabbit-anti-mouse IgG (Z0456)	DAKO, Hamburg
Rabbit-anti-mouse IgG Alexa Fluor (488)	Molecular Probes Inc., Leiden, NL

2.1.3 Lösungen und Puffer

2.1.3.1 Allgemeine Puffer

PBS (Phosphat buffered saline)-Puffer:

PBS	9,55g
Destilliertes Wasser	1 Liter

PBST-Puffer (Phosphat buffered saline mit Tween):

PBS	1 M
Tween (Polyoxyethyenesorbitanmonolaurat)	0,05 %

2.1.3.2 Puffer zur Immunfluoreszenzfärbung

TNB (Tris-bufferd saline containing bovine serum albumin)-Puffer (pH 7,5):

Tris/HCl	0,1 M
NaCl	0,15 M
Bovines Serumalbumin	0,5 %

2.1.3.3 Puffer zur DNA-Messung

DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Puffer (pH 7,4):

Natriumdihydrogenphosphat ($NaH_2PO_4 \cdot H_20$)	50 mM
NaCl	2 M

bisBenzimid-Lösung:

bisBenzimid	1 mg
DNA-Puffer	500 ml

2.1.3.4 Puffer für die Fluoreszenzimmunassay-ELISAs

Coating-Puffer (pH 9,1):

Natriumbicarbonat ($NaHCO_3$)	0,05 M

Assaypuffer (pH 7,7):

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
Bovines Serumalbumin	0,5 %
Natriumazid (NaN_3)	0,5 %

Waschpuffer (pH 7,4):

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
Tween (Polyoxyethyenesorbitanmonolaurat)	0,05 %

2.1.3.5 Puffer und Lösungen für Immunopräzipitation, Western Blot und Zymographie

2.1.3.5.1 Frisch hergestellte Puffer und Lösungen

RIPA (Radioimmune precipitation assay)-Puffer:

Tris/HCl	65 mM
NaCl	155 mM
Triton X-100	1 %
Na-Deoxycholat	0,25 %
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	1 mM
Aprotinin	1 µg/ml
Leupeptin	1 µg/ml
Pepstatin	1 µg/ml
Natriumtriorthovavadate (Na_3VO_4)	50 µM
AEBSF-Lösung vor Gebrauch hinzufügen (10 µl/ml)	10 µl

EZ-Link™ sulfo-NHS-LC-LC-Biotin-Lösung.

EZ-Link™ sulfo-NHS-LC-LC-Biotin	0,34 mg
destilliertes Wasser	10 µl

7,5% Trenngel für Zymographie:

Gel A	2,38 ml
Gel B	1,875 ml
0,75 M Tris/HCl (pH 8,8)	3,94 ml
20% SDS (Sodium-dodecyl-sulfate)	51 µl
destilliertes Wasser	754 µl
APS (Ammoniumperoxiddisulfat)	80 µl
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	6 µl

10% Trenngel für Western Blot oder Immunopräzipitation:

Gel A	4 ml
Gel B	2,5 ml
0,75 M Tris/HCl (pH 8,8)	4,5 ml
20% SDS (Sodium-dodecyl-sulfate)	45 µl
destilliertes Wasser	1,428 ml
APS (Ammoniumperoxiddisulfat)	100 µl
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	7,5 µl

Sammelgel:

Gel A	933 µl
Gel B	736 µl
0,625 M Tris/HCl (pH 6,8)	1,25 ml
20% SDS (Sodium-dodecyl-sulfate)	50 µl
destilliertes Wasser	7,03 ml
10% APS (Ammoniumperoxiddisulfat)	100 µl
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	10 µl

Deck-Lösung:

Laufpuffer	1 ml
Methanol	1 ml

2x Laemmli Proben-Puffer:

Tris/HCl (pH 6,8)	125 mM
SDS (Sodium-dodecyl-sulfate)	4 %
0,02 % Bromophenolblau	0,5 ml
Glycerol	20 %
β-Mercaptoethanol	5 %

2.1.3.5.2 Fertige Puffer und Lösungen

10x SDS-PAGE Laufpuffer	ROTH, Karlsruhe
Gel A (29% Methylen-bisacrylamide)	ROTH, Karlsruhe
Gel B (30% Acrylamid)	ROTH, Karlsruhe
10x Zymogram Entwicklungspuffer	BioRad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
10x Zymogramm Renaturationspuffer	BioRad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
Zymogram Probenpuffer	BioRad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA

2.1.3.6 Puffer zur EMMPRIN Isolierung

Waschpuffer A (pH 7,5):

Tris-HCl	50 mM
Nonidet NP-40	0,1%
NaCl	150 mM

Waschpuffer B (pH 7,5):

Tris-HCl	50 mM
Nonidet NP-40	0,1%
NaCl	500 mM

Waschpuffer C (pH 7,5):

Tris-HCl	50 mM
Nonidet NP-40	0,1%
NaCl	1 M

Waschpuffer D (pH 7,5):

Tris-HCl	50 mM

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Blue max TN 50 ml Falcons	Becton Dickinson labware, NJ, USA
Blue max TN 15 ml Falcons	Becton Dickinson labware, NJ, USA
DAKO Pen S 2002	DAKO, Glostrup, Dänemark
FALKON Zellkulturflasche (75cm^2)	Becton Dickinson labware, NJ, USA
Filter zum Ankonzentrieren von Proben	Millipore Corporation, Bedford, USA
Gel-Blotting Paper	Schleicher und Schuell, Dassel
Kodak Scientific imaging film	Eastman Kodak Company, NY, USA
Millex-Mikrofilter 0,22 µm	Millipore Corporation, Bedford, USA
Pasteurpipetten	Brand, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Deutschland
Plastikpipette 10/25 ml	Costar, Deutschland
PVDF Westernblotting-Membranen	Boehringer, Mannheim
96-well Mikrotiterplatte	Nunc-Maxi sorp, Roskilde, Dänemark
6-well Zellkulturplatte (10 cm^2/Well)	Becton Dickinson labware, NJ, USA
24-well Zellkulturplatte (43 cm^2)	Becton Dickinson labware, NJ, USA
VivaScience Bio-Folie	InVitro Systems&Service GmbH, Göttingen

2.1.5 Geräte

BioCAD Perfusions Chromatograpy Workstation	PerSeptive Biosystems, USA
Cell-Dyn 3500	Abbott GmbH, Wiesbaden
Dampfsterilisator KSG 112	KSG, Olching
Elektronische Waage MC210P, KB BA 100	Sartorius, München
Elektronische Waage IC 2201P, KB BA 200	Sartorius, München
Elektrophoreseapparat Mini ProteanII	BioRad, München
Flüssiger Stickstofftank 8038	Forma Scientific Inc.
Fluoreszenz-Mikroskop (Axioskop)	Carl Zeiss, Oberkochen
Inkubator Typ BB-6220	Heraeus Instruments, Hanau
Invert Mikroskop TELAVALC31	Carl Zeiss, Oberkochen
LightCycler technology	Idaho Technology, USA
LKB Bromma 2197 Power Supply	LKB Bromma, Schweden
Multiphor II Elektrophorese-Einheit	LKB Bromma, Schweden
Multipipette plus	Eppendorf, Köln
Perfect Blue^{TM} Vertical electrophoresis	peQLab Biotechnologie GmbH,

&Consort power supply	Erlangen
Pipetten	Eppendorf, Köln
Phasenkontrastmikroskop, Telaval 31	Carl Zeiss, Oberkochen
PH-Meter, digitales pH 525	WTW, Weilheim
Proteinbestimmungsgerät	SLT Labinstruments GmbH, Fellbach
Semi-Dry Elektroblotkammer 2177	LKB Bromma, Schweden
Scanner Gel Doc 1000	BioRad, München
Schweißgerät Polystar 100GE	Rische & Herfurth GmbH, Hamburg
SLT Wascher	TECAN Deutschland, Crailsheim
Sterilbank Typ HS 18/2	Heraeus Instruments
Thermomixer 5436	Eppendorf, Deutschland
Thermostar 300-0132	BMG, Offenburg
Victor 1420 Multilabel Counter	Wallac Oy,Turku, Finnland
Vortex-2^{TM} Genie Model G-560E	Scientific Industries, NY, USA
Zentrifuge Rotixa/RP 4200	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge High-speed Labofuge 400R	Heraeus Instruments, Fellbach

2.2 Methoden

2.2.1 Zellisolation

Um Monozyten für die Zellkultur zu gewinnen, wurden Lymphozyten und Monozyten aus frischem Buffy-coat (gesunde Spender von der Blutspendezentrale des DRK Ulm) isoliert. Zunächst wurde 3 ml des Ficoll-Paque in 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und 3 min bei 1200 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Buffy-coat wurde 1:1 mit sterilem PBS gemischt und die 3 ml des Ficoll-Paque dann mit 6 ml verdünntem Buffy-coat überschichtet. Anschließend folgte die Trennung der Blutbestandteile durch Zentrifugation bei 2120 U/min bei 22°C über 30 min. Am Boden des Zentrifugenröhrchens befanden sich nach der Zentrifugation Erythrozyten, unmittelbar über diesen Granulozyten sowie zwischen dem Ficoll-Paque und Plasma eine Schicht aus mononuklearen Zellen. Das gemischte mononukleare Zellband wurde mit Pasteurpipetten aspiriert, in ein frisches Röhrchen überführt und zweimal mit PBS sowie zweimal mit RPMI-Medium gewaschen. Bei den einzelnen Waschschritten wurde jeweils mit 1800 U/min bei 12°C über 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet gut resuspendiert. Beim letzten Waschschritt wurde das Pellet in 10 ml x-vivo-Medium (10% FCS) aufgenommen und die

Gesamtzellzahl sowie der prozentuale Monozytenanteil bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in Biofolie-Säckchen überführt. Die Zellen wurden für 8-10 Tage im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 – Gehalt in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Zellkultur von Makrophagen

Die isolierten Monozyten differenzierten sich während der acht Tage in den Biofolie-Säckchen zu Makrophagen. Nach acht Tagen wurden die Zellen aus der Folie abgelöst. Hierzu wurden die Säckchen vorsichtig über eine Kante gezogen, um an der Folie haftende Zellen zu lösen. Die Zellsuspension wurde dann in Zentrifugenröhrchen überführt, die Zellen bei 1000 U/min fünf Minuten lang zentrifugiert und anschließend in frischem Medium aufgenommen. Das Medium bestand aus RPMI-Lösung mit L-Glutamin/ Streptomycin/Penicillin (1%) und fetalem Kälberserum (10%). Zuvor wurden 6-Well-Platten mindestens 6 h mit Fibronektin gecoatet (0,5 M $NaHCO_3$-Coating-Puffer, pH 9,1; 2 µg/ml rh-Fibronektin). Die Platten wurden anschließend zweimal mit PBS und einmal mit RPMI-Medium gewaschen. Danach folgte die Aussaat der Zellen (10^6 Makrophagen/ml Medium). Nach 1-1½ h wurden nicht anhaftende Zellen (Lymphozyten und tote Zellen) abpipettiert, die Makrophagen einmal mit RPMI-Medium gewaschen und auf 2 ml Medium (10% FCS, 1% L-Glutamin/Streptomycin/ Penicillin) aufgefüllt. Nach zwei Tagen wurde das Medium erneut gewechselt.

2.2.2.2. Zellkultur von humanen koronaren glatten Muskelzellen (hcSMCs)

In den Versuchen wurden hcSMCs zwischen der 6. und der 11. Passage verwendet. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm^2) bei 37°C, 5% CO_2-Gehalt in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Das Medium bestand aus Clonetics^{TN} Smooth Muscle Cell Basal Medium (5% FCS). Jeden zweiten bis dritten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden passagiert, sobald sie konfluent waren oder für einen Versuch benötigt wurden. Beim Passagieren der Zellen wurde zunächst das Medium verworfen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und zum Ablösen der Zellen 1,5 ml Trypsin/EDTA in die Zellkulturflasche pipettiert. Daraufhin wurden die Zellen fünf Minuten lang im Brutschrank inkubiert. Zu der Zellsuspension in der Flasche wurden 20 ml Medium (20% FCS) hinzugegeben. Die Zellen wurden dann bei 1000 U/min über 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in neuem 5% FCS enthaltendem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden entweder auf neue Flasche

(25 ml Medium) aufgeteilt oder für einen Versuch in 6-Well Platten (2 ml Medium/Well) ausgesät.

2.2.2.3 Einfrieren von humanen koronaren glatten Muskelzellen (hcSMCs)

Beim Einfrieren der Zellen wurden dieselben Schritte wie beim Passagieren der Zellen angewandt, das Zellpellet wurde nach der Zentrifugation jedoch in Medium aufgenommen, das 20% FCS und 10% DMSO enthielt. Eine Flasche (75 cm^2) wurde auf zwei Kryoröhrchen (je 1,5 ml/ Röhrchen) verteilt. Um zu vermeiden, dass die Zellen durch Eiskristalle zerstört werden, wurden die Zellen zunächst für 2-4 h bei –20°C, dann über Nacht bei –80°C langsam eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.3 Stimulation der Zellen

2.2.3.1 Stimulation der Makrophagen

Die Makrophagen wurden anfangs mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen stimuliert. Hierzu wurden sie zunächst, wie in 2.2.2.1 beschrieben, kultiviert. Vor der Stimulation wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen und über 12 h in RPMI-Medium mit L-Glutamin/Streptomycin/Penicillin (1%) ohne FCS belassen. Nach der Reduktion erfolgte erneut ein Mediumwechsel (0% FCS). Folgende Wachstumsfaktoren und Zytokine wurden zur Stimulation (48 h) verwendet: TGF-β1 (2 ng/ml), TNF-α (20 ng/ml), IL-1β (10 ng/ml), IL-6 (2 ng/ml), IL-10 (10 ng/ml), PDGF-AB (20 ng/ml), TGF-α (20 ng/ml), IL-8 (5 ng/ml), bFGF (20 ng/ml), MCP-1 (50 ng/ml). Später wurden die Versuche nur mit TNF-α (20 ng/ml), IL-1β (10 ng/ml) durchgeführt. Bei einem Teil der Versuche wurden die Zellen zuvor 48 h mit GM-CSF (RPMI-Medium mit 10% FCS) präinkubiert, gewaschen, 12 h reduziert und, wie eben beschrieben, stimuliert. Wurde in einem Versuch mit GM-CSF präinkubiert, so blieben die Zellen auf anderen 6-Well Platten über diese 48 h zum Vergleich ohne GM-CSF.

Sollte bei einem Versuch die Aktivität der MMPs verringert werden, wurden dem Medium zusätzlich EDTA (250-500 µM) oder der MMP-Inhibitor Ilomastat = GGM6001 (20 µM) zugegeben. In weiteren Versuchen wurden die Zellen, wie oben beschrieben, kultiviert und den Makrophagen über 6-48 h aktivierte MMP-2 (0,05-0,4 µg/ml) und MMP-9 (0,1 µg/ml) zugegeben. Nach der Stimulation wurden die Zellüberstände abgenommen und bei 1000 U/min 5 min zentrifugiert. Dadurch setzten sich feste Zellbestandteile ab, die Überstände

konnten abpipettiert und bis zu ihrer Verwendung bei –20°C eingefroren werden. In einem weiteren Versuch wurde membrangebundenes EMMPRIN aus Zelllysat und lösliches EMMPRIN aus Zellkulturüberstand von Makrophagen isoliert (siehe unten 2.2.4). Das membrangebundene EMMPRIN wurde in vitro ohne Zellen in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit aktivierten MMP-1, MMP-2 und MMP-9 (0,1 µg/ml) 2 h bei 37°C inkubiert. Das Zelllysat und der Überstand wurden nach der Inkubation mit den genannten MMPs zur Deglykosylierung 4 h mit F-Glykosidase inkubiert Danach wurden die Western Blot Membranen mit N-terminalen oder C-terminalen Antikörpern inkubiert

2.2.3.2 Stimulation der humanen koronaren glatten Muskelzellen (hcSMCs)

2.2.3.2.1 Stimulation der hcSMCs mit Makrophagen-Überstand

Wurden die Zellen für einen Versuch benötigt, passagierte man sie wie in 2.2.2.2. beschrieben. Am ersten Tag nach Aussaat der hcSMCs in 6-Well Platten erfolgte ein Mediumwechsel, das Medium bestand aus Clonetics^{TN} Smooth Muscle Cell Basal Medium (5% FCS). Hatten die Zellen eine ausreichende Dichte erreicht, wurden sie über 12 h in 0,1% FCS enthaltendem Medium belassen. Nach der Reduktionszeit wurden die hcSMCs einmal mit Medium gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well 1,5 ml Medium (0,1% FCS) pipettiert. Als Kontrolle dienten hcSMCs in 0,1% FCS enthaltendem Medium. Die hcSMCs wurden mit konditionierten Makrophagen-Überständen unterschiedlicher Volumina (100 µl–300 µl) inkubiert. Die Makrophagen waren zuvor, wie in 2.2.3.1 beschrieben, stimuliert worden. Zur Stimulation der hcSMCs wurden je 100 µl–300 µl Makrophagen-Überstand (Makrophagen-Kontrolle (ohne FCS), Makrophagen mit TNF-α, sowie Makrophagen mit IL-1β stimuliert) verwendet. Bei einem weiteren Versuch war EMMPRIN bei einem Teil der zur Stimulation verwendeten Makrophagen-Überstände zuvor mittels Immundepletion entfernt worden. Die Versuchsdauer betrug 48 h. Nach der Stimulation wurden die Zellüberstände abgenommen, in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 1000 U/min 5 min zentrifugiert, die Überstände abpipettiert und bis zu ihrer Verwendung bei –20°C eingefroren.

2.2.3.2.2 Stimulation der hcSMCs mit isoliertem EMMPRIN

In einem weiteren Versuch wurden die hcSMCs mit unterschiedlichen Konzentrationen von EMMPRIN (10 ng/ml-50 ng/ml EMMPRIN) über 48 h in 24-well oder 6-well Platten stimuliert. Das EMMPRIN stammte aus den Zellkulturüberständen von Makrophagen (siehe unten 2.2.4).

2.2.3.3 Kokultur von Makrophagen und hcSMCs

Zunächst wurden Makrophagen in “culture slides“, wie oben beschrieben, kultiviert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen einmal gewaschen und anschließend in Clonetics^{TN} Smooth Muscle Cell Basal Medium (0,1% FCS) über 12 h reduziert. HcSMCs wurden anschließend für weitere 48 Stunden ohne erneuten Mediumwechsel zu den Makrophagen zugegeben und die kokultivierten Zellen sowie Makrophagen und hcSMCs Monokulturen mittels Immunfluoreszenzfärbung auf die Expression von EMMPRIN, MMP-9 und MMP-2 untersucht.

2.2.4 EMMPRIN-Isolierung aus konditioniertem Makrophagen-Überstand

Zellkulturüberstände von Makrophagen wurden mit 2 ml/min auf eine 20HQ Anionenaustauschsäule (BioCAD, Perfusions Chromatography Workstation, PerSeptive Biosystems, USA) mit Puffer A aufgetragen. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen Gradienten des Puffers B gelöst, 1 ml Fraktionen wurden gesammelt und EMMPRIN mittels time-resolved FIA gemessen. EMMPRIN enthaltende Fraktionen wurden gepoolt und über 12 h bei 4 °C mit einer Immunaffinitätsmatrix inkubiert, wo Agarose Protein G mit einem monoklonalen anti-human EMMPRIN Antikörper gekoppelt war. Das System wurde mit den Waschpuffern A-D gewaschen: EMMPRIN wurde dann mittels Elution-Buffer gelöst. Vor der Zugabe zu den glatten Muskelzellen wurde EMMPRIN erneut mittels time-resolved FIA gemessen. Die Isolierung und die Immundepletion von EMMPRIN wurde freundlicherweise von Herrn F. Diaz durchgeführt und wurde deshalb hier nur kurz beschrieben.

2.2.5 EMMPRIN-Immundepletion von Makrophagen-Überständen

Zur Entfernung von EMMPRIN aus dem Makrophagen-Überstand wurden 2 ml Medium mit 0,5 ml Protein-G Agarose, die an einen monoklonalen anti-human-EMMPRIN Antikörper gebunden ist, 2 h bei 4°C auf einem Rüttler inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 13.000 U/min**,** wurde das Pellet verworfen und der Überstand erneut mit 0,5 ml der Protein-G Agarose über 2 h bei 4°C inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde mittels EMMPRIN-FIA getestet, ob das EMMRIN vollständig aus dem Überstand entfernt werden konnte.

2.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.2.6.1 Proteinbestimmung aus Zellkulturüberstand

Die Proteinbestimmung aus dem Zellkulturüberstand erfolgte mit Hilfe des BioRad D_c-Proteinassay Reagent Kit. Zunächst wurde eine Standard-Verdünnungsreihe erstellt. Der höchste Standard enthielt 1,2 mg/ml Protein der niedrigste 0,15 g/ml. Die Proben wurden in den Verhältnissen 1:3, 1:5 und 1:10 mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Anschließend wurden 20 µl der zu bestimmenden Proben in eine Mikrotiterplatte pipettiert, mit 10 µl Reagenz A und 80 µl Reagenz B aufgefüllt und über 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Proteinmessung.

2.2.6.2 Proteinbestimmung aus Zelllysat

Mit Hilfe des Micro BCA™ Protein Assay Kit der Firma Pierce erfolgte die Proteinbestimmung aus dem Zelllysat. Zunächst wurden die Proben in den Verhältnissen 1:50, 1:100, 1:200 mit ddH_20 verdünnt. Dann wurde eine Standardverdünnungsreihe (Höchster Standard 1:100 mit ddH_20 verdünnt, die folgenden Standards je 1:1) erstellt. Die Standard-Stocklösung enthielt 2000 µg/ml Protein. Vom Standard und den Proben wurden je 100 µl (Doppelbestimmung) in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Danach folgte die Herstellung des Working-Reagent (Reagenz A, Reagenz B, Reagenz C). Von dieser Lösung wurden 100 µl/Well auf den Standard und die Proben pipettiert, über 2 h bei 37°C im Dunkeln inkubiert und anschließend die Proteinkonzentration gemessen.

