

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
Tübingen  
Abteilung Innere Medizin III**

**Rolle von thrombozytärem JAM-A für  
homotypische und heterotypische Zell-Zell  
Interaktionen mit Dendritischen Zellen**

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

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

**vorgelegt von**

**Felicitas Dorothea Orte Lampka, geb. Horch**

**2018**

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Langer
2. Berichterstatter:	Professor Dr. K. Schenke-Layland
Tag der Disputation:	31.07.2018

Für all diejenigen, die viel zu früh von uns gegangen sind  
und nun in unseren Herzen für immer weiterleben.

Für all diejenigen, die mit uns jeden Weg gegangen sind und gehen,

in guten und vor allem auch in schlechten Zeiten,

die uns nie verlassen haben,

nie verlassen werden und immer bei uns sind!

Es ist die Familie, die all dies zu schaffen vermag!

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Atherosklerose – Risikofaktoren, Pathologie, Bedeutung für die Gesellschaft und Therapie .....	1
1.2	Neuer Ansatz der Prävention der Atherosklerose - Biologicals.....	3
1.3	Aufbau und Funktion von Antikörpern .....	4
1.4	Rolle von Thrombozyten und Dendritischen Zellen in der Atherosklerose .....	6
1.5	Junctional Adhesion Molecules (JAMs).....	10
1.5.1	Allgemeines .....	10
1.5.2	Grundstruktur .....	11
1.5.3	Verschiedene Ergebnisse zur Rolle des JAM-A bei Atherosklerose .....	11
1.6	Expression von JAM-A und EMMPRIN auf humanen und murinen Thrombozyten und Dendritischen Zellen .....	12
1.7	Homotypische und heterotypische Zell-Zellverbindung am Beispiel von JAM-A und EMMPRIN .....	13
1.8	Fragestellung der Arbeit.....	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1	Material, Geräte und Bezugsquellen .....	17
2.2	Isolation der humanen und murinen Zellen .....	20
2.2.1	Allgemeines .....	20
2.2.2	Thrombozytenisolation aus humanem Vollblut.....	21
2.2.3	Isolation, Kultivierung und Ernte humaner Dendritischer Zellen.....	21
2.2.4	Thrombozytenisolation aus murinem Vollblut.....	23
2.2.5	Isolation, Kultivierung und Ernte muriner Dendritischer Zellen.....	23
2.3	Durchführung der Adhäsionsassays unter statischen Bedingungen.....	24

2.3.1	Humane Dendritische Zellen oder humane beziehungsweise murine Thrombozyten über immobilisiertem Protein.....	24
2.3.2	Antikörper oder Protein behandelte humane Dendritische Zellen über immobilisierten humanen Thrombozyten .....	25
2.3.3	Antikörper präinkubierte murine Dendritische Zellen über immobilisiertem EMMPRIN Fc .....	26
2.4	Dokumentation der Versuche und Methodik der statistischen Datenanalyse .....	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
3.1	Humane Thrombozyten binden vermehrt über immobilisiertem humanen JAM-A Fc.....	29
3.2	Murine Thrombozyten binden über immobilisiertem murinen JAM-A Fc und EMMPRIN Fc vermehrt.....	30
3.3	Humane Dendritische Zellen binden vermehrt über immobilisiertem humanen JAM-A Fc.....	31
3.4	Inhibition von JAM-A der murinen Dendritischen Zellen resultiert in verringerter Anzahl adhärenter muriner Dendritischer Zellen auf immobilisiertem murinen EMMPRIN Fc.....	31
3.5	Humane Dendritische Zellen gehen über ihre Oberflächenproteine JAM-A und EMMPRIN mit humanen Thrombozyten eine Verbindung ein .....	33
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>56</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift ...</b>	<b>65</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>66</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Atherosklerose – Risikofaktoren, Pathologie, Bedeutung für die Gesellschaft und Therapie**

Atherosklerose leitet sich aus dem Griechischen ab und ist aus zwei Worten zusammengesetzt: athero = Mehlbrei und skler = hart, trocken [1]. Synonym wird Arteriosklerose und umgangssprachlich Arterienverkalkung verwendet. Da Arteriosklerose jedoch nur einen bestimmten Gefäßabschnitt beschreibt, wird in dieser Arbeit der allgemeine Begriff Atherosklerose verwendet.