2.2.7 Fluorometrische Bestimmung des DNA-Gehalts

Die Zellen befanden sich in 6-well-Platten. Nach der Zellkultur wurde der Überstand entnommen, die Platten zweimal kurz mit PBS gewaschen und anschließend bei -20 °C eingefroren. Zum Lösen der Zellen wurden die 6-well-Platten aufgetaut und in jedes Well 1000 µl Trypsin-EDTA pipettiert. Das Trypsin-EDTA wurde zuvor 1:3 mit DNA-Puffer vermischt. Die Zellen wurden über 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Der Ablöseprozess erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle. Aus jedem Well wurden je zweimal (Doppelbestimmung) 420 µl entnommen und mit 1680 µl bisBenzimid für 30 min in Dunkelheit inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2000 U/min über 5 min wurde von jeder Probe 2000 µl entnommen, in eine 24-well-Platte überführt und am Viktor gemessen. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von Kalbsthymus-DNA. Der Standard wurde ebenfalls in eine 24-well-Platte pipettiert, jedes Well mit DNA-Puffer auf 400 µl ausgeglichen und auf 2 ml mit bisBenzimid aufgefüllt.

2.2.8 Nachweis von Metalloproteinasen

2.2.8.1 Zymographie zum Nachweis von Metalloproteinasen

Zum Nachweis der Enzymaktivität sezernierter Metalloproteinasen von Makrophagen und hcSMCs wurden Zellkulturüberstände nach 48-stündiger Stimulation gesammelt, für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und bis zu ihrer Verwendung bei –20°C eingefroren. Zur Herstellung des Trenngels aus 7,5% Polyacrylamid wurde zunächst 22-25 mg Gelatine in ddH_20 gelöst (Gelatinekonzentration 20 mg/ml) und für 1 h bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde unlösliches Material bei 4000 U/min 5 min abzentrifugiert. Die denaturierte Gelatine (1 ml) wurde zum Trenngel gegeben und der Gelmix zur Polymerisation in den Gießstand überführt. Nach Aushärtung des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen. Die Proben wurden in den Verhältnissen 1:1 und 1:2 mit einem nicht reduzierenden Probenpuffer gemischt und je 10-20 µl in die Taschen des Sammelgels geladen, um dann bei konstant 90 V für 120-150 h auf Eis elektrophoretisch aufgetrennt zu werden. Sobald das Bromophenolblau das Gelende erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Anschließend wurden die Gele zweimal für je 15 min bei Raumtemperatur in Renaturationspuffer gewaschen, um das SDS zu entfernen. Dann wurden die Gele bei 37°C über Nacht in Entwicklungspuffer inkubiert. Die Gele wurden in einer 0,34% Coomassie blue R250 für 30-60 min gefärbt und nach danach in einer 40%-Methanol, 15%- Essigsäure-Lösung solange entfärbt, bis sich die Banden klar zeigten und man hierdurch die proteolytische Aktivität der Enzyme sehen konnte.

2.2.8.2 Nachweis der MMP-2 mittels FIA-ELISA

Im Zellkulturüberstand von hcSMCs wurde MMP-2 mit einem FIA-ELISA gemessen. Zunächst wurden 96-well Mikrotiterplatten mit rabbit-anti-mouse IgG (AK-Verdünnung 1:220 mit coating-Puffer) über Nacht bei 4°C gecoatet. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Platten mehrmals mit PBST gewaschen. Die Platten wurden dann mit einem monoklonalem anti-MMP-2 Antikörper (1.Ak 1:500 in coating-Puffer verdünnt) 100 µl/Well über 4 h bei Raumtemperatur gecoatet. Anschließend wurde freie Proteinbindungstellen mit Assaypuffer 250 µl/Well über 2 h geblockt. Danach wurden von Standard und Proben je zweimal (Doppelbestimmung) 100 µl in die Wells pipettiert. Als Standard wurde purified human MMP-2 der Firma Chemicon verwendet. Es wurden eine Standardverdünnungskurve mit Assaypuffer (Verdünnung je 1:1) erstellt, wobei acht Standards und ein Blank eingesetzt wurden (50 ng/ml-0,78 ng/ml). Die Proben und der Standard inkubierten über Nacht bei 4°C. Nach dem Waschen wurden 100 µl

Zweitantikörper hinzugefügt (Polyklonaler Anti-MMP-2, biot. 1:500 in Assaypuffer verdünnt) und über 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde europium-labeled Streptavidin in die Wells pipettiert (1:500 mit Assaypuffer verdünnt) und über 1 h bei 22°C belassen. Zuletzt wurde für 45 min eine Verstärker-Lösung hinzugefügt. Der Nachweis von MMP-2 erfolgte am Victor 1420 Multilabel counter durch Messung der Fluoreszenz.

2.2.8.3 Nachweis der MMP-9 mittels FIA-ELISA

Der Nachweis der MMP-9 im Zellkulturüberstand erfolgte mittels MMP-9 ELISA Kit (Oncogene).

2.2.8.4 Nachweis der MMP-1 mittels FIA-ELISA

Der Nachweis der MMP-1 im Zellkulturüberstand erfolgte mittels MMP-1 ELISA Kit (A mersham Bioscience).

2.2.8.5 Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von Gelatinasen

Der Nachweis der MMP-2 und MMP-9 in Makrophagen und hcSMCs erfolgte mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung. Nach der Kultivierung der Zellen auf “culture slides“ wurden die Zellen einmal kurz in PBS und ddH_20 gewaschen und dann über 30 min in Paraformaldehyd fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen in einer 70% Ethanol-Lösung inkubiert. Zur Blockade der endogenen Peroxidase wurden die Zellen 15 min mit einem Methanol-H_20_2-Gemisch (0,3% H_20_2) inkubiert und kurz in PBS gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden geblockt, indem man die Zellen 30 min lang mit TNB-Puffer inkubierte. Zum Nachweis der MMPs wurden folgende Färbeschritte nacheinander durchgeführt. Falls nicht anders angegeben wurden die Antikörper mit TNB-Puffer verdünnt: Inkubation der Zellen mit dem 1.Antikörper anti-MMP-2 (1:50) oder anti-MMP-9 (1:200) 1 h lang, 2.Antikörper anti-mouse-HRP (1:100 verdünnt) 1 h, Biotin-TSA-Färbereagenz (1:500 mit Applification Diluens verdünnt) 15 min, 30 min im Dunkeln rabbit-anti-mouse IgG Alexa-red (1:500). Dann folgte die Kernfärbung mit bisBenzimid 30 min lang. Um eine Austrocknung zu vermeiden, wurde in einer feuchten Kammer gefärbt. Nach jedem der Färbeschritte wurden die Objektträger gründlich in PBST je 3 Mal, 5 min lang gewaschen.

2.2.9 Nachweis von EMMPRIN im Zellkulturüberstand

Im Zellkulturüberstand von Makrophagen wurde EMMPRIN mit einem FIA-ELISA gemessen. Zunächst wurden 96-well Mikrotiterplatten mit rabbit-anti-mouse IgG (AK-Verdünnung 1:220 mit coating-Puffer) über Nacht bei 4°C gecoatet. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Platten mehrmals mit PBST gewaschen. Die Platten wurden dann mit monoklonalen Anti-CD147 (1.Ak 1:2000 in coating-Puffer verdünnt) 100 µl/Well über 4 h bei Raumtemperatur gecoatet. Anschließend wurde freie Proteinbindungstellen mit Assaypuffer 250 µl/Well über 2 h geblockt. Danach wurden von Standard und Proben je zweimal (Doppelbestimmung) 100 µl in die Wells pipettiert. Als Standard diente rhEMMPRIN, das in einer Verdünnungsreihe jeweils 1:1 mit Assaypuffer verdünnt wurde, wobei acht Standards und ein Blank eingesetzt wurden (40 ng/ml - 0,312 ng/ml). Die Proben und der Standard inkubierten über Nacht bei 4°C. Nach dem Waschen wurden 100 µl Zweitantikörper hinzugefügt (Polyklonaler anti-CD147 1:1000 in Assaypuffer verdünnt) und über 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde europium-labeled Streptavidin in die Wells pipettiert (1:500 mit Assaypuffer verdünnt) und über 1 h bei 22°C belassen. Zuletzt wurde noch für 45 min eine Verstärker-Lösung hinzugefügt. Der Nachweis von EMMPRIN erfolgte am Victor 1420 Multilabel counter durch Messung der Fluoreszenz.

2.2.10 Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von zellassoziiertem EMMPRIN

Der Nachweis von zellassoziiertem EMMPRIN erfolgte mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung. Nach der Kultivierung der Zellen in den Säckchen wurden die Makrophagen auf Fibronektin-gecoateten Glasplättchen kultiviert. Nach ihrer Stimulation wurden die Zellen auf den Glasplättchen einmal kurz in PBS und ddH_20 gewaschen und dann über 20 min in eiskaltem Aceton fixiert. Nach der Fixierung wurden die Glasplättchen getrocknet und auf Objektträger geklebt. Dann wurden die Objektträger zweimal in PBST gewaschen. Zur Blockade der endogenen Peroxidase wurden die Zellen 15 min mit einem Methanol-H_20_2-Gemisch (0,3% H_20_2) inkubiert und kurz in PBS gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden geblockt, indem man die Zellen 30 min lang mit TNB-Puffer inkubierte. Zum Nachweis von EMMPRIN wurden folgende Färbeschritte nacheinander durchgeführt. Falls nicht anders angegeben wurden die Antikörper mit TNB-Puffer verdünnt: Inkubation der Zellen mit dem 1.Antikörper Anti-CD147 15 min lang (Antikörper 1:1000 verdünnt), 2.Antikörper Anti-mouse-HRP (1:100 verdünnt) 1 h, Biotin-TSA-Färbereagenz (1:500 mit Applification Diluens verdünnt) 15 min, Streptavidin-FITC (1:50 verdünnt) 30 min im Dunkeln oder rabbit-anti-mouse IgG Alexa-red (1:500). Dann

folgte die Kernfärbung entweder mit bisBenzimid 30min oder Propidiumjodid (1:500) 15 min. Um eine Austrocknung zu vermeiden, wurde in einer feuchten Kammer gefärbt. Nach jedem der Färbeschritte wurden die Objektträger gründlich in PBST je 3 Mal, 5 min lang gewaschen.

2.2.11 Immunpräzipitation und Western Blot zum Nachweis von membrangebundem und löslichem EMMPRIN (CD147)

2.2.11.1 Immunpräzipitation

Nach der Stimulation wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit EZ-LINK^{TM} Sulfo-NHC-LC-LC-Biotin (10 µl in 1ml PBS) über 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 30 Minuten mit RIPA-Puffer (250 µl/Well) auf Eis inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber aus dem Well gelöst und das Zelllysat in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und die unlöslichen Zellkomponenten durch Zentrifugation für 10 min bei 13.000 U/min und 4°C entfernt. Die Überstände wurden mit 80 µl Protein-A-Sepharose versetzt und über 2 h bei 4°C auf dem Rüttler vorgereinigt. Anschließend wurden die Überstände über Nacht mit 2,5 µg Anti-CD147 Antikörper inkubiert und danach erneut für 1,5 h mit 80 µl Protein-A-Sepharose zur Immunkomplexausfällung versetzt. Das Sepharose-Immunkomplex-Pellet wurde dann siebenmal mit Waschpuffer gewaschen (2 x Puffer A, BI, BII, 2 x Puffer C. ddH_20. Nach dem Waschen wurde in jedes Eppendorf-Reaktionsgefäß zum Pellet 40 µl 2-fach reduzierender Laemmli-Probenpuffer pipettiert und bei 95°C für 5 min gekocht. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine bei konstant 21 mA über 2 h. Hierzu wurden 20 µl Überstände in ein 10% SDS-PAGE Gel geladen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mittels eines Semi-Dry- Elektrotransfer-Geräts unter konstant 0.8 V/cm^2 2 h auf PVDF-Membranen übertragen. Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurden die PVDF-Membranen nach dem Elektro-Blot über Nacht bei 4°C in 5%-igem Albuminblockierpuffer inkubiert. Danach wurden die Membranen für 45 min in Streptavidin-HRP (1:2000 mit 1% Albumin verdünnt) bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach mehrmaligem gründlichen Waschen (8 x 5 min) in PBST wurde die Membranen für 5 min in West Picco Chemieluminescent Substrate Kit inkubiert. Die EMMPRIN-Banden zeigten sich nach der Entwicklung der Kodak x-ray Filme.

2.2.11.2 EMMPRIN (CD147)Western Blot

Nach der Stimulation wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 250 µl/Well RIPA-Puffer (und je 10 µl/ml Leupeptin, Pepstatin, Aprotinin) über 30 min inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Danach folgte bei den Proben die Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.2.6.2). Die Proben wurden mit RIPA-Puffer alle auf das selbe Volumen angeglichen, sofern sich bei der Proteinbestimmung Unterschiede ergeben hatten. Danach wurden die Proben mit nicht reduzierendem Probenpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt und über 5 min bei 95°C gekocht. Die anschließende Elektrophorese und der Elektroblot verliefen wie bei der Immunpräzipitation (siehe 2.2.11.1). Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurden die PVDF-Membranen nach dem Elektroblot über 3 h bei Raumtemperatur in 5%-igem Albuminblockierpuffer inkubiert. Über Nacht wurden die Membranen bei 4°C mit dem Erstantikörper inkubiert (Monoklonaler Anti-CD147 1:5000 in 2%-iger Albuminlösung verdünnt). Nach mehrmaligem gründlichen Waschen (8 x 5 min) in PBST wurde die Membranen eine Stunde lang in anti-mouse-Biotin (1:2000 in 1%-iger Albuminlösung verdünnt) belassen. Nach erneutem Waschen folgte die Inkubation in Streptavidin-HRP (1:2000 in 1%-iger Albuminlösung verdünnt). Anschließend gabt es keine Unterschiede mehr zu den Schritten der Immunupräzipitation.

2.2.12 PCR

Zum Nachweis von EMMPRIN mRNA wurden Makrophagen 3 h, 6 h, 9 h, 12 h und 24 h mit folgende Wachstumsfaktoren und Zytokine stimuliert: TGF-β1 (2 ng/ml), TNF-α (20 ng/ml), IL-1β (10 ng/ml), IL-6 (2 ng/ml), IL-10 (10 ng/ml), PDGF-AB (20 ng/ml), TGF-α (20 ng/ml), IL-8 (5 ng/ml), bFGF (20 ng/ml), MCP-1(50 ng/ml). Gesamt RNA wurde mittels High Pure Isloation Kit, der DNA Verdauung beinhaltet extrahiert, die Konzentration und Reinheit der RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt, und 1 µg der ganzen RNA wurde in cDNA mit 0,2 U/ml reverser Transkriptase bei 42 °C 50 Minuten lang umgeschrieben. Für die RT-PCR wurden folgende Oligonukleotid Primer (0,5 µmol/L) verwendet: human EMMPRIN, sense primer 5`-CCGAGGACGTCCTGGAT-3`, anti-sense primer 5`-CGGGCCACCTGCCTCA-3` (Acc Jo2642, 358bp exon3-exon7), GAPDH, sense primer 5`-GGCAGTGATGGCATGGACTG-3`, antisense primer 5`-GGCAGTGATGGCATGGACTG-3`. Die DNA Amplifikation wurde durchgeführt, indem man 4 ng cDNA mittels Light-cycler Technik benutzte. Die Reaktionen wurden 34-40 mal

gecycelt (95°C Denaturation: 10 sec, annealing: EMMPRIN 60 °C 5 sec, GAPDH 56°C 5 sec, Extension 72°C: EMMPRIN 8 sec, GAPDH 17 sec, slopes waren 20°C/sec). Die Fluoreszenz wurde während der Extensionsphase gemessen. Um die Spezifität der amplifizierten Produkte zu bestätigen, wurden die Schmelzkurven am Ende der Amplifikation hergestellt, indem man die Proben bei 20 °C/sec auf 65°C (EMMPRIN) und auf 66°C (GAPDH) abkühlte und anschließend die Temperatur wieder auf 95°C bei 0,1°C/sec mit Messung der Immunfluoreszenz alle 0,1°C erhöhte. Zusätzlich wurden die PCR-Produkte mit QIAquick Gel Extraktion Kit aufgereinigt und sequenziert. Die Quantifizierung der PCR Produkte wurde mit Hilfe des Light cyclers durchgeführt, indem man gereinigte, sequenzierte PCR Produkte als Standard in einer Verdünnungsreihe verwendete. EMMPRIN mRNA wurde mit GAPDH mRNA in den entsprechenden Proben verglichen. In Wasserkontrollen und in Kontrollen, die ohne prior reverse Transkriptase amplifiziert wurden, waren keine PCR Produkte nachweisbar. Zur Visualisierung wurden die PCR Produkte auf ein 1% Agarose Gel in 0,5x Trisborate aufgetragen und mit GelStar gefärbt.

2.3 Statistik

Ergebnisse werden als Mittelwert ± SD angegeben und wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse berechnet, gefolgt von Scheffé Test

Programm: StatSoft Statistika 6.1

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die Expression von MMPs

Da die Degradation von extrazellulärer Matrix bei der Entstehung der Plaqueinstabilität eine wichtige Rolle spielt, sollte der Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die Sekretion von MMPs durch Makrophagen untersucht werden. Hierzu wurden zunächst Monozyten aus frischem Buffy-coat mittels Ficoll-Paque isoliert. Die Makrophagen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und für zwei Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen über 48 h in serumfreiem Medium inkubiert und mit folgende Wachstumsfaktoren und Zytokine stimuliert: TGF-β (2 ng/ml), TNF-α (20 ng/ml), IL-1β (10ng/ml), IL-6 (2 ng/ml), IL-10 (10 ng/ml), PDGF (20 ng/ml), TGF-α (20 ng/ml), IL-8 (5 ng/ml), bFGF (20 ng/ml), MCP-1(50 ng/ml). Später wurden die Versuche nur mit TNF-α und IL-1β durchgeführt (Abb. 3).

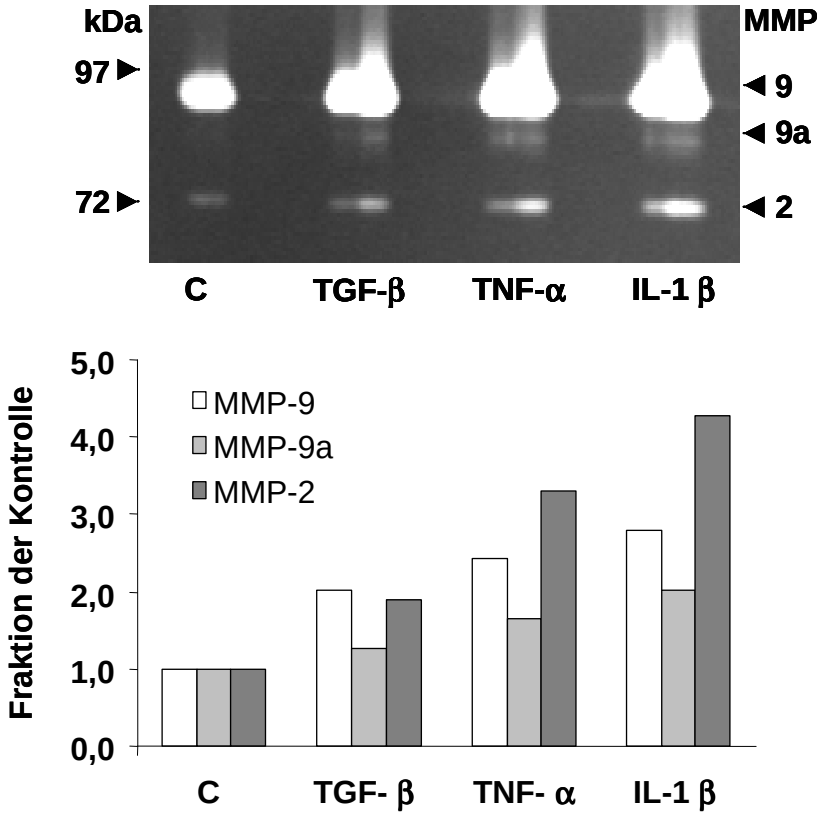

Abb. 1: Induktion und Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) durch TGF-β, TNF-α und IL-1β im Zellkulturüberstand von kultivierten Makrophagen. *Makrophagen wurden in serumfreiem Medium über 48 h mit TGF-β (Transforming-Growth-Factor-β) (2 ng/ml), TNF-α (Tumor-Necrosis-Factor-α) (20 ng/ml) und IL-1β (Interleukin-1β) (10 ng/ml) stimuliert. Oberes Bild: Zymographie: C: Kontrolle:*

serumfreier Makrophagen-Überstand. Zonen enzymatischer Aktivität sind als helle Banden sichtbar. Banden in Höhe von 72 kDa entsprechen der latenten Form der MMP-2, Banden bei 92 kDa der MMP-9 und Banden bei 82 kDa der aktiven Form der MMP-9. Unteres Bild: densitometrische Quantifizierung.

Die Expression von MMPs wurde mittels Zymographie nachgewiesen. Hierzu wurden Überstände kultivierter Makrophagen elektrophoretisch in einem Gelatine Gel (7,5% PA) aufgetrennt. Wie in Abb.1 gezeigt wird, wurde die Sekretion von MMP-2 und MMP-9 bei Zellen, die mit TGF-β, TNF-α und IL-1β stimuliert wurden, im Vergleich zur Kontrolle stark gesteigert. Weiterhin konnte eine Aktivierung der MMP-9 im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Da GM-CSF die Expression von EMMPRIN auf Monozyten/Makrophagen induziert und EMMPRIN wiederum die Synthese von Matrixmetalloproteinasen stimuliert, wurde untersucht, ob Makrophagen, die mit TNF-α, IL-1β und GM-CSF stimuliert werden, vermehrt MMPs exprimieren. Bei einem Teil der Versuche wurden die Zellen 48 h mit GM-CSF präinkubiert, gewaschen, 12 h reduziert und, wie oben beschrieben, stimuliert. Als Vergleichsgruppe dienten nur mit TNF-α und IL-1β stimulierte Zellen.

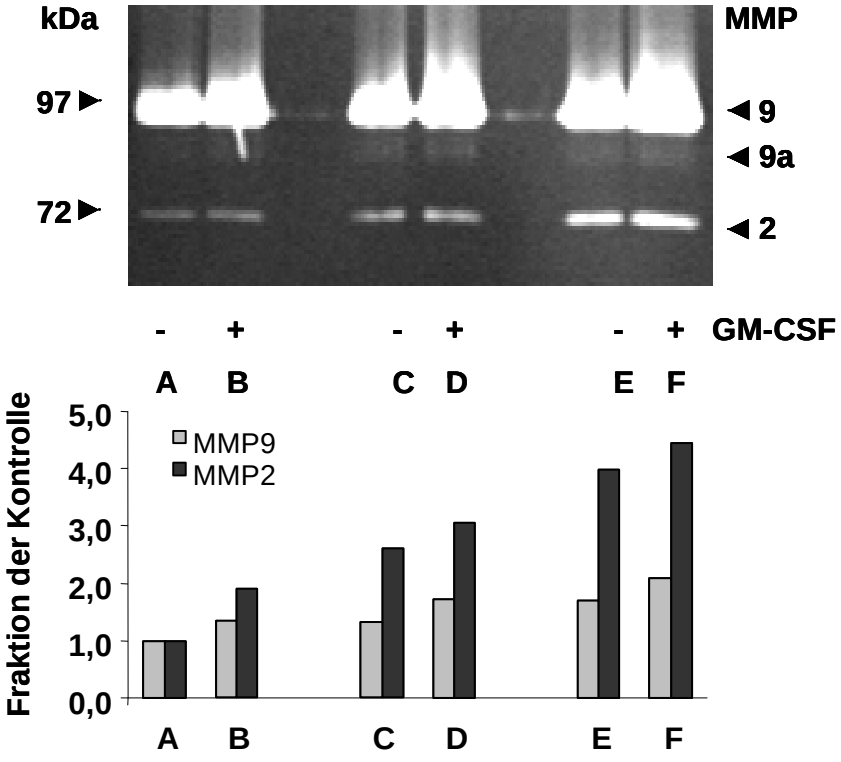

Abb. 2: Induktion von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) im Zellkulturüberstand von Makrophagen durch GM-CSF. *Makrophagen wurden in serumfreiem Medium über*

48 h mit TNF-α (Tumor-Necrosis-Factor-α) (20 ng/ml) (Bahn C und D) und IL-1β (Interleukin-1β) (10 ng/ml) (Bahn E und F) stimuliert. Ein Teil der Zellen wurde mit GM-CSF (Granulocyte-Macrophage-Stimulatin-Factor) (1 ng/ml) 48 h lang präinkubiert (B, D und F). Zonen enzymatischer Aktivität sind als helle Banden sichtbar. Banden in Höhe von 72 kDa entsprechen der latenten Form der MMP-2, Banden bei 92 kDa der MMP-9 und Banden Bei 82 kDa der aktiven Form der MMP-9. Unters Bild: densitometrische Quantifizierung.

Die Zugabe von TNF-α führte zu einer signifikanten Steigerung der MMP-9 um 49 % ± 14% und einer signifikanten Steigerung der MMP-2 um 121% ± 35%. Die Zugabe von IL-1β führte zu einer signifikanten Steigerung der MMP-9 um 44 % ± 17 % und einer signifikanten Steigerung der MMP-2 um 141% ± 13 %.

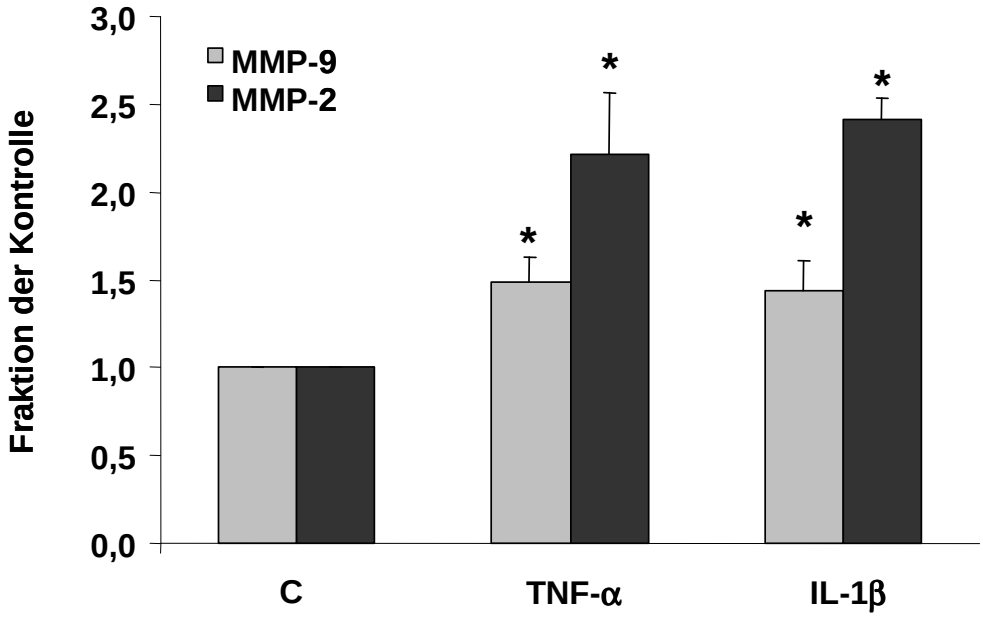

Abb. 3: Steigerung von MMPs (Matrixmetalloproteinasen) durch TNF-α (Tumor-Necrosis-Factor-α) und IL-1β (Interleukin-1β) im Zellkulturüberstand von kultivierten Makrophagen. *Densitometrische Quantifizierung und Berechnung von 3 Zymographien. C:Kontrolle. Mittelwert ± SD. *: p< 0 ,05.*

Zymographien von Zellkulturüberständen, die mit den anderen oben genannten Zytokinen und Wachstumsfaktoren stimuliert wurden, sind nicht dargestellt, da sich hier keine Unterschiede zur Kontrolle zeigten.

3.2 Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die Expression von EMMPRIN durch Makrophagen

3.2.1. Einfluss auf membrangebundenes EMMPRIN

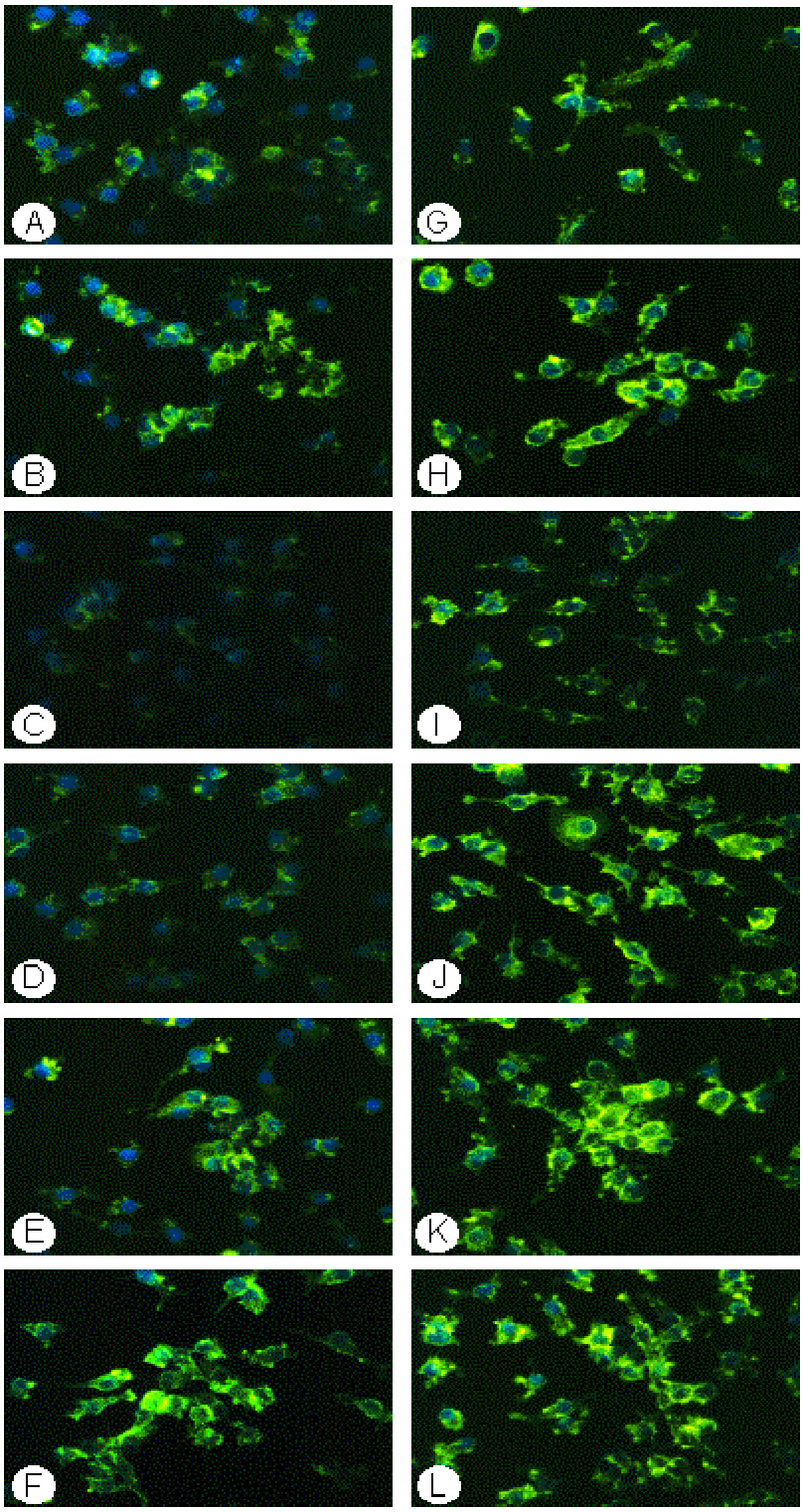

Abb. 4: Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die Expression von membrangebundenem EMMPRIN. *Makrophagen wurden in serumfreiem Medium 48 h mit B:TGF-β (Transforming-Growth-Factor-β) (2 ng/ml), C:TNF-α (Tumor-Necrosis-*

Factor-α) (20 ng/ml), D:IL-1β (Interleukin-1β) (10 ng/ml), E:IL-6 (Interleukin-6) (2 ng/ml), F: IL-10 (Interleukin-10)(10 ng/ml), H: MCP-1 (Monocyte-Chemotactic-Protein-1) (50 ng/ml), I: IL-8 (Interleukin-8) (5 ng/ml), J: TGF-α (Transforming-Growth-Factor-α) (20 ng/ml), K: PDGF (Platelet-Derived-Growth-Factor) (20 ng/ml) und L: bFGF (Basic-Fibroblas-Growth-Factor)(20 ng/ml) inkubiert. A ist Kontrolle für B, C, D, E, F.
G ist Kontrolle für H, I, J, K und L. Die Immunfluoreszenzfärbung der Makrophagen zeigt EMMPRIN v.a. auf der Zelloberfläche (FITC, grün). Die Kerne wurden mit bisBenzimid gegengefärbt (blau).

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie sollte der Effekt von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die Expression von oberflächenassoziiertem EMMPRIN bei Makrophagen dargestellt werden. Hierzu wurden die Zellen über 48 h stimuliert. Wie Abb. 4 zeigt, ist bei Makrophagen, die mit TNF-α und IL1-β stimuliert wurden, an der Oberfläche im Vergleich zur Kontrolle, deutlich weniger EMMPRIN zu sehen. Im Gegensatz dazu konnte bei Zellen, die mit IL-10, MCP-1, TGF-α, PDGF und bFGF stimuliert wurden, vermehrt EMMPRIN auf der Zelloberfläche dargestellt werden.
In der Immunpräzipitation (Abb. 5) und im Western Blot (Abb. 6) wurden ähnliche Ergebnisse erzielt . Auch mit diesen beiden Verfahren konnte nachgewiesen werden, dass auf der Zelloberfläche von Makrophagen, die mit TNF-α und IL1-β stimuliert wurden, weniger EMMPRIN vorhanden ist. TNF-α und IL-1β führten zu einer signifikanten Verringerung von membrangebundenem EMMPRIN um 38% ± 17% (TNF-α) und um 38% ± 23% (IL-1β).

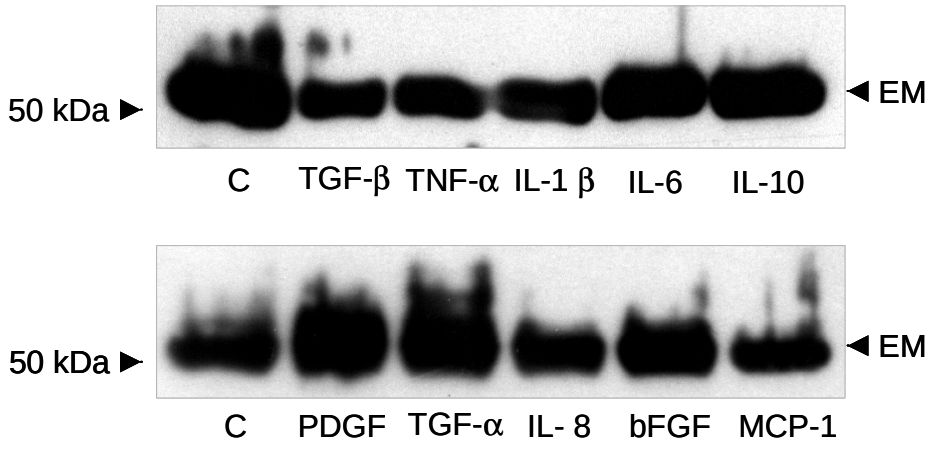

Abb. 5: Immunpräzipitation zum Nachweis des Effekts von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die Expression von membrangebundenem EMMPRIN. *Makrophagen wurden in serumfreiem Medium 48 h mit TGF-β (Transforming-Growth-*

Factor-β) (2 ng/ml), TNF-α (Tumor-Necrosis-Factor-α) (20 ng/ml), IL-1β (Interleukin-1β) (10 ng/ml), IL-6 (Interleukin-6) (2 ng/ml), F: IL-10 (Interleukin-10)(10 ng/ml), H: MCP-1 (Monocyte-Chemotactic-Protein-1) (50ng/ml), I: IL-8 (Interleukin-8) (5 ng/ml), J: TGF-α (Transforming-Growth-Factor-α) (20 ng/ml), K: PDGF (Platelet-Derived-Growth-Factor) (20 ng/ml) und L: bFGF (Basic-Fibroblast-Growth-Factor) (20 ng/ml) inkubiert. EM: EMMPRIN. C: Kontrolle.

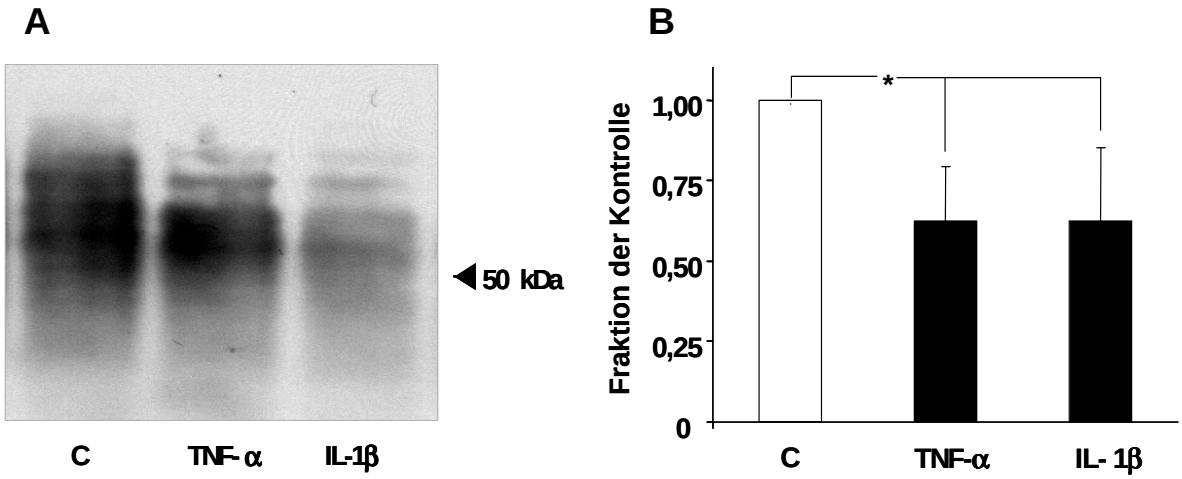

Abb. 6: Verringerung der Expression von membrangebundenem EMMPRIN durch die Entzündungsmediatoren TNF-α und IL-1β. *Makrophagen wurden in serumfreiem Medium über 48 h mit TNF-α (Tumor-Necrosis-Factor-α) (20 ng/ml) und IL-1β (Interleukin-1β) (10 ng/ml) inkubiert. C: Kontrolle. 48 Stunden später wurden die Kulturen gestoppt und die zellassozierten Proteine in RIPA (Radioimmune-Precipitation-Assay)-Puffer solubilisiert, mittels SDS-PAGE (Sodium-dodecyl-sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) separiert und durch einen monoklonalen EMMPRIN-Antikörper detektiert (A). (B): Densitometrische Quantifizierung und Berechnung von 2 Western Blots und 2 Immunpräzipitationen, Mittelwert ± SD, *: p< 0,05.*

3.2.2. Einfluss auf EMMPRIN im Zellkulturüberstand von Makrophagen

Um den Einfluss der Entzündungsmediatoren TNF-α und IL1-β auf die EMMPRIN Konzentration im Zellkulturüberstand von Makrophagen zu untersuchen, wurden die Überstände 24 h und 48 h nach Stimulation gesammelt und mittels TR-FIA gemessen. Überstände von Makrophagen die mit TNF-α und IL1-β stimuliert worden waren, zeigten sowohl nach 24 h als auch nach 48 h eine erhöhte EMMPRIN Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Die Stimulation mit IL1-β über 48 h führte zu einer signifikanten Steigerung der EMMPRIN Konzentration um 26 % ± 15 %.

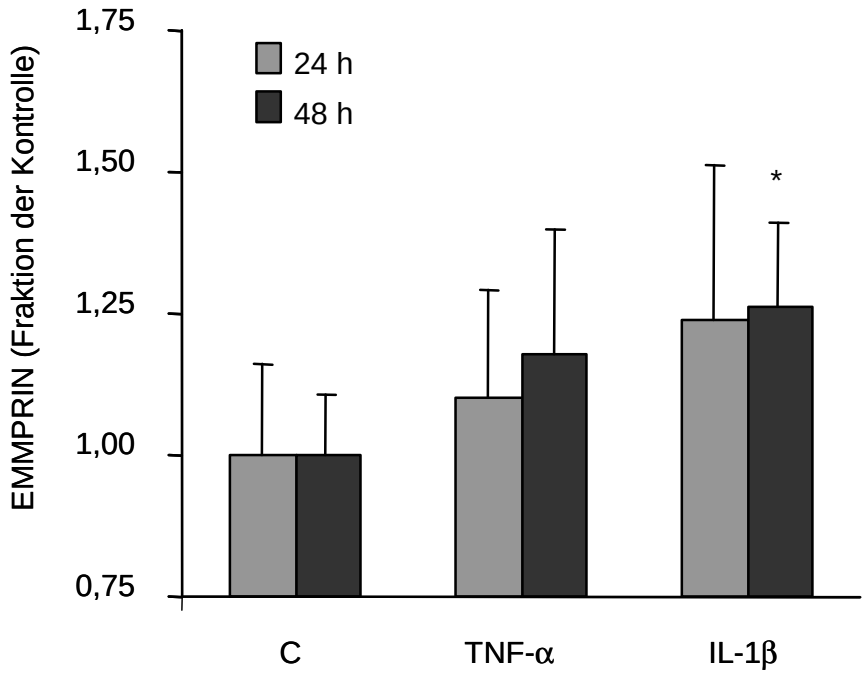

Abb. 7: Stimulation von EMMPRIN im Zellkulturüberstand kultivierter Makrophagen. *Die Makrophagen wurden in Abwesenheit von FCS (Fötales Kälberserum) kultiviert und mit 20 ng/ml TNF-α (Tumor-Necrosis-Factor-α) und 10 ng/ml IL-1β (Interleukin-1β) stimuliert. Die konditionierten Überstände wurden 24 h und 48 h nach Stimulation gesammelt. Die EMMPRIN Konzentration wurde mittels zeitaufgelöster Immunfluoreszenz gemessen. Der EMMPRIN Gehalt ist als Fraktion der Kontrolle angegeben (serumfreies Medium ohne Zusatz von Entzündungsmediatoren). C: Kontrolle. Mittelwert ± SD aus sechs unabhängigen Versuchen. *: $p < 0,05$.*

Weiterhin wurde gelöstes EMMPRIN aus Zellkulturüberstand mittels Western Blot dargestellt. Hierzu wurden die Zellen, wie oben beschrieben, stimuliert und die Überstände der kultivierten Makrophagen nach 48 h gesammelt und ankonzentriert. Wie aus Abb. 8 ersichtlich, konnte auch in diesem Verfahren durch Stimulation der Makrophagen mit Entzündungsmediatoren eine Steigerung von EMMPRIN im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. TNF-α führte zu einer signifikanten Erhöhung von EMMPRIN um 17 % ± 6 %. IL-1β führte zu einer signifikanten Erhöhung von EMMPRIN um 39 % ± 11%. Auch zwischen TNF-α und IL-1β bestanden signifikante Unterschiede.