Im Folgenden werden die Hauptrisikofaktoren, die die Entstehung der Atherosklerose begünstigen, genannt. Hierzu gehören als sogenannte Faktoren 1. Ranges der Hypertonus, die Fettstoffwechselstörungen mit Low density Lipoprotein (LDL) Erhöhung und High density Lipoprotein (HDL) Erniedrigung, Nikotinabusus und Diabetes mellitus (DM), der sekundär Hyperlipoproteinämien begünstigt. Weiter finden sich Risikofaktoren 2. Ranges wie Adipositas, Bewegungsmangel und psychischer Stress [2]. Die genannten Risikofaktoren begünstigen eine Verhärtung, Verdickung und einen Elastizitätsverlust des Gefäßes, und es kommt zur Abnahme des Gefäßlumens mit Minderperfusion des nachgeschalteten Versorgungsareals [3].

Wenn man die Pathohistologie der Atherosklerose betrachtet, besteht ein fließender Übergang von physiologischen zu pathologischen Prozessen wie dies Sary et al. beschreiben [4, 5]. Sie stellen eine Klassifikation vor, die im Weiteren in groben Zügen erläutert wird (für Details und Untertypen, [4, 5]).

Zunächst gehen Sary et al. davon aus, dass es eine initiale Läsion (Typ I) gibt. Sie ist nur lichtmikroskopisch zu sehen, im Bereich der Intima lokalisiert und imponiert histologisch mit vereinzelt sogenannten Schaumzellen („foam cells“). Dies sind Makrophagen, die Lipide enthalten, und es hat sich gezeigt, dass solche Läsionen in den Koronarien von Säuglingen bis 8 Monate bereits in 45 % der Fälle zu finden sind.

Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass diese Läsionen der Säuglinge im Verlauf rückläufig waren und sie erst während der Pubertät erneut auftreten [6]. Bei genetisch nicht vorbelasteten Kindern zwischen 10-14 Jahren fanden sich erneut bei über 50% lipidbeladene Makrophagen [6]. Hervorgehend aus der Typ I Läsion entsteht die Typ II Läsion mit den „fatty streaks“. Zusätzlich zu den jetzt flächig auftretenden Schaumzellen finden sich ebenfalls in der Intima lokalisierte lipidhaltige glatte Muskelzellen, sowie vermehrt T-Lymphozyten und Mastzellen. Die Typ III Läsion zeigt zusätzlich extrazelluläres Lipid und ist als Übergang zum „Atherom“ (Typ IV Läsion) zu sehen, weswegen sie „Präatherom“ heißt. Das „Atherom“ ist durch den Lipidkern, der teilweise kalzifiziert sein kann, definiert. Weiter findet sich eine Umstrukturierung und Verdickung der Intima, sowie eine Ansammlung von Proteoglykanen, Schaumzellen und Mastzellen. Der Übergang zur Typ V Läsion, das „Fibroatherom“, ist fließend. Diese Läsion ist gekennzeichnet durch die fibröse Kappe mit Vermehrung von Kollagen, glatten Muskelzellen, aber auch Plasmazellen und Makrophagen. Ein wesentlicher Unterschied zur vorherigen Läsion ist, dass die Typ V Läsion Lumen einengend ist und daher klinisch relevant sein kann. Von einer Typ VI Läsion spricht man, wenn es im Bereich der fibrösen Kappe zu Fissuren, Hämatomen oder Thrombenbildung kommt [5, 7].

Die eben beschriebene Pathohistologie mit dem Endpunkt der Thrombenbildung ist sehr relevant. Denn durch die Lumeneinengung kann es beispielsweise an den Koronarien zum Bild der koronaren Herzkrankheit (KHK) kommen und bei Festsetzen eines Thrombus im Gefäß resultiert eine Minderperfusion des nachgeschalteten Versorgungsareals. Im Fall der Koronarien mündet dies in einen Herzinfarkt. Aber auch Minderperfusions des Gehirns mit der Gefahr eines Schlaganfalls bei einem Thrombusgeschehen oder peripher arterielle Verschlusskrankheiten (pAVK) sind Folge dieser Pathohistologie.

Gesamtgesellschaftlich ist Atherosklerose ein brisantes Thema.