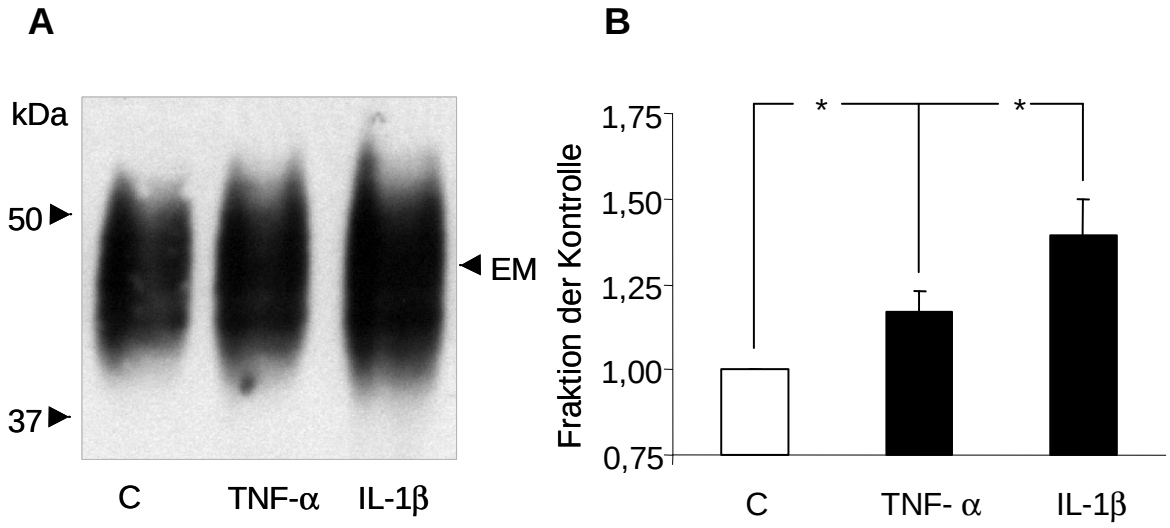

Abb. 8: Stimulation von EMMPRIN im Zellkulturüberstand von Makrophagen durch TNF-α und IL-1β. *Die Makrophagen wurden in serumfreiem Medium kultiviert und mit 20 ng/ml TNF-α (Tumor-Necrosis-Factor-α) und 10 ng/ml IL-1β (Interleukin-1β) stimuliert. C: Kontrolle. Die Zellkulturüberstände wurden nach Versuchsende gesammelt und ankonzentriert. EM: EMMPRIN wurde mittels Western Blot nachgewiesen (A). (B): Densitometrische Quantifizierung und Berechnung aus 4 Western Blots. Mittelwert ± SD. *: p<0,05.*

3.3 Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf mRNA-Synthese von EMMPRIN in Makrophagen

Um zu untersuchen, ob bei Makrophagen, die mit verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren stimuliert wurden, vermehrt EMMPRIN von den Zellen produziert wird, führten wir eine RT-PCR durch. Wie in Abb. 9 dargestellt, konnte weder nach 6 h noch nach 12 h eine Steigerung der mRNA- Synthese von EMMPRIN nachgewiesen werden. Die Steigerung durch TGF-α lässt sich durch einen einmaligen Ausreißer nach oben erklären. Die Stimulation konnte in keinem weiteren Versuch reproduziert werden.

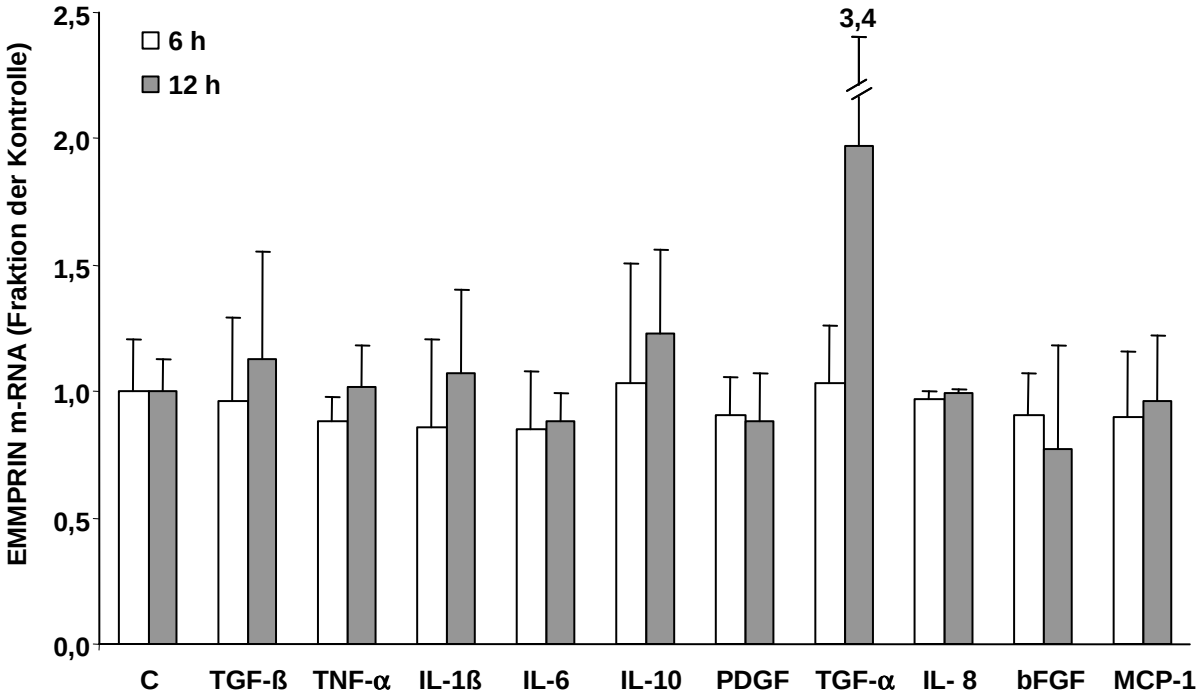

Abb. 9: Nachweis des Effekts von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die mRNA–Synthese von EMMPRIN in Makrophagen. *Kultivierte Makrophagen wurden mit 2 ng/ml TGF-β (Tumor-Growth-Factorβ), 20 ng/ml TNF-α (Tumor-Necrosis-Factor-α), 10 ng/ml IL-1β (Interleukin-1β), 2 ng/ml IL-6 (Interleukin-6), 10 ng/ml IL-10 (Interleukin-10), 20 ng/ml PDGF (Platelet-Derived-Growth-Factor), 20 ng/ml TGF-α (Transforming-Growth-Factor-α), 5 ng/ml IL-8 (Interleukin-8), 20 ng/ml bFGF (Basic-Fibroblast-Growth-Factor) und 50 ng/ml MCP-1 (Monocyte-Chemotactic-Protein-1) stimuliert. m-RNA: messenger-Ribonukleinsäure. Die Überstände wurden verworfen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit high pure RNA isolation kit lysiert. Mittelwert ± SD aus n= 3 (1) Versuchen.*

3.4 Einfluss von MMPs auf die Expression von membrangebundenem und löslichem EMMPRIN durch Makrophagen.

Um die Möglichkeit zu untersuchen, dass bei der Regulation der Expression von EMMPRIN und MMPs ein positiver Rückkopplungsmechanismus besteht, sollte die Wirkung von MMPs auf die Expression von membrangebundenem EMMPRIN und EMMPRIN im Überstand kultivierter Makrophagen untersucht werden. Hierzu sollten Versuchsbedingungen hergestellt werden, in denen unterschiedliche Aktivitätsniveaus von MMPs zu finden waren.

Zur Verringerung der Aktivität der MMPs wurde einem Teil der Zellen bei Stimulationsbeginn EDTA (Abb. 10 linkes Bild, Abb. 11 D, E, F) hinzugegeben. Bei diesen Zellen zeigte sich auf der Zelloberfläche mehr EMMPRIN als bei der Vergleichsgruppe. Die Zugabe von TNF-α und IL-1β zu kultivierten Makrophagen erhöhte die MMP-2 und MMP-9 Synthese (Abb.1-3) und reduzierte die EMMPRIN Expression auf der Zelloberfläche. Im Gegensatz hierzu wiesen Zellen, die mit EDTA inkubiert worden waren, auf der Zelloberfläche mehr EMMPRIN auf.

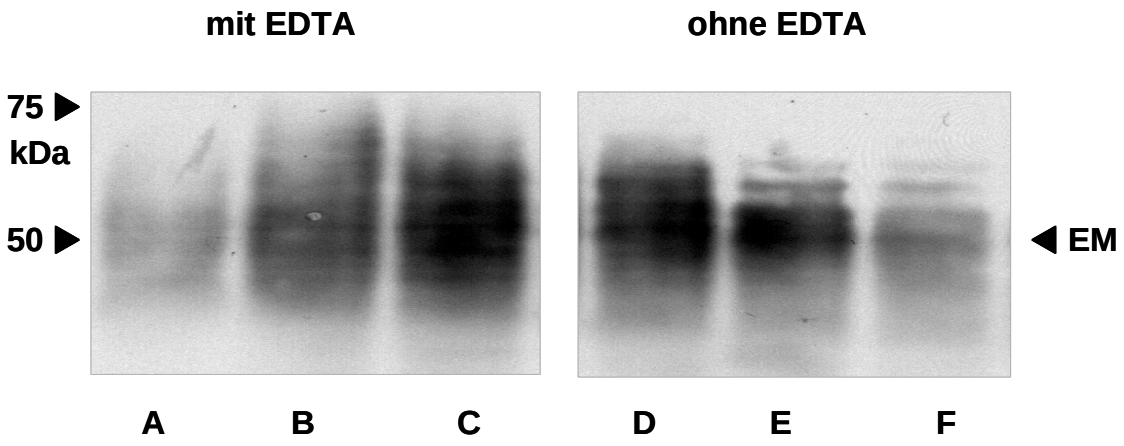

Abb. 10: Verminderte Expression von EMMPRIN auf der Zelloberfläche durch Verringerung der Aktivität von Matrixmetalloproteinasen. *Kultivierten Makrophagen wurde in Abwesenheit von FCS (Fötales Kälberserum) entweder 20 ng/ml TNF-α (Tumor-Necrosis-Factor-α), (B, E) oder 10 ng/ml IL-1β (Interleukin-1β) (C, F) zugegeben. Nach 6 h wurde einem Teil der Zellen 250 µM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) hinzugegeben (A, B, C). 48 Stunden später wurden die Kulturen gestoppt und die zellassozierten Proteine in RIPA-Puffer (Radioimmune precipitation assay-Puffer) solubilisiert, mittels SDS-PAGE (Sodium-dodecyl-sulfate- Polyacrylamid Gelelektrophorese) separiert und durch einen monoklonalen EMMPRIN-Antikörper detektiert. Kontrolle A, D. EM: EMMPRIN.*

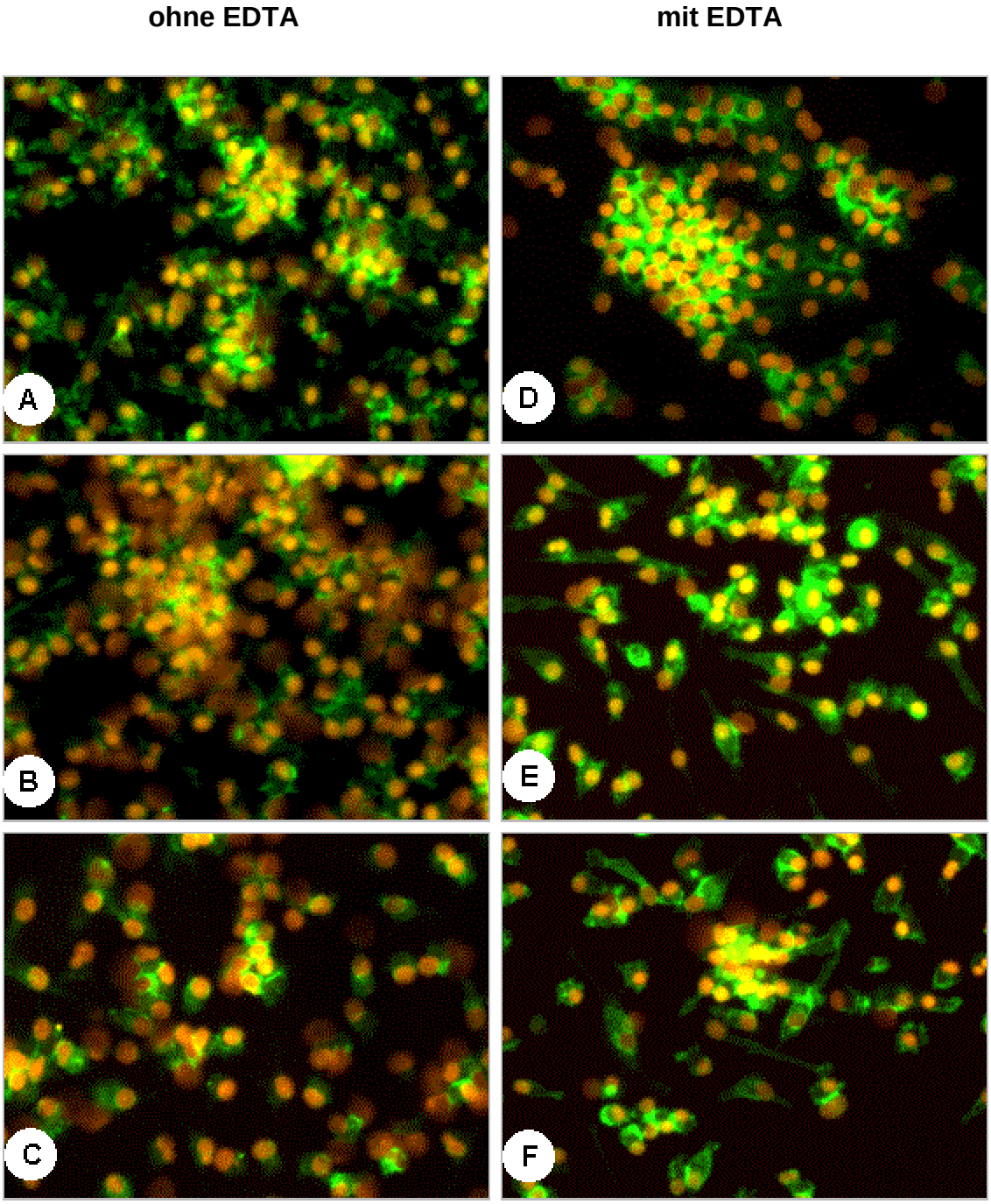

Abb. 11: Effekt von Matrixmetalloproteinasen auf die Expression von zellgebundenem EMMPRIN. *Immunfluoreszenzfärbung von Makrophagen, die über 48 h ohne FCS (Fötales Kälberserum) mit B/E: TNF-α (Tumor-Necrosis-Factor-α) (20 ng/ml) und C/F: IL-1β (Interleukin-1β) (10 ng/ml) stimuliert wurden. A/D dienten als Kontrolle. 6 h nach Stimulationsbeginn wurde einem Teil der Zellen (D, E, F) zur Verringerung der Aktivität der Matrixmetalloproteinasen 750 µM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) zugegeben. Die Immunfluoreszenzfärbung der Makrophagen zeigt EMMPRIN v.a. auf der Zelloberfläche (FITC, grün). Die Kerne wurden mit Propidiumjodid gegengefärbt (rot).*

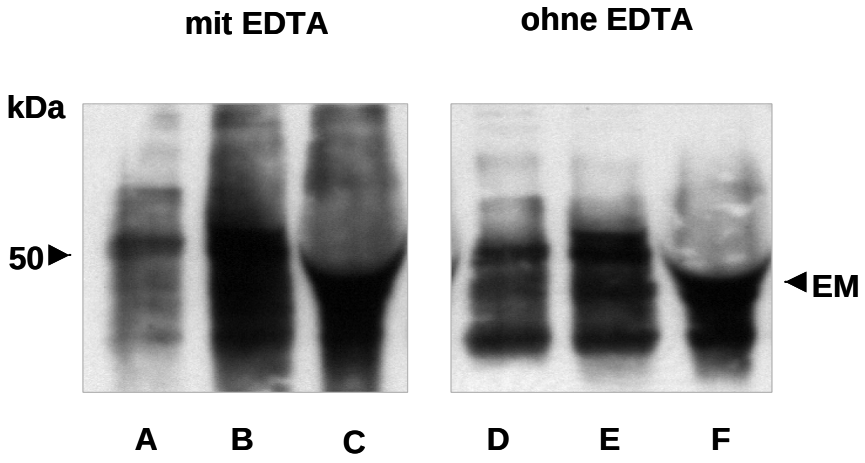

Abb. 12: Effekt von EDTA auf die Expression von EMMPRIN im Zellkulturüberstand von Makrophagen. *Makrophagen wurden in Abwesenheit von Serum über 48 h mit TNF-α (Tumor-Necrosis-Factor-α) (B, E) und IL-1β (Interleukin-1β) (C, F) inkubiert. 5 h nach Stimulationsbeginn wurde einem Teil der Zellen zur Verringerung der Aktivität der Matrixmetalloproteinasen 250 µM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) hinzugefügt (A, B, C). Die Zellkulturüberstände wurden nach Versuchsende gesammelt und ankonzentriert. EM: EMMPRIN wurde mittels Western Blot nachgewiesen.*

Im Überstand von Zellen, die mit EDTA, TNF-α und IL-1β stimuliert wurden, war vermehrt EMMPRIN zu finden.
In diesem Experiment konnte weiterhin festgestellt werden, dass membrangebundenes EMMPRIN ein höheres Molekulargewicht aufweist als EMMPRIN im Zellkulturüberstand (Abb. 10 und Abb. 12).

Zur Verifizierung der Ergebnisse, die bei Stimulation mit EDTA gefunden wurden, wurde im folgenden Experiment zur Verringerung der Aktivität von Matrixmetalloproteinasen der MMP-Inhibitor (Ilomastad 25 µM) zugegeben. Die Hemmung der MMPs führte zu einer deutlichen Reduktion der Expression von EMMPRIN im Zellkulturüberstand und zu einer Erhöhung von EMMPRIN auf der Oberfläche von Makrophagen.

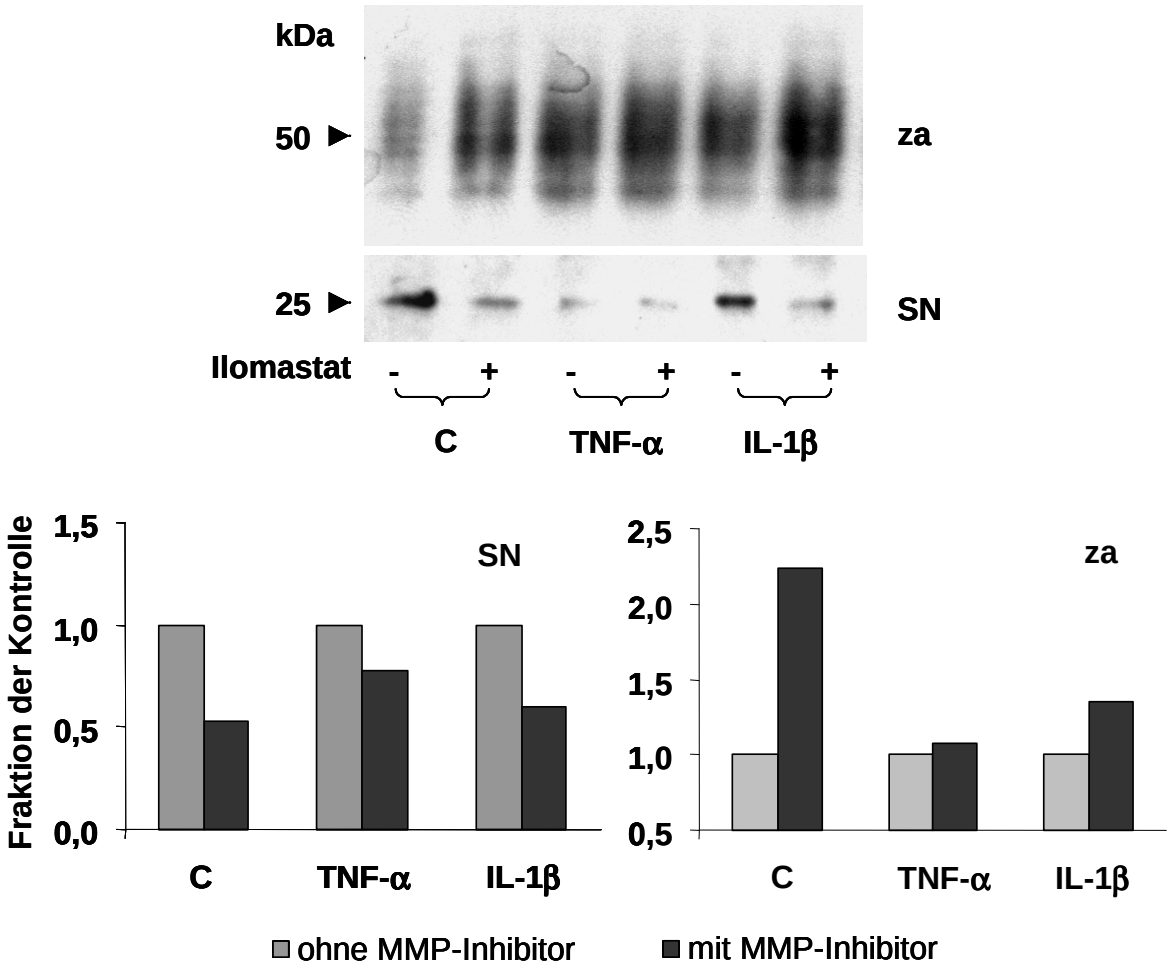

Abb. 13 Verringerung der Abspaltung von membrangebundenem EMMPRIN durch Hemmung von MMPs (Matrixmetalloproteinasen). *Makrophagen wurden in serumfreien Medium kultiviert. 2 h vor Stimulation der Zellen mit 20 ng/ml TNF-α (Tumor-Necrosis-Factor-α) und 10 ng/ml IL-1β (Interleukin-1β) wurde einem Teil der Zellen zur Hemmung der MMP-Aktivtät 25 µM Ilomastat hinzugefügt. C: Kontrolle. Die Kultur wurde nach 48 h gestoppt, die Zellen lysiert und die Überstände ankonzentriert. EMMPRIN wurde mittels Western Blot nachgewiesen Oberes Bild: dicke Banden: Membrangebundenes EMMPRIN (za: zellassoziiert), dünne Banden: EMMPRIN im Überstand (SN: Überstand). Unten rechts: Densitometrische Quantifizierung und Berechnung von membrangebundenem EMMPRIN. Unten links: Densitometrische Quantifizierung und Berechnung von EMMPRIN im Überstand. Dargestellt ist ein Ergebnis von n = 3(1) Versuchen.*

Zur Erhöhung der Aktivität der MMPs wurde Makrophagen MMP-2 und MMP-9 in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Wie in Abb. 14 und Abb. 16 dargestellt ist, führte die Zugabe von MMP-2 zu einer deutlichen Steigerung von EMMPRIN im Zellkulturüberstand von Makrophagen. Bereits nach zwölf Stunden kam es bei einer MMP-2 Konzentration von 0,1µg/ml zu einer Erhöhung von EMMPRIN im Überstand
Wie Abb. 16 zeigt, konnte im TR-FIA nach 12 h eine signifikante 6,1-fache und nach 24 h eine signifikante 4,72-fache Steigerung von EMMPRIN im Überstand nachgewiesen werden. Im Gegenzug hierzu fand sich bei Zellen, die mit einer Konzentration von 0,1 µg/ml MMP-2 stimuliert wurden im Vergleich zur Kontrolle auf der Zelloberfläche deutlich weniger EMMPRIN (siehe Abb. 14 und Abb.15).

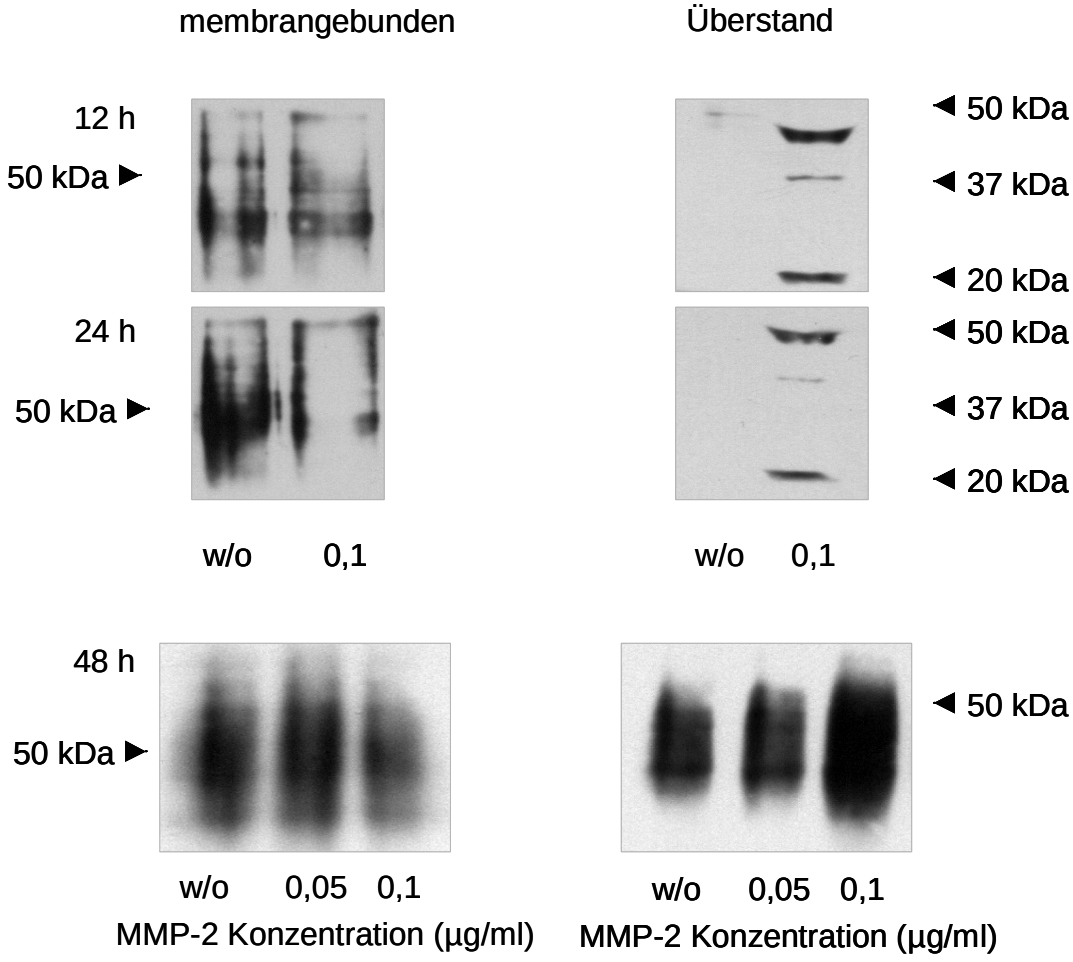

Abb. 14: Abspaltung von membrangebundenem EMMPRIN durch MMP-2. *Makrophagen wurden über 12 h, 24 h und 48 h mit 0,05 µg/ml und 0,1 µg/ml MMP-2 stimuliert. Die Überstände wurden nach Versuchsende ankonzentriert. EMMPRIN wurde mittels Western Blot nachgewiesen. w/o: Kontrolle, ohne Zusatz von MMPs. MMP: Matrixmetalloproteinase.*

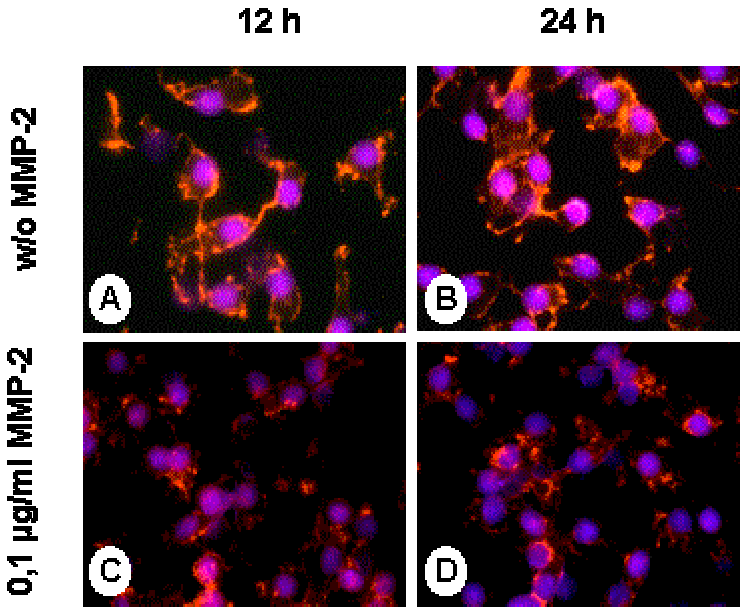

Abb. 15: Effekt von MMP-2 auf die Expression von oberflächenassoziiertem EMMPRIN. *Immunfluoreszenzfärbung von Makrophagen, die über 12 h (A, C) und 24 h (B, D) in serumfreiem Medium mit MMP-2 (0,1 µg/ml) (C, D) stimuliert wurden. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigt EMMPRIN auf der Zelloberfläche (rot). Die Kerne wurden mit bisBenzimid gegengefärbt. MMP: Matrixmetalloproteinase. w/o: Kontrolle.*

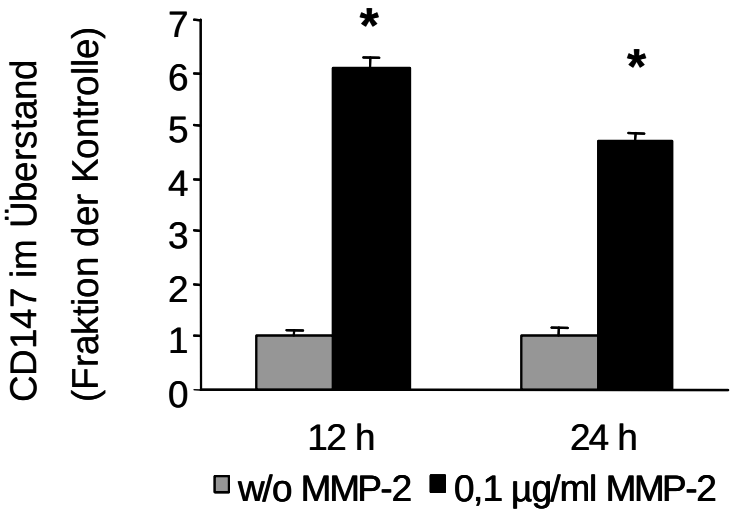

Abb. 16: Steigerung von EMMPRIN im Überstand nach Stimulation mit MMP-2. *Zeitaufgelöster Immunfluoreszenzassay zum Nachweis von EMMPRIN im Zellkulturüberstand von Makrophagen, die über 12 h und 24 h in serumfreiem Medium mit 0,1 µg/ml MMP2 stimuliert wurden. MMP: Matrixmetalloproteinase. w/o: Kontrolle. Mittelwert ± SD aus n = 2(2) Versuchen.*: p<0,05.*

Die Stimulation mit 0,1 µg/ml MMP-9 führte ähnlich wie die Stimulation mit MMP-2 zu einer Erhöhung von EMMPRIN im Überstand und einer Erniedrigung von membrangebundenem EMMPRIN.

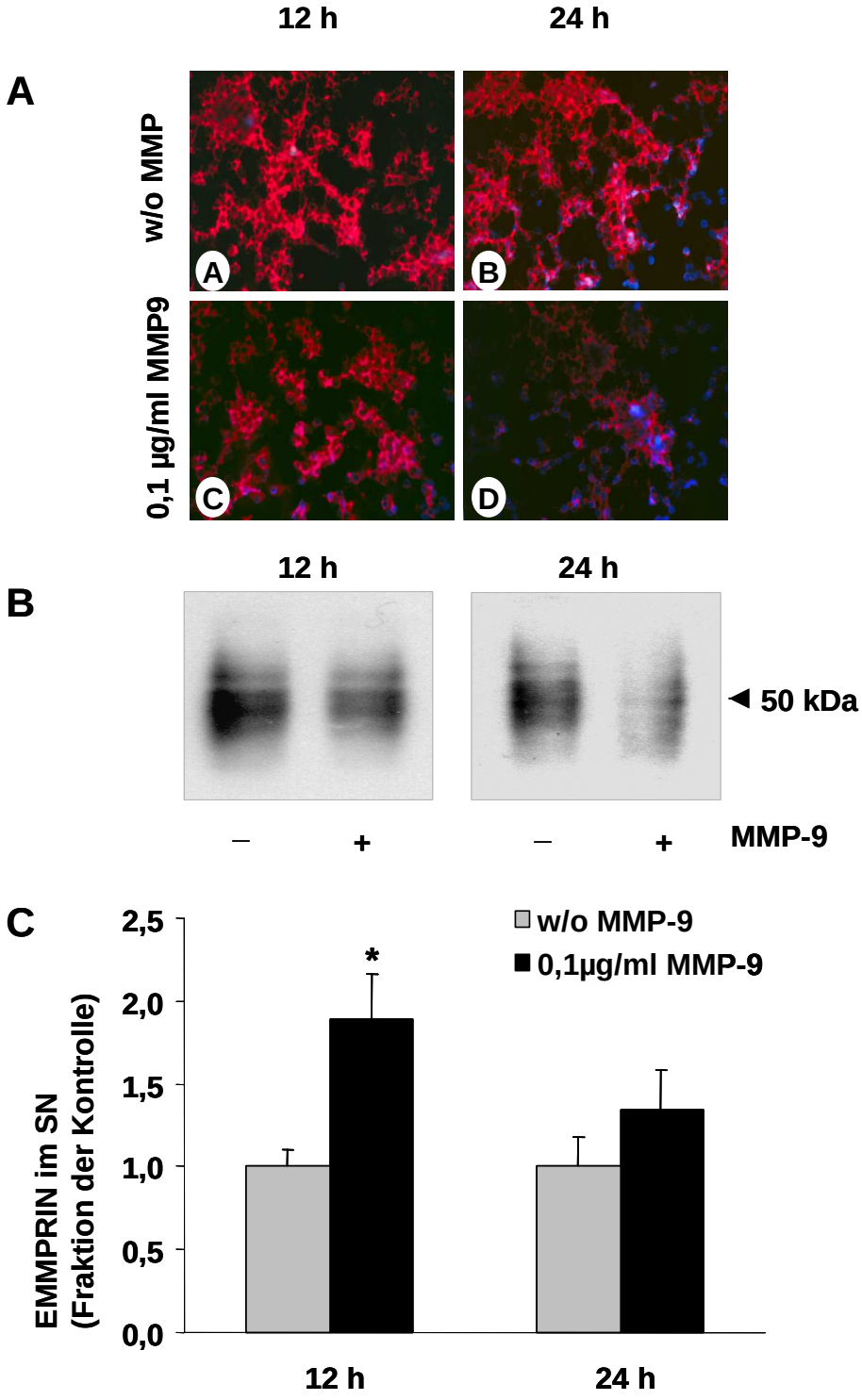

Abb. 17.: Abspaltung von membrangebundenem EMMPRIN durch MMP-9. *Bild A: Immunfluoreszenzfärbung von Makrophagen, die über 12 h und 24 h in serumfreiem Medium mit 0,1 µg/ml MMP-9 stimuliert wurden. Die Färbung zeigt EMMPRIN auf der*

*Zelloberfläche (rot). Die Kerne wurden mit bisBenzimid gegengefärbt. Bild B: Western Blot von membrangebundem EMMPRIN. Bild C: Zeitaufgelöster Immunfluoreszenzassay zum Nachweis von EMMPRIN im Überstand (SN) von Makrophagen. MMP: Matrixmetalloproteinase. w/o: Kontrolle. Mittelwert und SD, n= 6; *: p<0,05.*

Die Zugabe von 0,1 µg/ml MMP-9 erhöhte die EMMPRIN-Konzentration im Zellkulturüberstand innerhalb von 12 h um 89% ± 27%. Nach 24 h war noch eine Steigerung von 34% ± 24% nachweisbar.

In einem weiteren Versuch wurde membrangebundenes EMMPRIN aus Zelllysat und lösliches EMMPRIN aus Zellkulturüberstand von Makrophagen isoliert. Das membrangebundene EMMPRIN wurde in vitro ohne Zellen in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit aktivierten MMP-1, MMP-2 und MMP-9 2 h bei 37°C inkubiert. Das Zelllysat und der Überstand wurden nach der Inkubation mit den genannten MMPs zur Deglykosylierung 4 h mit F-Glykosidase inkubiert. Durch Western Blot Analyse zeigte sich, dass membrangebundenes EMMPRIN sowohl in der glykosylierten als auch in der degyklosylierten Form ein höheres Molekulargewicht aufweist, als EMMPRIN im Überstand (Abb. 18). Nach Inkubation des Zelllysats mit MMP-1, MMP-2, MMP-9 und Endoglykosidase stellten sich EMMPRIN Banden bei 28 kDa und bei 20 kDa dar. Deglykosyliertes EMMPRIN im Überstand besitzt ebenfalls ein Molekulargewicht von 20 kDa (Abb. 18 A Spur 2). Deglykosyliertes EMMPRIN ohne eine Inkubation mit MMPs zeigte ein Molekulargewicht von 28 kDa (Abb. 18 A Spur 10). Die Membranen wurden sowohl mit einem EMMPRIN Erstantikörper inkubiert, der das N-terminale Ende erkennt (Abb. 18A: N-terminal poly- und monoclonal Ab, R&D), als auch einem Erstantikörper, der nur das C-terminale Ende (Abb. 18B: C-terminal Ab, Santa Cruz) erkennt. Hierbei zeigte sich, dass die 20 kDa große Bande nur mit Antikörper, der gegen den N-Terminus gerichtet ist, detektiert werden konnte. Weiterhin zeigte sich, dass nach Inkubation mit MMP-9 deutlich mehr dieser 20 kDa großen Form nachweisbar war, als nach Inkubation mit MMP-1 und MMP-2. Bei der Isolation von EMMPRIN aus Makrophagenüberständen mittels Anionen-Austausch-Chromatographie konnten sowohl eine hydrophile (80%) als auch eine hydrophobische (20%, (mit 0,1% Triton herausgelöst) EMMPRIN-enthaltende Fraktion extrahiert werden. Das EMMPRIN aus der hydrophilen Fraktion besaß glykosyliert ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa und unglykosyliert von 20 kDa.

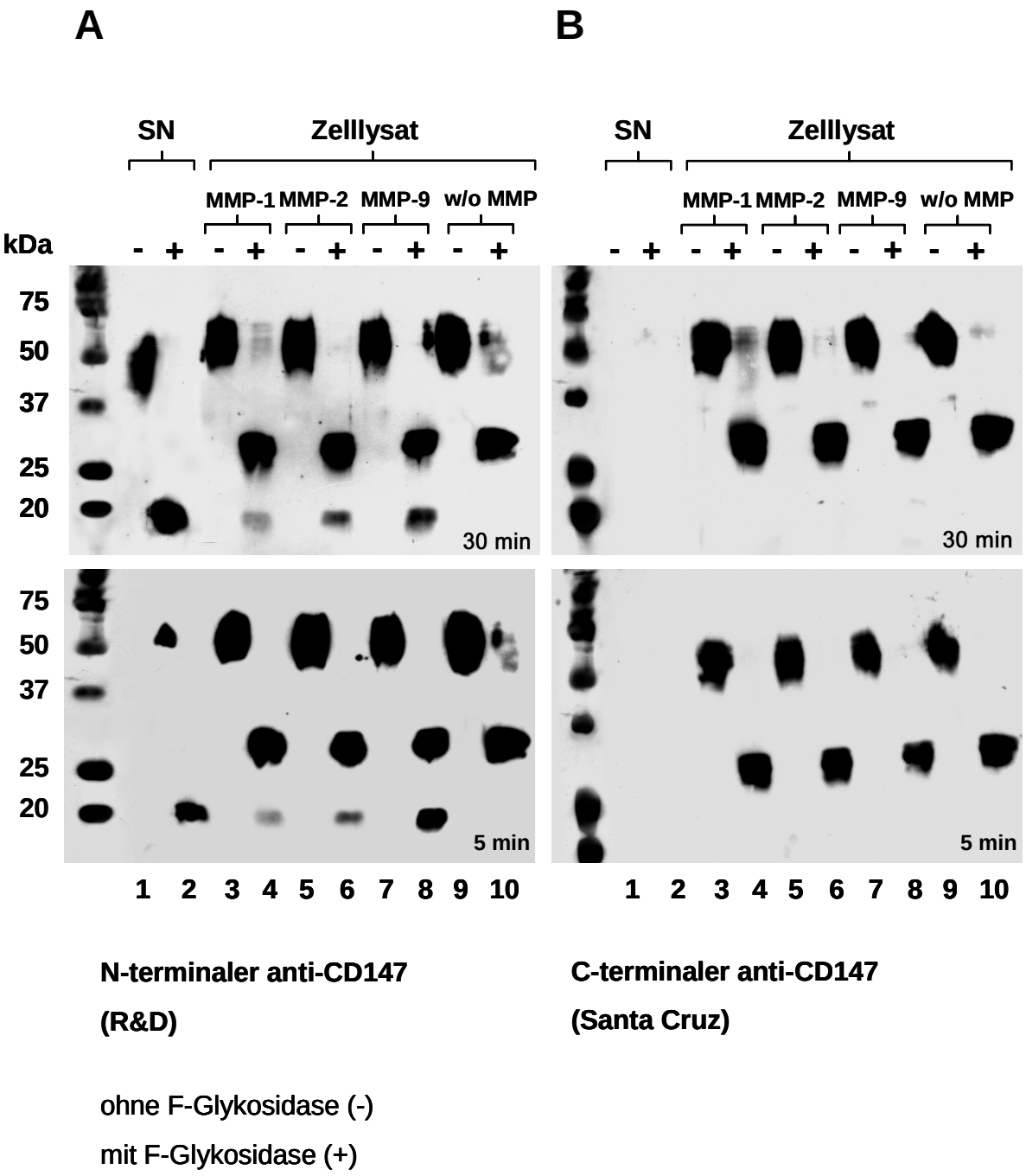

Abb. 18: Abspaltung von membrangebundenem EMMPRIN durch MMPs (Matrixmetalloproteinasen). *EMMPRIN wurde aus Zelllysat und Überstand (SN, supernatant) von Makrophagen isoliert. Das membrangebundene EMMPRIN wurde in Eppendorf-Tubes mit aktivierter MMP-1, MMP-2 und MMP-9 (0,1 µg/ml) 2 h bei 37°C inkubiert. w/o: ohne MMPs. Zelllysat und Überstand wurden zur Deglykosylierung nach Inkubation mit MMPs über 4 h mit F-Endoglykosidase inkubiert. Danach wurden die Membranen mit N-terminalen oder C-terminalen Antikörpern inkubiert. 5 und 30 Minuten Entwicklungszeit. (Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Herrn F. Diaz durchgeführt).*

3.5 Interaktion von Makrophagen und humanen koronaren glatten Muskelzellen

Um den Einfluss von EMMPRIN, das von kultivierten Makrophagen stammt, auf die Synthese von MMPs in koronaren glatten Muskelzellen zu untersuchen, wurden folgende Experimente durchgeführt.

Synthese von MMPs von hcSMCs unter dem Einfluss von Zellkulturüberständen von Makrophagen.

Um die Synthese der MMP-2 durch hcSMCs zu quantifizieren, wurden die Überstände der hcSMCs 48 h nach Zugabe der Makrophagen-Überstände mittels FIA gemessen. Unter der Zugabe von Makrophagen-Überständen wurde die MMP-2 Synthese um maximal 47% ± 13% (200 µl Ma-SN/well mit 10 ng/ml IL-1β) gesteigert. Glatte Muskelzellen, die mit Makrophagen-Überständen stimuliert wurden, die zuvor mit TNF-α oder IL-1β inkubiert worden waren, zeigten eine höhere MMP-2 Synthese als hcSMCs, die mit unstimulierten Makrophagen-Überständen inkubiert worden waren.