Im Statistischen Jahrbuch 2016 des Statistischen Bundesamtes (Daten aus dem Jahr 2014) war mit 8,4% bei den Männern und 7,7% bei den Frauen die Durchblutungsstörung des Herzmuskels die häufigste Todesursache.

An dritter Stelle, mit 6,4% bei den Männern und 4,7% bei den Frauen, folgte der akute Herzinfarkt [8]. Die Gesundheitskosten der Europäischen Union beliefen sich im Jahr 2009 aufgrund kardiovaskulärer Erkrankungen auf 9% der gesamten Ausgaben für Gesundheitsaufwendungen und dies, obwohl seit den 1980er Jahren die Mortalität aufgrund koronararterieller Erkrankungen gesunken ist [9].

Die bisherige Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen besteht aus zwei Säulen. Der konservativen Therapie, in der die Lebensstiländerung im Vordergrund steht, und der medikamentösen Therapie der oben genannten Risikofaktoren als sekundär präventiv eingreifender Baustein. Im Bereich der Lebensstiländerung liegen die Schwerpunkte auf Nikotinverzicht, gesunder Ernährung und Bewegung. Bei den Medikamenten stehen Statine zur Senkung der Lipide bei Hypercholesterinämie sowie die adäquate Therapie eines DM oder eines Hypertonus im Vordergrund. Auch die antithrombotische Therapie, meist mit Aspirin, bei Patienten mit DM und manifester Atherosklerose, kann eine sinnvolle Ergänzung der Therapie sein, da hierdurch das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse um 25% gesenkt werden kann [9].

## **1.2 Neuer Ansatz der Prävention der Atherosklerose - Biologicals**

Wie in Kapitel 1.1 dargestellt, ist es aufgrund der hohen Mortalität, aber auch der hohen Ausgaben im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen wichtig, nach neuen, effektiven und kostengünstigen Therapien zu suchen, die früher ansetzen als die heutigen Arzneimittel, und zwar optimalerweise bevor sich Atherosklerose manifestiert. Das heißt, das Ziel sollte die Primärprävention sein.

Eine Möglichkeit könnte dabei in der Biopharmazie bei den Biologicals liegen. Biologicals sind Medikamente, die seit über 200 Jahren im Einsatz sind und hierfür gentechnologisch von lebenden Organismen produziert werden oder aus lebenden Organismen bestehen. Beispiele sind Proteine (Erythropoetin, Insulin), monoklonale Antikörper (mAK) sowie Impfstoffe. Im Vergleich zu herkömmlichen Arzneimitteln, die chemisch synthetisiert werden, unterscheiden sich Biologicals in Herstellung, molekularer Größe, Komplexität, Stabilität und Darreichungsform [10, 11].



Ein Beispiel für einen mAK, der bereits in der Kardiologie Anwendung findet, ist Abciximab der GPIIb/IIIa Rezeptoren an der Oberfläche von Thrombozyten hemmt. Er wird jedoch tertiärpräventiv eingesetzt, und zwar bei akutem ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) im Rahmen einer percutaneous coronary intervention (PCI) [12].

Besser wäre es jedoch, Biologicals einzusetzen, die bei Patienten mit bekanntem Hochrisikoprofil für die Entstehung eines Herzinfarktes primärpräventiv eingreifen und so die Lebensstiländerungen, die ebenfalls primärpräventiv ansetzen, unterstützen. So wäre es möglich, das Risiko der Entstehung von Atherosklerose und ihrer Folgeerkrankungen im Gesamten deutlich zu verringern.

Zum Einsatz kommen Biologicals in weiteren Feldern, unter anderem in der Dermatologie bei Psoriasis, in der Rheumatologie bei entzündlich-rheumatischen Erkrankungen und in der Therapie von Tumorleiden [13].

Ein Beispiel eines mAK, der am Anfang der Entstehung der Rheumatoiden Arthritis (RA) eingesetzt wird, ist Infliximab. Infliximab bindet mit hoher Affinität an löslichen Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF $\alpha$ ), aber auch an transmembranös lokalisiertes TNF $\alpha$  und kann so zu Beginn der Erkrankung die Entzündung der Synovia, die Resorption des Knochens und den Abbau des Knorpels reduzieren [14]. TNF $\alpha$  ist eine Substanz, die eine Schlüsselrolle im Rahmen der Entzündung und des Gewebeumbaus einnimmt, denn es induziert beispielsweise die Produktion weiterer Zytokine oder lockt Entzündungszellen zu Gelenken [14].