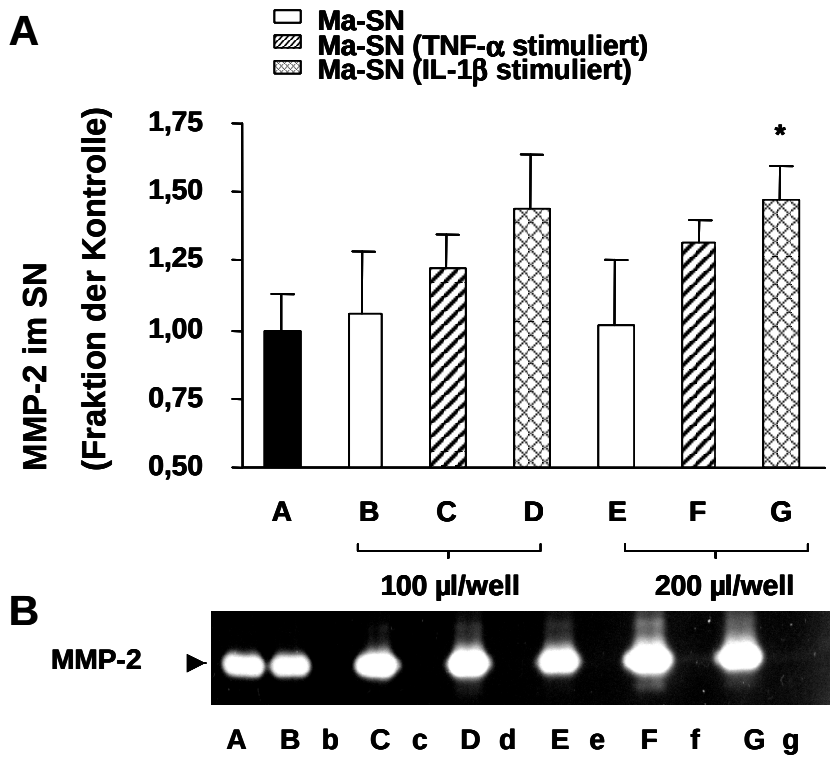

Abb 19: Steigerung der MMP-2 Synthese von hcSMCs nach Stimulation mit Zellkulturüberständen von Makrophagen. *HcSMCs (humane koronare glatte Gefäßmuskelzellen) wurden mit 100 und 200 µl/well Makrophagenüberständen (SN, supernatant) kultiviert. Abb. 19A: Fluoreszenzimmunassay zum Nachweis der MMP-2 (Matrixmetalloproteinase-2). Mittelwert ± SD aus 4 unabhängigen Versuchen.*

**: p<0,05. Abb. 19B: Zymographie. A: SMC Kontrolle, B: SMC+100 µl unstimuliertem Makrophagen-SN. C: SMC+100 µl Makrophagen-SN mit 20 ng/ml TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) stimuliert, D: SMC + 100 µl Makrophagen mit 10 ng/ml IL-1β (Interleukin-1β) stimuliert, E: SMC+200 µl unstimuliertem Makrophagen-SN. F: SMC+200 µl Makrophagen-SN mit 20 ng/ml TNF-α stimuliert, G: SMC + 200 µl Makrophagen mit 10 ng/ml IL-1β stimuliert. (b c, d): Makrophagen-Überstand 1:20 verdünnt (e, f, g): Makrophagen-Überstand 1:10 verdünnt.*

Die Stimulation von glatten Muskelzellen mit Zellkulturüberständen von Makrophagen führte zu einer Steigerung der MMP-2 (Abb.19) und der MMP-9 Synthese (Abb.20).

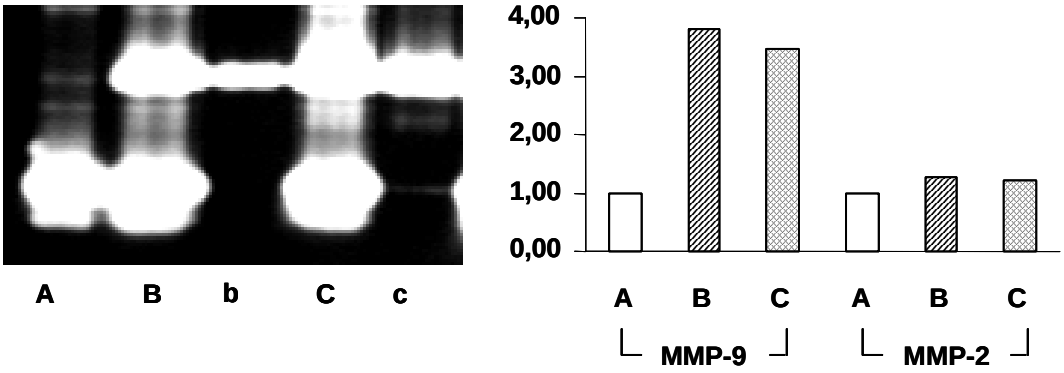

Abb. 20: Stimulation von MMPs im Überstand von hcSMCs durch Zugabe von Makrophagenüberständen. *Linkes Bild: hcSMCs (humane koronare glatte Gefäßmuskelzellen) wurden 100 µl (B) sowie 200 µl (C) Makrophagen-Überstände zugegeben und 48 h lang in Abwesenheit von FCS (Fötales Kälberserum) inkubiert. A: Kontrolle. Die Zellkulturüberstände wurden mittels Zymographie analysiert. b: Makrophagen-Überstand 1:20 verdünnt, c: Makrophagen-Überstand 1:10 verdünnt. Rechtes Bild: Densitometrische Quantifizierung der MMP-9 und MMP-2. MMP: Matrixmetalloproteinase.*

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob der MMP steigernde Effekt durch Stimulation mit EMMPRIN zustande kommt. Hierzu wurde EMMPRIN mittels Immundepletion aus dem Makrophagenüberstand entfernt.
Überstände, die EMMPRIN enthielten, führten im Vergleich zu den immundepletierten Überständen zu einem stärkeren MMP-Anstieg.

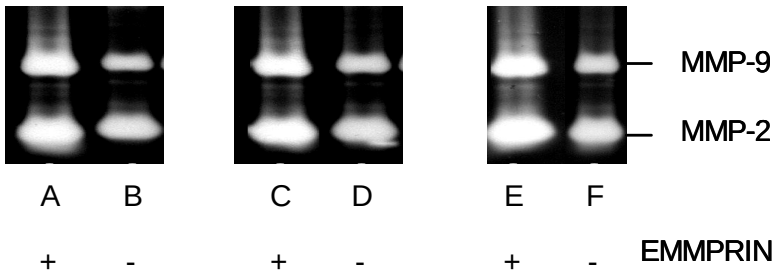

Abb. 21: Stimulation von MMPs im Überstand von hcSMCs (humane koronare glatten Gefäßmuskelzellen) durch Zugabe von EMMPRIN enthaltenden Makrophagenüberständen. *Die hcSMCs wurden über 48 h mit Makrophagen-Überständen, die zuvor mit TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) (C,D) und IL-1β (Interleukin-1β) (E,F) stimuliert worden waren, inkubiert. Bei einem Teil der Überstände ist EMMPRIN mittels Immundepletion zuvor entfernt worden (B,D,F). MMP: Matrixmetalloproteinase.*

Weiterhin wurde aus Makrophagenüberständen isoliertes EMMPRIN in verschiedenen Konzentrationen (10-50 ng/ml) zu kultivierten hcSMCs gegeben. Die Zugabe von EMMPRIN führte zu einer signifikanten Steigerung der MMP-1 bei 20, 30 und 40 ng/ml EMMPRIN, der MMP-2 bei 20 ng/ml EMMPRIN und der MMP-9 bei 50 ng/ml EMMPRIN im Zellkulturüberstand von hcSMCs.

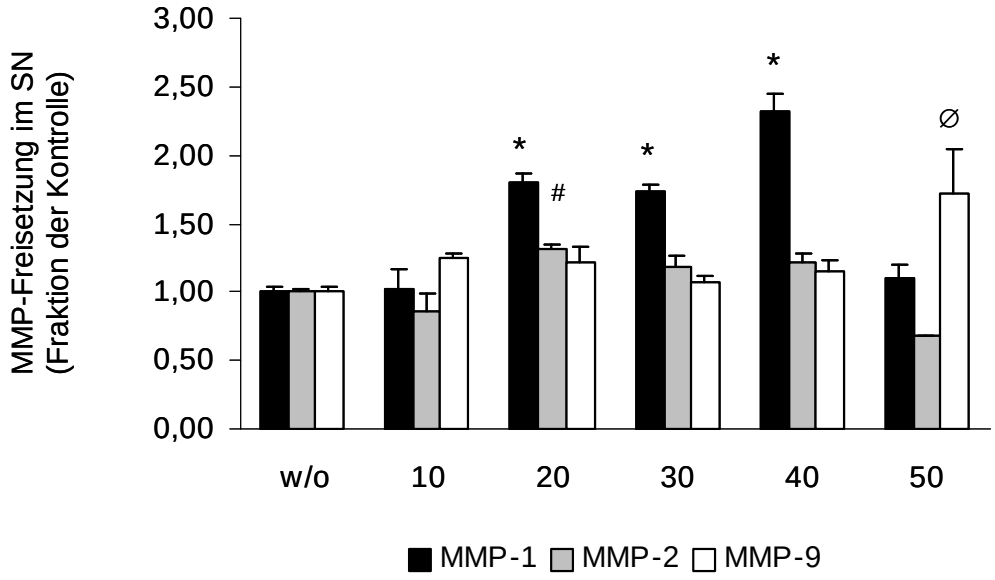

Abb. 22: Gesteigerte Freisetzung von MMPs nach Stimulation mit isoliertem Makrophagen-EMMPRIN. *MMP-1, MMP-2 und MMP-9 Freisetzung nach 48-stündiger Inkubation von hcSMCs mit isoliertem Makrophagen-EMMPRIN. Die MMP-1 und MMP-9 Konzentrationen wurden mittels ELISA, die Konzentration der MMP-2 mittels TR-FIA gemessen. Die MMP-Konzentration wurde an den DNA-Gehalt der Zellen in den*

*entsprechenden Wells angeglichen. Mittelwert ± SEM als Fraktion der Kontrolle. MMP-1: n = 3, MMP-2: n = 4, MMP-9: n = 2. *,#,∅: p<0,05. MMP: Matrixmetalloproteinase. SN : Überstand.*

Kokultur von Makrophagen und hcSMCs

Verglichen mit der hcSMCs- Monokultur zeigte sich in der Kokultur von hcSMCs mit Makrophagen verstärkte Expression der MMP-2 und MMP-9.

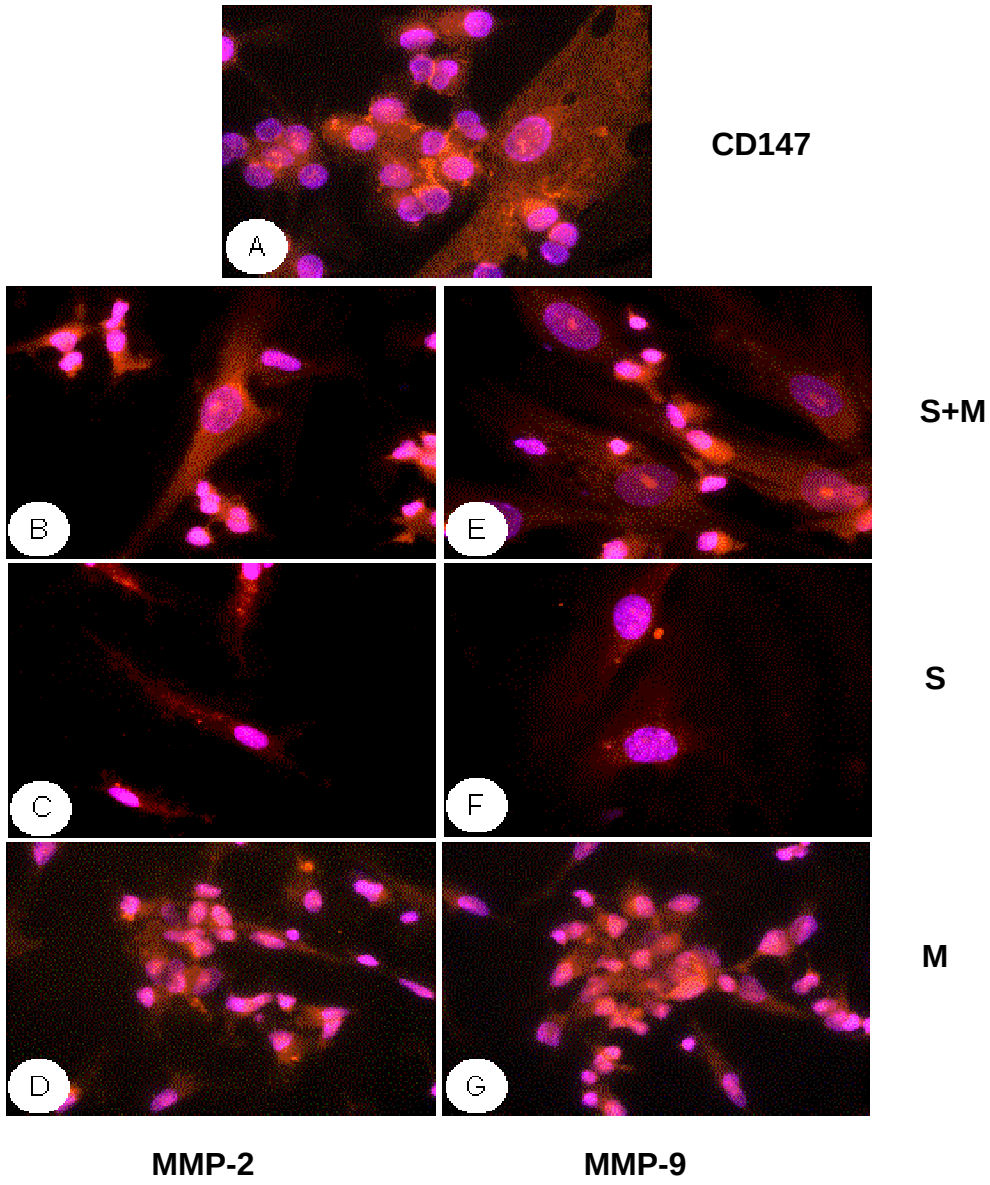

Abb. 23: Steigerung der MMP-Synthese bei koronaren glatten Muskelzellen (hcSMCs) durch Cokultur mit Makrophagen. *Immunfluorenszenzfärbung zum Nachweis von EMMPRIN (CD147), MMP-2 und MMP-9 rot (Alexa-red). S: hcSMCs, M: Makrophagen. A: Cokultur, EMMPRIN (rot). B, C, D: MMP-2 Färbung. E, F, G: MMP-9 Färbung. B und E: Cokultur. C und F: hcSMC Monokultur. D und G: Makrophagen Monokultur. MMP: Matrixmetalloproteinase.*

4. Diskussion

Die Komplikationen der Koronarsklerose wie z.B. akuter Myokardinfarkt und plötzlicher Herztod sind in erster Linie durch eine gesteigerte Plaqueinstabilität und nachfolgende Ruptur bedingt [7, 12, 13, 43, 85]. Die instabilen vulnerablen Plaques sind durch einen prominenten Lipidkern, eine Ausdünnung der fibrösen Kappe und durch von Makrophagen induzierte Entzündungsprozesse gekennzeichnet [42, 85]. Prädilektionsstelle für eine Ruptur ist die makrophagen-reiche Schulterregion der atherosklerotischen Plaque [42]. In dieser Region besteht ein Ungleichgewicht zwischen Matrixsynthese durch hcSMCs und Degradation von Kollagen durch MMP-synthetisierende Makrophagen. In atherosklerotischen Plaques zeigen Makrophagen eine verstärkte Expression von EMMPRIN [11, 20, 41, 47]. Da EMMPRIN die Synthese von MMPs induziert [4, 31, 37, 87], könnte EMMPRIN zu einer Entwicklung der Plaqueinstabilität beitragen. In dieser Arbeit wurde deshalb die Regulation der EMMPRIN-Expression durch Makrophagen und seine Rolle bei der Induktion von MMPs in Makrophagen und hcSMCs untersucht. Hierfür war es zunächst erforderlich Makrophagen für die Zellkultur zu gewinnen.

4.1 Isolierung und Kultivierung von Makrophagen

Üblicherweise werden Monozyten mittels Dichtegradient-Zentrifugation isoliert und anschließend durch Immunaffinität und Adherenz an spezifische Oberflächenproteine oder nach Zellgröße aufgereinigt. Danach reifen isolierte Monozyten mit Hilfe von Wachstumsfaktoren wie GM-CSF, IL-3 und M-CSF zu Makrophagen [46, 47]. Die Anfärbung der unspezifischen Esterase, trägt zur Erleichterung der teilweisen schweren Unterscheidung von Monozyten und Lymphozyten bei [64]. Häufige Probleme bei der Isolierung sind z.B. eine niedrige Zellausbeute, die Kontamination mit anderen Leukozyten und oft wechselnde Blutspender. Eine ideale Methode, die zugleich einfach ist, zu einer großen Reinheit führt und eine hohe Ausbeute besitzt, existiert nicht. Die beste Makrophagen-Ausbeute erzielten Lopez et al., wenn sie mononukleäre Zellen anstelle von aufgereinigten Monozyten in Teflon-Säckchen aussäten [46]. In unserem Kultivierungssytem wurden die mononukleären Zellen nach der Dichtegradient-Zentrifugation für 7-10 Tage ohne weitere Aufreinigung in Anwesenheit autologer Lymphozyten und Thrombozyten in Biofolie Säckchen kultiviert, was vorteilhaft ist, da Lymphozyten und Thrombozyten, z.B. durch Sekretion von INF-γ, eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Reifung von Monozyten spielen und autologe Lymphozyten den

Zelltod von Monozyten während der Kultur vermeiden [46]. Ein weiterer Vorteil dieses Kultivierunssystems ist, dass zum Ablösen der Zellen aus den Biofolie-Säckchen keine Trypsinierung erforderlich ist, was einen weiteren Zellverlust vermeidet und das Verfahren vereinfacht. In unserem Kultivierungssystem wurden die Makrophagen nach der Aussaat in Zellkulturplatten durch Anhaftung an Fibronektin aufgereinigt, da Makrophagen bevorzugt auf fibronektin-gecoateten Oberflächen im Vergleich mit Laminin oder anderen Komponenten der ECM [65, 79] adherieren. Nicht anhaftenden Thrombozyten und Lymphozyten wurden nach 1-1/2 h durch Waschen der Platten mit Medium entfernt. Fibronektin wurde als Schlüsselkomponente in der Förderung der Zelladhäsion, Ausbreitung und zahlreichen anderen Funktionen der Makrophagen identifiziert. [65, 79]**.** Deshalb stellt unser Kultursystem ein relativ zuverlässiges Model zur Studie des Makrophagenverhaltens dar.

4.2 Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf Makrophagen

4.2.1. Einfluss auf MMPs

Assoziiert mit den Entzündungvorgängen in der atherosklerotischen Plaque ist die Expression von MMPs durch Makrophagen und hcSMCs. In Atheromen wurde eine Überexpression von Gelatinasen (MMP-9, MMP-2) [14-16], interstitieller Kollagenasen (MMP-1, MMP-13, MMP-18) [24, 42], Stromelysinen (MMP-3, MMP-11) [15, 63, 75], MMP-12 [48], MT1-MMP [56] und MT3-MMP [75] beobachtet. Viele physiologische Regulatoren der MMP-Produktion, die identifiziert wurden, sind lösliche Faktoren, wie Zytokine und Wachstumsfaktoren [15, 35, 40, 42, 45, 55, 75]. Die proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-1β wurden in atherosklerotischen Läsionen gefunden [42]. Sie begünstigen epitheliale Dysfunktionen [83] und induzieren die Expression der MMP-9 in menschlichen Makrophagen, dagegen kaum die der MMP-1 und der MMP-3 [61, 84].

Wir konnten in dieser Arbeit die bekannten Befunde bestätigen, dass TNF-α und IL-1β zu einer signifikanten Steigerung der MMP-9 und MMP-2 Synthese sowie deren Aktivierung führen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass TGF-ß die Expression der MMP-9 und MMP-2 induziert. Dies könnte indirekt auf einer Steigerung der Induktion von IL-1ß begründet sein [77]. GM-CSF führt ebenfalls zu einer erhöhten Expression von MMPs. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass GM-CSF eine weitere Makrophagenreifung induziert [46] und während des Reifungsprozesses direkt vermehrt MMP-9 exprimiert wird [76] oder dass es während der GM-CSF induzierten Differenzierung der Makrophagen zu

einer vermehrten Expression von EMMPRIN und dadurch zu einer gesteigerten Freisetzung von MMPs kommt [47]. GM-CSF, TGF-β, v.a. aber TNF-α und IL-1β könnten somit durch Erhöhung matrixdegradierender MMPs zu einer erhöhten Plaqueinstabilität beitragen.

4.2.2. Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die EMMPRIN-Expression

Oben genannte Daten zeigen, dass die Expression von MMPs durch Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflusst wird. Da EMMPRIN ein wichtiger Regulator der MMP-Synthese ist, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit EMMPRIN durch Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflusst wird.

Nach Zugabe von TGF-β, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, PDGF, TGF-α, IL-8, bFGF und MCP-1 zu kultivierten Makrophagen konnten wir keine Unterschiede der Expression der mRNA von EMMPRIN nachweisen. Wir konnten jedoch zeigen, dass es durch TNF-α und IL-1β zu einem Anstieg der EMMPRIN-Konzentration im Zellkulturüberstand und zu einer erniedrigten EMMPRIN-Expression auf der Makrophagenoberfläche kommt. Im Gegensatz dazu konnte bei Zellen, die mit IL-10, MCP-1, TGF-α, PDGF und bFGF stimuliert wurden, durch Immunfluoreszenzfärbung und Immunpräzipitation vermehrt EMMPRIN auf der Zelloberfläche dargestellt werden.

Für eine Beteiligung von EMMPRIN an der Entwicklung der Koronarsklerose sprechen Untersuchungen, die in atherosklerotischen Plaques [11, 41, 47], im Herzen von Patienten mit Herzinsuffizienz [38], während der durch GM-CSF induzierten Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen [47] sowie in Makrophagen, die mit *Chlamydia pneumoniae* infiziert waren [11], vermehrt EMMPRIN nachweisen konnten. Ox-LDL, ein wichtiger Risikofaktor der koronaren Herzkrankheit, führt zu einer gesteigerten EMMPRIN Freisetzung durch hcSMCs [20].

In einer weiteren Studie, die den Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die Expression von EMMPRIN in Tumorzellen und hcSMCs untersuchte, führte die Zugabe TGF-β, TNF-α, TGF-α, PDGF, bFGF und IL-10 zu einem Anstieg der EMMPRIN Protein Expression in hcSMC [23]. Dieser Anstieg der EMMPRIN-Expression könnte indirekt durch die Induktion von MMPs zur Degradation von Kollagen und dadurch zu einer erhöhten Plaqueinstabilität beitragen. IL-1β, IL-6 und IL-8 hatten keinen Effekt auf die EMMPRIN-Expression und könnten direkt zu einer Erhöhung der MMP-Produktion beigetragen haben [23].

4.3 Shedding – Freisetzung von löslichem EMMPRIN durch MMPs.

Da wir nach Stimulation der Makrophagen mit den verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren keine Veränderungen der mRNA Synthese von EMMPRIN nachweisen konnten, vermuteten wir, dass es andere Ursachen für die Erhöhung von EMMPRIN im Zellkulturüberstand von Makrophagen durch TNF-α und IL-1β geben müsste. Gleichzeitig haben wir gezeigt, dass nach Stimulation der Makrophagen mit diesen proinflammatorischen Zytokinen auf der Zelloberfläche deutlich weniger EMMPRIN vorhanden war und dass EMMPRIN im Medium ein kleineres Molekulargewicht aufwies als membrangebundenes EMMPRIN. Dies führte zu der Annahme, dass es einen Mechanismus geben muss, der zur Abspaltung von EMMPRIN von der Makrophagenoberfläche führt.

Von anderen membrangebundene Proteinen wie z.B. CD44 ist bekannt, dass die Extrazellulardomäne durch membranassoziierte MMPs proteolytisch abgespalten werden kann [51]. Alternativ hierzu können membrangebundene Proteine auch als Ganzes durch Abspaltung in Mikrovesikel freigesetzt werden [67]. Diese beiden Möglichkeiten können unterschieden werden, indem man das freigesetzte Protein untersucht. Alleinige Anwesenheit des N-Terminus lässt auf eine proteolytische Abspaltung des Proteins schließen. Sind hingegen sowohl der C- als auch der N-Terminus detektierbar, spricht dies für eine Abspaltung in Vesikeln [67]. Das nach der Abspaltung zurückbleibende membrangebundene Teilstück kann durch einen Antikörper entdeckt werden, der an die zytoplasmatische Domäne bindet [52].

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass MMP-1, MMP-2 und MMP-9 für die Abspaltung von EMMPRIN von der Zelloberfläche von Makrophagen verantwortlich sind. Mittels Western Blot und Immunfluoreszenzfärbung konnten wir darstellen, dass es nach Zugabe aktivierter Formen der MMP-2 und MMP-9 zu kultivierten Makrophagen zu einer Verringerung von membrangebundenem EMMPRIN kommt. Gleichzeitig konnten wir mittels Western Blot und FIA eine Erhöhung von löslichem EMMPRIN im Medium nachweisen (siehe Abb.14-18). Diese Effekte konnten durch Einsatz von MMP-Inhibitoren (Ilomastat = GGM6001 und EDTA) verringert werden, was für eine Beteiligung von MMPs an der Abspaltung von EMMPRIN spricht. Unklar ist es bisher, warum auch bei Zellen, die mit EDTA inkubiert wurden, vermehrt EMMPRIN im Überstand nachgewiesen werden konnte. Dies könnte daran liegen, dass EDTA eine

weitere Degradation von bereits abgespaltenem EMMPRIN verringert. Membrangebundenes EMMPRIN war nur geringfügig größer als lösliches EMMPRIN im Überstand.

In einem weiteren Versuch haben wir Zelllysat von Makrophagen mit MMP-1, MMP-2 und MMP-9 inkubiert. Da die transmembranäre und zytoplasmatische Domäne von EMMPRIN mit ca. 7 kDa sehr klein ist [74], ist eine Veränderung in der breiten Bande von glykosyliertem EMMPRIN nur schwer zu erkennen. Um eine mögliche MMP-induzierte Veränderung im Molekulargewicht von EMMPRIN darzustellen, wurden die Proben deshalb nach der Stimulation mit MMPs mit F-Endoglykosidase inkubiert und Western Blots sowohl mit glykosylierten als auch mit deglykosylierten EMMPRIN-Proben durchgeführt (siehe Abb.18). Deglykosyliertes EMMPRIN ist 28 kDa groß [30]**.** Vollständig glykosyliert besitzt EMMPRIN ein Molekulargewicht von ca. 58 kDa [10]**.** Sun und Hemlers Untersuchungen mit Tunicamycin konnten bestätigen, dass N-terminale Oligiosaccharidketten ca. 50% der Größe von nativem EMMPRIN ausmachen [69]. In unserem Versuch konnten wir deglykosyliertes EMMPRIN nach Inkubation mit MMPs mit einem Molekulargewicht von 28 kDa sowie eine kleinere Form mit 20 kDa darstellen. Bei der Isolierung von EMMPRIN aus Makrophagenüberständen mittels Anionen-Austausch-Chromatographie, konnten sowohl eine hydrophile (80%) als auch eine hydrophobische (20%, (mit 0,1% Triton herausgelöst) EMMPRIN-enthaltende Fraktion extrahiert werden. Das EMMPRIN aus der hydrophilen Fraktion besaß glykosyliert ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa und unglykosyliert 20 kDa. Die Tatsache, dass glykosyliertes (50 kDa) und deglykosyliertes EMMPRIN (20 kDa) der hydrophilen Fraktion sowie die 20 kDa großen Bande des MMP-behandelten Zelllysats nicht mit einem Antikörper, der an die zytoplasmatische Domäne von EMMPRIN bindet, sondern nur mit einem Antikörper, der den N-Terminus detektiert, nachgewiesen werden konnte, spricht dafür, dass MMPs für die Abspaltung von EMMPRIN von der Zelloberfläche verantwortlich sind.

Erste Hinweise dafür, dass EMMPRIN von der Oberfläche abgespalten wird, lieferten Untersuchungen von Ellis et al. [10]. Im Zelllysat von Bronchialkarzinomzellen (LX-1 Zellen) konnte Ellis in 80 % der Fälle EMMPRIN mit einem Molekulargewicht von 58 kDa nachweisen und in 20% der Fälle zusätzlich zu der Bande bei 58 kDa noch eine bei 35 kDa. Diese zweite Bande wurde auf Degradationsprozesse bei der Probenpräparation zurückgeführt. Im Überstand dieser Zellen konnten sie wiederum Banden mit 58 kDa und Banden mit kleineren Molekulargewichten nachweisen. Diese Ergebnisse veranlassten

Ellis et al. zu der Vermutung, dass das größere EMMPRIN als intaktes Membranprotein in Mikrovesikel in den Überstand freigesetzt wird und EMMPRIN mit kleinerem Molekulargewicht ein Abspaltungsprodukt von membrangebundenem EMMPRIN darstellen könnte [10]. Weitere Untersuchungen an Tumorzellen und Fibroblasten unterstützen die Hypothese, dass EMMPRIN von der Zelloberfläche abgespalten werden könnte und somit seine stimulatorische Effekte nicht nur über direkte Zell-Zell-Kontakte induziert [6].

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnten Tang et al. erst kürzlich zeigen, dass bei der Regulation der Synthese von EMMPRIN und der MMPs in Tumoren ein positiver Rückkopplungskreislauf besteht [71]. Im Zellkulturüberstand konnten vermehrt EMMPRIN und MMPs nachgewiesen werden. Ein Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von EMMPRIN wies eine einzelne Bande in der Höhe von 52 kDa auf, gleich groß wie das intakte Protein im Zelllysat. Durch den gleichen Antikörper konnte ein nur wenig kleineres Molekül im Überstand kokultivierter Zellen nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass dieses Molekül sehr wahrscheinlich ein Abspaltungsprodukt des intakten EMMPRINs ist, zumal dieses mit einem Antikörper, der gegen das zytoplasmatische Carboxylende von EMMPRIN gerichtet ist nicht im Überstand wohl aber im Zelllysat detektiert werden konnte. Die vermehrte Expression von löslichem EMMPRIN konnte durch Einsatz von MMP-Inhibitoren verringert werden, was dafür spricht, dass MMPs für die Abspaltung von EMMPRIN verantwortlich sein könnten [71].

Taylor et al. zeigten, dass Mammakarzinomzellen lösliches EMMPRIN freisetzten, das in Fibroblasten die Freisetzung von MMP-2 stimuliert [72]. Das von Taylor et al. im Medium nachgewiesene EMMPRIN enthielt sowohl den N- als auch den C-Terminus, war hydrophob und hatte ein ähnliches Molekulargewicht zum 58 kDa großen membrangebunden EMMPRIN, was seiner Meinung nach dagegen spricht, dass EMMPRIN ein Spaltprodukt der Extrazellulardomäne darstellt [72]. Im Gegensatz hierzu konnte in der vorliegenden Arbeit, wie oben dargestellt, EMMPRIN im Überstand nur mit einem Antikörper detektiert werden, der an das N-terminale Ende von EMMPRIN bindet.
Das aus Makrophagenüberständen isolierte EMMPRIN war größtenteils hydrophil. Die Tatsache, dass das lösliche EMMPRIN der Mammakarzinomzellen ein ähnliches Molekulargewicht zum 58 kDa großen membrangebunden EMMPRIN hatte, steht in Übereinklang mit unseren Ergebnissen und spricht nicht gegen die Hypothese dass

EMMPRIN abgespalten wird, da die transmembranäre und zytoplasmatische Domäne von EMMPRIN mit ca. 7 kDa (24 und 40 Aminosäuren) sehr klein ist [74] und damit eine Veränderung in der breiten Bande von glykosyliertem EMMPRIN nur schwer zu erkennen ist. EMMPRIN wurde mittels Immunfluoreszenz sowohl intrazellulär in Vesikeln als auch auf der Zelloberfläche nachgewiesen [6]. Das EMMPRIN, das im Medium kultivierter Mammakarzinomzellen entdeckt wurde, war jedoch nicht vesikulär, da es durch Zentrifugation bei pH 7,4 oder pH 5,0 nicht sedimentiert werden konnte [72]. Taylor et al. glaubten deshalb, dass es zwei Mechanismen geben könnte, durch die EMMPRIN in benachbarten Zellen zu einer MMP-Freisetzung führen könnten. Einerseits durch direkten Zell-Zell-Kontakt über membrangebundenes EMMPRIN, andererseits parakrin durch lösliches EMMPRIN. Obwohl Taylor et al. sowohl den N- als auch den C-Terminus nachweisen konnten, gingen sie von einer Abspaltung aus, da keine Assoziation mit Vesikeln nachweisbar war. Dies veranlasste sie zu der Vermutung, EMMPRIN sei gar kein membrangebundenes Protein.

Die Ergebnisse von Sidhu et al. [67] zeigten aber, dass Vesikel an der Freisetzung von EMMPRIN aus Tumorzellen in den Überstand beteiligt sind, dass diese Vesikel jedoch sehr schnell degradiert werden können und dass es dann zu steigenden Konzentrationen von nichtvesikulärem EMMPRIN im Medium kommt, was erklären würde warum Taylor et al. das lösliche EMMPRIN nicht mit Vesikeln verknüpfen konnte [67]. Die Hauptquelle von bioaktivem EMMPRIN war der Überstand und nicht die Vesikel selbst. Western Blots, die mit Antikörpern durchgeführt wurden, die gegen den N- oder den C-Terminus gerichtet waren, zeigten Banden derselben Größe im Lysat und im Überstand. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass EMMPRIN als Ganzes von Tumorzellen über Abspaltung von Mikrovesikel ins Medium freigesetzt wird. Aufgrund der Anwesenheit des C-terminalen Endes einerseits und der Abwesenheit sehr kleiner Spaltprodukte andererseits war es unwahrscheinlich, dass es sich um ein nichtvesikuläres Abspaltungsprodukt handelte. Der Mechanismus für die Degradation der Vesikel ist nicht klar. Das Erscheinen von EMMPRIN im Medium war verbunden mit einem leichten Verlust von membrangebundenem EMMPRIN. Sidhu et al konnten deshalb nicht ausschließen, das EMMPRIN auch durch Abspaltung des N-Terminus freigesetzt wird [67].

Isoliertes natives und rekombinantes EMMPRIN stimulieren die Produktion von MMPs in Fibroblasten und Tumorzellen. Es liegen mehrere Untersuchungen vor, die zum Ergebnis

haben, dass der Grad der Glykosylierung von EMMPRIN für dessen Aktivität verantwortlich ist. [17, 69]. Es gibt 3 Glycosylierungsstellen an der extrazellulären Domäne und die posttranslationale Veränderung des Glycosylierungsgrades wird für das unterschiedliche Molekulargewicht [28, 50] und die unterschiedliche EMMPRIN-Aktivität verantwortlich gemacht [17, 37]. Da rekombinantes EMMPRIN, das von Bakterien produziert wird, nicht posttranslational modifiziert wird, ist es viel kleiner als natives EMMPRIN, das von Tumorzellen isoliert wurde. Diese Form von rekombinanten EMMPRIN ist biologisch inaktiv, was die Stimulation der MMP-Expression in Fibroblasten betrifft. Auch Intermediärformen mit 30 und 45 kDa waren inaktiv [37]**.** Stabil transfizierte Zellen, die rekombinantes EMMPRIN mit dem gleichen Molekulargewicht wie natives EMMPRIN aufweisen, steigern die Synthese von MMP-1, MMP-2 und MMP-3 [37]. Rekombinantes, lösliches EMMPRIN steigert die MMP-1 Synthese [71]. Isoliertes degylycosyliertes EMMPRIN antagonisiert sogar die MMP-1 induzierende Aktivität von isoliertem nativen EMMPRIN [69]. Da nur teilweise glycosyliertes EMMPRIN inaktiv ist, ist es wahrscheinlich, dass alle drei Glycosylierungsstellen der beiden Ig-Domänen besetzt sein müssen, um die volle Aktivität zu erreichen [17, 69]. Es ist nicht klar, ob die Kohlenhydratseitenketten direkt an der Ligandenbindung an einem möglichen Rezeptor teilnehmen, oder ob sie für die Aufrechterhaltung einer aktiven Molekularkonfiguration notwendig sind. Der aktivitätsblockierende AK E11F4 erkennt eher ein Peptid als eine Kohlenhydrat-seitenketten [4], es ist deshalb wahrscheinlich, dass die Kohlenhydratseitenketten nicht alleine für die MMP induzierende Aktivität verantwortlich sein können. Dieser Antikörper erkennt den distalen Immunglobulin-Loop von EMMPRIN, was impliziert, dass diese Region von EMMPRIN, die Struktur enthält, die für die Aktivität verantwortlich ist [74]. Ähnliche Ergebnisse liefern Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe. Rekombinantes EMMPRIN reduzierte die MMP-1 Synthese leicht und führte zu keiner signifikanten Veränderung der MMP-2. Rekombinantes EMMPRIN war mit 30 kDa kleiner als natives EMMPRIN, das aus Zellkulturüberständen von Makrophagen isoliert worden war [20]**.** Dagegen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass isoliertes Makrophagen-EMMPRIN mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa bei hcSMCs zu einer signifikanten Steigerung der Freisetzung der MMP-1, der MMP-2 und der MMP-9 führt. Dieser Befund deutet darauf hin, dass das isolierte EMMPRIN aktiv ist.

4.4 Interaktion zwischen Makrophagen und hcSMCs

Um genauer zu prüfen, ob das lösliche EMMPRIN aktiv ist, wurden weitere Versuche durchgeführt. Zahlreiche frühere Studien belegen, dass durch Kokultur von Tumorzellen mit Fibroblasten die MMP-Synthese in den Fibroblasten gesteigert werden konnte und dass EMMPRIN an dieser Interaktion maßgeblich beteiligt ist [28, 33, 37, 44, 53, 60, 70-72]. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine ähnliche Interaktion auch zwischen Makrophagen und glatten Muskelzellen besteht. Hierzu wurde getestet inwieweit EMMPRIN, das von kultivierten Makrophagen stammt, auf die Synthese von MMPs in koronaren glatten Muskelzellen Einfluss nimmt. Glatte Muskelzellen wurden einerseits mit Überständen kultivierter Makrophagen, die EMMPRIN enthielten oder bei denen EMMPRIN mittels Immundepletion entfernt worden war, stimuliert, andererseits wurden Makrophagen und glatte Muskelzellen zusammen in direktem Kontakt kultiviert. Weiterhin wurde, wie oben dargestellt, aus Makrophagenüberstand isoliertes EMMPRIN zu kultivierten hcSMCs gegeben und anschließend die Synthese der MMPs in den Zellkulturüberständen gemessen.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Immunfluoreszenz-Färbung gezeigt werden, dass es in einer gemischten Kokultur von Makrophagen und hcSMCs zu einer Steigerung der Expression der MMP-9, vor allem aber der MMP-2 in hcSMCs, verglichen mit einer Monokultur von hcSMCs, kommt. Fraglich bleibt jedoch, ob eine EMMPRIN vermittelte Steigerung der MMP-Synthese eher durch direkten Zellkontakt oder durch Stimulation der hcSMCs mit löslichem Makrophagen-EMMPRIN hervorgerufen wird. Nach Stimulation der hcSMCs mit Makrophagen-Überständen konnte sowohl eine Steigerung der Freisetzung wie auch eine Aktivierung der MMP-2 beobachtet werden.

Es lässt sich jedoch nur eine begrenzte Aussage darüber machen, ob dieser Effekt tatsächlich auf EMMPRIN zurückzuführen ist, da Makrophagen die proinflammatorische Zytokine TNF-α und IL-1β freisetzen [42] und es berichtet wurde, dass diese Zytokine in hcSMCs zu einer deutlichen Steigerung und Aktivierung der MMP-Synthese führen [14, 15, 40]. Lee et al. haben die Interaktion zwischen Makrophagen und SMCs untersucht, die eine Steigerung der MMP-1 und MMP-3, nicht aber der MMP-2 zum Ergebnis hatten. Wurden hcSMCs mit Monozyten kokultiviert oder mit Monozyten Überstand stimuliert, zeigte sich eine deutliche Steigerung der beiden MMPs. Diese Induktion konnte durch Hemmung des IL-1-Rezeptors, nicht aber durch Hemmung des TNF-Rezeptors verringert

werden [34], was darauf hindeutet, dass IL-1ß an der Steigerung der MMP-Synthese beteiligt ist.

Was für eine Beteiligung von EMMPRIN und die Aktivität des löslichen EMMPRINs spricht ist die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnten, dass Makrophagen-Überstände, die EMMPRIN enthielten, in hcSMCs die Freisetzung der MMP-9 und MMP-2 im Vergleich zu Makrophagen-Überständen, aus denen EMMPRIN mittels Immundepletion entfernt worden war, steigerten und weiterhin, dass aus Makrophagen-Überständen isoliertes EMMPRIN bei hcSMCs zu einer signifikanten Steigerung der Freisetzung der MMP-1, der MMP-2 und der MMP-9 führte.

4.5 Homophile Interaktion

Die Fähigkeit von EMMPRIN, die Synthese von MMPs zu induzieren ist mittlerweile gut belegt. Unklar bleibt jedoch, über welchen Rezeptor es seine Wirkung entfaltet. Es gibt erste Untersuchungen, die dafür sprechen, dass EMMPRIN über das N-terminale Ende [82] Oligomere bildet und damit über eine „homophilic interaction“ mit sich selbst interagiert und dadurch entweder auto- oder parakrin zu einer Erhöhung der MMP Synthese führt [37, 69, 71, 82]. Es wurde gezeigt, dass diese „homophilic interaction“ der EMMPRIN Moleküle hauptsächlich über die erste Ig-Domäne vermittelt wird [69]. Die Interaktion mit weiteren Rezeptoren kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. EMMPRIN ist mit $\alpha^3\beta_1$-Integrinen und $\alpha^6\beta_1$-Integrinen assoziiert [3]. Die intrazellulären Signaltransduktionswege, über die EMMPRIN die MMP-Synthese induziert, sind noch nicht vollständig geklärt. Es liegen Untersuchungen vor, die darauf hindeuten, dass die Signaltransduktion von EMMPRIN über die Aktivierung von p38 MAPKinase [8, 11, 44, 81] sowie durch eine Aktivierung der Phospholipase A(2) und 5-Lipoxygenase erfolgt [72].

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten lassen vermuten, dass die Abspaltung von EMMPRIN indirekt auf einer TNF-α und IL-1β bedingten Stimulation der MMP-Synthese begründet sein dürfte und die proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-1β einen positiven Rückkoppelungsmechanismus unterstützen, da lösliches EMMPRIN wiederum die Synthese von MMPs in hcSMCs stimuliert. Durch Interaktion von Makrophagen und hcSMCs könnte es hierdurch zu einer EMMPRIN-vermittelten Überexpression von MMPs und damit durch Degradation von Kollagen zu einer Erweichung der fibrösen Kappe mit allen Komplikationen der koronaren Herzkrankheit kommen.

5. Zusammenfassung

Die koronare Herzkrankheit mit den akuten Ereignissen wie Herzinfarkt und plötzlichem Herztod ist die häufigste Ursache für Morbidität und Mortalität in den westlichen Industrienationen. Den aktivierten Makrophagen kommt in diesem Prozess eine Schlüsselrolle zu, da diese Matrixmetalloproteinasen (MMPs) freisetzen, welche durch Degradation von Kollagen zu Erweichung der fibrösen Kappe führen und somit die Entwicklung einer Plaqueinstabilität fördern. Von mehreren Zytokinen und Wachstumsfaktoren ist bekannt, dass sie zu einer Überexpression von MMPs in Plaques führen. Es wurde gezeigt, dass der Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN), ein membrangebundenes Glykoprotein, das auf der Oberfläche von Tumorzellen lokalisiert ist und der in Fibroblasten die Expression von Matrixmetalloproteinasen stimuliert, auch in atherosklerotischen Läsionen und auf der Oberfläche von Makrophagen zu finden ist. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Rolle EMMPRIN bei der Interaktion von Makrophagen und humanen koronaren glatten Gefäßmuskelzellen (hcSMCs) im Hinblick auf die Entwicklung einer Plaqueinstabilität spielt. Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- Welchen Einfluss haben Zytokine und Wachstumsfaktoren auf die Expression von EMMPRIN bei Makrophagen?
- Führen die Entzündungsmediatoren TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) und IL-1β (IL=Interleukin) zur Abspaltung von EMMPRIN von der Zelloberfläche bei Makrophagen und, wenn ja, über welchen Mechanismus?
- Welchen Einfluss hat EMMPRIN aus Makrophagen-Überstand auf die Synthese von Matrixmetalloproteinasen bei koronaren glatten Gefäßmuskelzellen?

Makrophagen wurden mit TGF-β (Transforming Growth Factor-β), TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, PDGF (Platelet Derived Growth Factor), TGF-α (Transforming Growth Factor-α), IL-8, bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) und MCP-1(Monocyte Chemotactic Protein-1) und später mit MMPs inkubiert. Die Expression und Aktivität von MMPs wurde mittels Zymographie und zeit-aufgelöster Immunfluoreszenz (TR-FIA) nachgewiesen. Immunfluoreszenzfärbung, Western Blot und TR-FIA dienten zum Nachweis der Expression von membrangebundenem und löslichem EMMPRIN. Makrophagen wurden mit koronaren glatten Gefäßmuskelzellen kokultiviert und die Expression der MMP-2 und MMP-9 mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Koronaren glatte Gefäß-muskelzellen wurden mit Makrophagen-Überständen, isoliertem Makrophagen-EMMPRIN

und EMMPRIN-immundepletierten Überständen inkubiert. Anschließend wurde die Freisetzung der MMPs mittels TR-FIA und Zymographie nachgewiesen.

Zunächst wurde der schon bekannten Befund, dass TNF-α, IL-1β und TGF-β die Synthese der MMP-9 in Makrophagen stimuliert bestätigt. Gleichzeitig konnte erstmals gezeigt werden, dass TNF-α und IL-1β zu einer Erhöhung von EMMPRIN im Überstand von kultivierten Makrophagen und zu einer Erniedrigung von EMMPRIN auf der Zelloberfläche führen. Die Effekte von TNF-α und IL-1β reduzierten sich in Anwesenheit von MMP-Inhibitoren (Ilomastat = GGM6001 und EDTA). Durch Inkubation der Makrophagen mit MMP-2 und MMP-9 verringerte sich zellassoziiertes EMMPRIN und erhöhte sich die EMMPRIN-Konzentration im Zellkulturüberstand. Dem löslichen EMMPRIN fehlte das Carboxylende. Die EMMPRIN-Genexpression wurde durch die genannten Entzündungsmediatoren TNF-α und IL-1β nicht beeinflusst. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von Makrophagen-Überständen zu koronaren glatten Gefäßmuskelzellen die Synthese der MMP-2 und MMP-9 gesteigert wird. Durch Immundepletion von EMMPRIN aus dem Makrophagen-Überstand reduzierte sich der MMP-steigernde Effekt von EMMPRIN. Aus Makrophagen-Überständen isoliertes EMMPRIN stimulierte bei koronaren glatten Gefäßmuskelzellen die Freisetzung der Matrixmetalloproteinasen-1, -2, und -9.

Nachdem die vorliegenden Daten darauf hindeuteten, dass die Entzündungsmediatoren TNF-α und IL-1β zum einen die Freisetzung der MMPs stimulieren, gleichzeitig MMPs EMMPRIN von der Zelloberfläche abspalten und hierdurch die Konzentration von gelöstem EMMPRIN im Zellkulturüberstand erhöhen, konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass TNF-α und IL-1β die Abspaltung von EMMPRIN stimulieren. Die Effekte der Entzündungsmediatoren TNF-α und IL-1β reduzierten sich in Anwesenheit von MMP-Inhibitoren. Aus diesem Befund folgerten wir, dass die Abspaltung von EMMPRIN indirekt auf einer TNF-α und IL-1β bedingten Stimulation der Synthese von MMPs begründet sein dürfte und diese proinflammatorischen Zytokine somit einen positiven Rückkoppelungsmechanismus unterstützen, da lösliches EMMPRIN wiederum die Synthese von MMPs in koronaren glatten Gefäßmuskelzellen stimuliert. Durch Interaktion von Makrophagen und koronaren glatten Gefäßmuskelzellen könnte es hierdurch zu einer Überexpression von MMPs und damit zu einer Erweichung der fibrösen Kappe mit allen Komplikationen der koronaren Herzkrankheit kommen.

Literaturverzeichnis

1. Ardans JA., Economu AP., Martinson JM., Zhou M., Wahl LM.: Oxidized low-density and high-density lipoproteins regulate the production of matrix metalloproteinase-1 and –9 by activated monocytes. J Leukoc Biol 71:1012-1008 (2002).

2. Arroyo LH., Lee RT.: Mechanisms of plaque rupture: mechanical and biologic interactions. Cardiovasc Res 41:369-375 (1999).

3. Berditchevski F., Chang S., Bordorova J., Hemler M.: Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha-3beta-1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6. J Biol Chem 46:29174-29180 (1997).

4. Biswas C., Zhang Y., DeCastro R., Guo H., Nakamura T., Kataoka H., Nabeshima K.: The human cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. Cancer Res 55:434-439 (1995).

5. Bordador LC., Li X., Toole B., Chen B., Regezi J., Zardi L., Hu Y., Ramos DM.: Expression of emmprin by oral squamous cell carcinoma. Int J Cancer 85:347-352 (2000).

6. Caudroy S., Polette M., Tournier J.M, Burlet H., Toole B., Zucker S., Birembaut P.: Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and the matrix metalloproteinase-2 in bronchopulmonary and breast lesion. J Histochem Cytochem 47:1575-1580 (1999).

7. Dalager-Pedersen S., Ravn HB., Falk E.: Atherosclerosis and acute coronary events. Am J Cardiol 82:37T-40T (1998).

8. Davidson B., Givant-Horwitz V., Lazarovici P., Risberg B., Nesland JM., Trope CG., Schaefer E., Reich R.: Matrix metalloproteinase (MMP), EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) and mitogen-activated protein kinase (MAPK): co-expression in metastatic serous ovarian carcinoma. Clin Exp Metastasis 20:621-631 (2003).

9. Egeblad M., Werb Z.: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer 2:161-174 (2002).

10. Ellis SM., Nabeshima K., Biswas C.: Monoclonal antibody preparation and purification of tumor cell collagenase-stimulatory factor. Cancer Res 49:3385-3391 (1989).

11. Eui YC., Dongsoo K., Bum KH., Hyuck MK., Young GS., Ki HB, Hyun-Young P., Ki CW., Hyun-Seung K.: Upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and gelatinases in human atherosclerosis infected with Chlamydia pneumoniae: The potential role of Chlamydia pneumoniae infection in the progression of atherosclerosis. Exp Mol Med 34:391-400 (2002).

12. Falk E.: Plaque rupture with severe pre-existing stenosis preciptating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlaying fatal occlusive thrombi. Br Heart J 50:127-134 (1983).

13. Fuster V., Badimon L., Badimon JJ., Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). N Engl J Med 326:310-318 (1992).

14. Galis ZS., Sukhova GK., Lark MW., Libby P.: Increased expression of matrix metalloproteinase and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atheroclerotic plaques. J Clin Invest 94:2493-2503 (1994).

15. Galis ZS., Muszynski M., Sukhova GK, Simon-Morrissey E., Libby P.: Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. Ann N Y Acad Sci 748:501-507 (1995).

16. Galis ZS., Jaikirshan JK.: Matrix metalloproteinase in vascular remodeling and atherogenesis: The good, the bad and the ugly. Circ Res 90:251-262 (2002).

17. Guo H., Zucker S., Gordon MK., Toole BP., Biswas C.: Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected chinese hamster ovary cells. J Biol Chem 272:24-27 (1997).

18. Guo H., Majmudar G., Jensen TC., Biswas C., Toole BP., Gordon MK.: Characterization of the gene for human EMMPRIN, a tumor cell surface inducer of matrix metalloproteinases. Gene 220:99-108 (1998).

19. Harrison D., Griendling K., Landmesser U., Hornig B., Drexler H.: Role of oxidative stress in atherosclerosis. Am J Cardiol 91:7A-11A (2003).

20. Haug C., Lenz C., Diaz F., Bachem MG.: Oxidized LDL stimulate extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) release by human coronary artery smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24:1823-1829 (2004).

21. Hiroyasu U., Harpf A., Ming L., Doherty TM., Shukla A., Ning-Ning C. Pinky VT., Jovinge S., Douglas JW., Kamlseh A., Prediman K.S., Rajavashisth TB.: Increased Expression of membrane type-3-metalloproteinase in human atherosclerotic plaque. Circulation 106:3024-3030 (2002).

22. Holven KB., Halvorsen B., Schulz H., Aukrust P., Ose L., Nenseter MS.: Expression of matrix metalloproteinase-9 in mononuclear cells of hyperhomocysteinaemic subjects. Eur J Clin Invest 33:555-560 (2003).

23. Hu Q.: Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) by growth factors/cytokines. Med Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Ulm (2002).

24. Huang Y., Mironova M., Lopes-Virella MF. : Oxidized LDL stimulates matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19:2640-2647 (1999).

25. Inoue N., Takeshita S., Gao D., Ishida T., Kawashima S., Akita H., Tawa R., Sakurai H., Yokoyama M.: Lysophosatidylcholin increases the secretion of matrix metalloproteinase 2 through the activation of NADH/NADPH oxidase in cultured endothelial cells. Atherosclerosis 155:45-52 (2001).

26. Kalela A., Koivu T., Hoyhtya M., Jaakkola O., Lehtimaki T., Sillanaukee P., Nikkari ST.: Assocation of serum MMP-9 with autoantibodies against oxidized LDL. Atherosclerosis 160:161-165 (2002).

27. Kaname T., Miyauchi T., Kuwano A., Muramatsu T., Kajii T.: Mapping basigin (BSG), a member of the immunoglobulin superfamily, to 19p13.3. Cyogenet Cell Genet 64:195-197 (1993).

28. Kanekura T., Chen X., Kanzaki T.: Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. Int J Cancer 99:520-528 (2002).

29. Kanekura T., Miyauchi T., Tashiro M., Muramatsu T.: Basigin a new member of the immunglobulin superfamily: genes in different mammalian species, glycosylation changes in the molecule from adult organs and possible variation in the N-terminal sequences. Cell Struct Funct 16:23-30 (1991).

30. Kasinrerk W., Tokrasinwit N., Phunpae P.: CD147 monoclonal antibodies induce homotypic cell aggregation of monocytic cell line U937 via LFA-1/ICAM-1 pathway. Immunology 96:184-192 (1999).

31. Kataoka H., DeCastro R., Zucker S., Biswas C.: Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin and 72-kDa gelatinase. Cancer Res 53:3154-3158 (1993).

32. Katsuda S., Kaji T. Atherosclerosis and Extracellular Matrix. J Atheroscler Thromb 10:267-274 (2003).

33. Ko K., Yazumi S., Yoshikawa K., Konda Y., Nakajima M., Chiba T., Takahasi R.: Activation of fibroblast-derived matrix metalloproteinase-2 by colon-cancer cells in non-contact Co-culture. Int J Cancer 87:165-171 (2000).

34. Lee E., Grodzinsky AJ., Libby P., Clinton SK., Lark MW., Lee RT.: Human vascular smooth muscle cell – monocyte interaction and metalloproteinase secretion in culture. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15:2284-2289 (1995).

35. Lee RT., Libby P.: The unstable atheroma. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17:1859-1867 (1997).

36. Li D., Liu L., Chen H., Sawamura T., Ranganthan S., Mehta J.: LOX-1 mediated oxidized low-density lipoprotein-induced expression of matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells. Circulation 107:612-617 (2003).

37. Li R., Huang L., Guo H., Toole BP.: Basigin (EMMPRIN) stimulates matrix metalloproteinase production by fibroblasts. J Cell Physiol 186:371-379 (2001).

38. Li Y., McTiernan CF., Feldman AM.: Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase and their regulators in cardiac matrix remodeling. Cardiovasc Res 46:214-224 (2000).

39. Li Y., Shang P., Qian AR., Wang L., Yang Y., Chen Z.: Inhibitory effects of antisense RNA of Hab18G/CD147 on invasion of hepatocellular carcinoma cells in vitro. World J Gastroenterol 9:2174-2177 (2003).

40. Li Z., Froehlich J., Galis ZS., Lakatta EG.: Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. Hypertension 33:116-123 (1999).

41. Liang L., Major T., Bocan T.: Characterization of the promoter of human extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN). Gene 282:75-86 (2002).

42. Libby P.: Inflammation in atherosclerosis. Nature 420:868-874 (2002).

43. Libby P.: Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. Am J Cardiol 91:3A-6A (2003).

44. Lim M., Martinez T., Jablons D., Cemeron R., Guo H., Toole BP., Li JD., Basbaum C.: Tumor-derived EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinases inducer) stimulates collagenase transcription through MAPK p38. FEBS Lett 441:88-92 (1998).

45. Loftus IM., Naylor AR., Bell PRF., Thompson MM.: Matrix metalloproteinase and atherosclerotic plaque instability. Br J Surg 89:680-694 (2002).

46. Lopez M., Martinache C., Canepa S., Chokori M., Scotto F., Bartholeyns J.: Autologous lymphocytes prevent the death of monocvtes in culture and promote, as do GM-CSF, IL-3 and M-CSF, their differentiation into macrophages. J Immunol Methods 159:29-38 (1993).

47. Major T., Liang L., Xiaokang L., Rosebury W., Bocan T.: Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is induced upon monocyte differentiation and is expressed in human atheroma. Arterioscler Thromb Vasc Biol 22:1200-1207 (2002).

48. Matsumoto S., Kobayashi T., Katoh M., Saito S., Ikeda Y., Kobori M., Masuho Y., Watanabe T.: Expression and localization of matrix metalloproteinase-12 in the aorta of cholesterol-fed rabbits. Am J Pathol 153:109-119 (1998).

49. Miyauchi T., Masuzawa Y., Muramatsu T.: The basigin group of the immunglobulin superfamily: conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen. J Biochem 110:770-774 (1991).

50. Muramatsu T., Miyauchi T.: Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. Histo Histopathol 18:981-987 (2003).

51. Nakamura H., Suenga N., Taniwaki K., Matsuki H., Yonezawa K., Fujii M., Okada Y., Seiki M.: Constitutive and induced CD44 shedding by ADAM-like proteases and membrane-type 1 matrix metalloproteinase. Cancer Res 64:876-882 (2004).

52. Okamato I., Tsuiki H., Kenyon LC., Godwin AK., Emlet DR., Holgado-Madruga M., Lanham IS., Joynes CJ., Vo KT., Guha A., Matsumoto M., Ushio Y., Sya H., Wong AJ.: Proteolytic cleavage of the CD44 adhesion molecule in multiple human tumors. Am J Pathol 160:441-447 (2002).

53. Prescott J., Troccoil N., Biswas C.: Coordinate increase in collagenase mRNA and enzyme levels in human fibroblasts treated with the tumor cell factor, TCSF. Biochem Int 19:257-266 (1989).

54. Raines EW., Ross R.: Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development an the potential impact of soy. J Nutr 125:624S-630S (1995).

55. Rajavashisth TB. , Liao JK., Galis ZS., Tripathi S., Laufs U., Tripathi J., Chai N., Xu X., Jovinge S., Shah PK., Libby P.: Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. J Biol Chem 274:11924-11929 (1999).

56. Rajavashisth TB., Xu XP., Jovinge S., Meisel S., Xu XO, Chai NN., Fisbein MC, Kaul S., Cercek B., Sharifi B., Shah PK.: Membrane type 1-matrix metalloproteinase expressions in human atherosclerotic plaques. Circulation 99:3103-3109 (1999).

57. Rekhter MD.: Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. Cardiovasc Res 41:376-384 (1999).

58. Ruberg FL, Leopold JA, Loscalzo J.: Atherothrombosis: Plaque instability and thrombogenesis. Prog Cardiovasc Dis 44:381-394 (2002).

59. Sameshima T., Nabesshima K., Toole BP., Yokogami K., Okada Y., Goya T., Koono M., Wakisaka S.: Expression of emmprin (CD147), a cell surface inducer of matrix metalloproteinase, in normal human brain and gliomas. Int J Cancer 88:21-27 (2000).

60. Sameshima T., Nabeshima K., Toole BP., Yokogami K., Okada Y., Goya T., Koono M., Wakisaka S.: Glioma cell extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) (CD147) stimulates production of membrane-type matrix metalloproteinases and activated gelatinase-A in co-cultures with brain-derived fibroblasts. Cancer Lett 157:177-184 (2000).

61. Saren P., Welgus HG., Kovanen PT.: TNF-α and IL-1β selectively induce expression of 92 kDa gelatinase by human macrophages. J Immunol 157:4159-4165 (1996).

62. Schneiderhahn W., Diaz F., Fundel M., Zhou S., Siech M., Möller P., Gschwendt JE., Seufferlein T., Adler G., Bachem MG.: Basigin (CD147) promotes pancreas tumor progression by stimulating matrix metalloproteinases in stellate cells. (Publikation in Vorbereitung).

63. Schönbeck U., Mach F., Sukhova GK., Atkinson E., Levesque E., Herman M., Graber P., Basset P., Libby P.: Expression of stromelysin-3 in atherosclerotic lesions: regulation via CD40-CD40 ligand signaling in vitro and in vivo. J Exp Med 189:843-853 (1999).

64. Shah PK., Falk E., Badimon JJ., Fernandez-Ortiz A., Mailhac A., Villareal-Levy G., Fallon JT., Regnstrom, Fuster V.: Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Circulation 92:1565-1569 (1995).

65. Shima M., Teitelbaum SL., Holers VM., Ruzicka C., Osmack P., Ross FP.: Makrophage-colony-stimulating factor regulates expression of the intergrins alpha-4 beta-1 and alpha-5 beta-1 by murine bone marrow macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 92: 5179-5183 (1995).

66. Sho E., Sho M., Singh TM., Nanjo H., Komatsu M., Xu C., Masuda H., Zarins CK.: Arterial enlargement in response to high flow requires early expression of matrix metalloproteinases to degrade extracellular matrix. Exp Mol Pathol 73:142-153 (2002).

67. Sidhu SS., Mengistab AT., Tauscher AN., LaVail J., Basbaum C.: The mikrovesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions. Oncogene 23:956-963 (2004).

68. Staffler G., Stockinger H.: CD147. J Biol Regul Homeost Agents 14: 327-330 (2000).

69. Sun J., Hemler ME.: Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. Cancer Res 61:2276-2281 (2001).

70. Suzuki S., Sato M., Senoo H., Ishikawa K.: Direct cell-cell interaction enhances pro-MMP-2 production and activation in co-culture of laryngeal cancer cells and fibroblasts: involvement of EMMPRIN and MT1-MMP. Exp Cell Res 293:259-266 (2004).

71. Tang Y., Kesavan P., Nakada M. T., Li Y.: Tumor-Stroma Interaction: Positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)-expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN. Mol Cancer Res 2:73-80 (2004).

72. Taylor PM., Woodfield RJ., Hodgkin MN., Pettitt TR., Martin A., Kerr DJ., Wakelam MJ.: Breast cancer cell-derived EMMPRIN stimulates fibroblast MMP-2 release through a phospholipase A(2) and 5-lipoxygenase catalyzed pathway. Oncogene 21:5765-5772 (2002).

73. Tomita T, Nakase T, Kaneko M, Shi K, Takahi K, Ochi T, Yoshikawa H.: Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 46:373-378 (2002).

74. Toole BP.: EMMPRIN (CD147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function. Curr Top Dev Biol 54:371-389 (2003).

75. Uzui H., Harpf A., Liu M., Doherty TM., Shukla A., Chai NN., Tripathi PV., Jovinge S., Wilkin DJ., Asotra K., Shah PK., Rajavashisth TB.: Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: role of activated macrophages and inflammatory cytokines. Circulation 106:3024-3030 (2002).

76. Wahl LM., Corcoran M.: Regulation of monocyte/macrophage metalloproteinase production by cytokines. J Peridontol 64:467-473 (1993).

77. Wahl SM., Costa GL., Corcoran M., Wahl LM., Berger AE.: Transforming growth factor beta mediates IL-1 dependent induction of IL-1 receptor antagonist. J Immunol 150:3553-3560 (1993).

78. Westermarck J., Kähäri V.: Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. FAESB J 13:781-792 (1999).

79. Xie B., Laouar A., Huberman E.: Fibronectin-mediated cell adhesion is required for induction of 92-kDa type IV collagenase/gelatinase (MMP-9) gene expression during macrophage differentiation. The signaling role of protein kinase C-beta. J Biol Chem 273: 11567-11582 (1998).

80. Xu XP., Meisel S., Ong JM., Kaul S., Cercek B., Rajavashisth TB., Sharifi B., Shah PK.: oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. Circulation 99:993-998 (1999).

81. Yang JM., Xu Z., Wu H., Zhu H., Wu X., Hait WN.: Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistent cancer cells. Mol Cancer Res 1:420-427 (2003).

82. Yoshida S., Shibata M., Yamamoto S., Hagihara M., Asai N., Takahasi M., Mizutani S., Muramatsu T., Kadomatsu K.: Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamlily member, via its N-terminal immunoglobulin domain. Eur J Biochem 267: 4372-4380 (2000).

83. Zareie M., McKay DM., Kovarik GG. Perdue MH.: Monocye/macrophages evoke epithelial dysfunction: indirect role of tumor necrosis factor-alpha. Am J Physiol 275:932-939 (1998).

84. Zhang Y., McCluskey K., Fujii K., Wahl LM.: Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF-α, Granulocyte-macrophage-CSF and IL-1β through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms. J Immunol 161:3071-3076 (1998).

85. Zhou J., Chew M., Ravn HB., Falk E. : Plaque pathology and coronary thrombosis in the pathogenesis of acute coronary syndromes. Scand J Clin Lab Invest 230:3-11 (1999).

86. Zucker S., Hymowitz M., Conner C., Zarrabi HM., Hurewitz AN., Matrisian L., Boyd D., Nicolson G., Montana S.: Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. Ann N Y Acad Sci 878:212-227 (1999).

87. Zucker S., Hymowitz M., Rollo E., Mann R., Conner C.E., Cao J., Foda HD., Tompkins DC., Toole BP.: Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer. Am J Pathol 158:1921-1928 (2001).

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben haben, diese Arbeit zu vollenden.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. MG Bachem, danke ich ganz herzlich für sein Interesse, die stete Diskussionsbereitschaft, die Bereitstellung des faszinierenden Themas und die Betreuung meiner Arbeit.

Bei unseren MTAs Frau Adam-Jäger, Frau de Groot und Frau Sailer möchte ich mich ganz herzlich für die technische Unterstützung, ihre Hilfsbereitschaft und für die schöne Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ich bin froh, dass ich durch meine Doktorarbeit die Chance erhalten habe, meine ausländischen Mitdoktoranden kennen zu lernen. Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Zhou, Frau Li und Herrn Diaz für ihre Hilfe, die freundschaftliche Zusammenarbeit und die tollen Diskussionen, die auch menschlich eine große Bereicherung waren, bedanken.

Danke Christian.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihr Verständnis, ihre Unterstützung und für vieles mehr.