### **1.3 Aufbau und Funktion von Antikörpern**

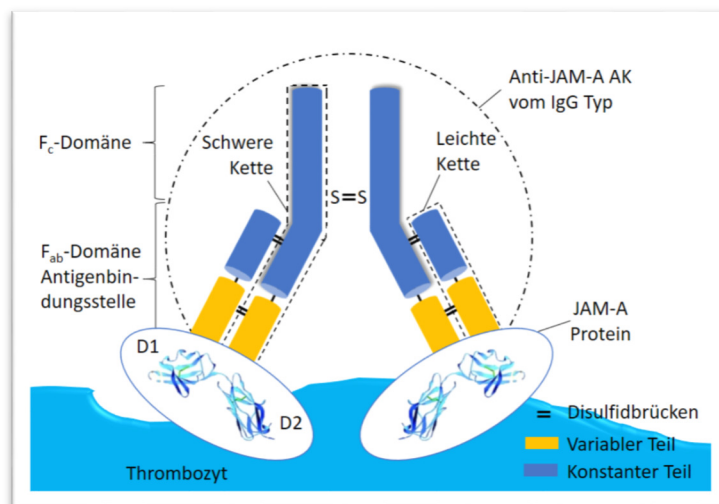
Antikörper (AK), die auch als lösliche Antigenrezeptoren bezeichnet werden, sind Stoffe der Gruppe der Immunglobuline (Ig). Sie werden im menschlichen Körper von aktivierten B-Zellen (Plasmazellen) produziert, aber auch auf der Oberfläche reifer B-Zellen exprimiert. Sie sind Teil der erworbenen, humoralen Immunantwort und teilen sich in fünf Klassen auf: IgM, IgG, IgA, IgD und IgE.

Jeder AK besitzt zwei schwere und zwei leichte Ketten, sowie zwei sog. Fragment antigen binding (Fab) Domänen und eine Fragment crystallizable (Fc) Domäne.

Die Fab-Domäne dient dem Binden des Antigens (AG), das zum Beispiel auf der Oberfläche von Bakterien exprimiert wird. Mit der Fc-Domäne kann der AK an spezielle Rezeptoren, die zum Beispiel auf Phagozyten exprimiert sind, binden und der Erreger kann phagozytiert werden. Weiter wird durch Bindung des AK das Komplementsystem der Körperzelle aktiviert und das Bakterium lysiert [15-17]. Auch eine Neutralisierung von Toxinen ist durch Antikörperbindung möglich. Dieses Prinzip macht man sich beispielsweise bei Verdacht auf eine Exposition mit einem von Tollwut befallenen Tier als sog. postexpositionelle Prophylaxe zusammen mit einer aktiven Schutzimpfung zu Nutze [18].

Eine weitere Gemeinsamkeit der Ig-Klassen ist, dass sie eine konstante und eine variable Region besitzen, wobei die sog. hypervariable Region die Antigen-spezifität bestimmt und die konstante die Ig-Klassenzugehörigkeit festlegt [17].

In Abbildung 1 ist die Grundstruktur eines AK des IgG Typs, wie zum Beispiel der in den Versuchen verwendete anti-JAM-A AK, schematisch dargestellt. Man sieht, wie der AK über seine Fab-Domäne an das AG bindet, in diesem Fall an das JAM-A Oberflächenprotein eines Thrombozyten, und die Bindungsstelle blockiert. Bei dem JAM-A Oberflächenprotein des Thrombozyten sind die extrazelluläre Polypeptidkette sowie die Ig-ähnlichen Domänen D1 und D2 dargestellt (entnommen aus [19]).



**Abbildung 1: Darstellung der Bindung eines anti-JAM-A AK vom IgG Typ über das JAM-A Oberflächenprotein eines Thrombozyten**

Der hier beispielhaft dargestellte anti-JAM-A AK vom IgG Typ bindet mit seiner Fab-Domäne über das Oberflächenprotein JAM-A eines Thrombozyten und blockiert die Bindungsstelle. Es sind leichte und schwere Ketten des AK dargestellt, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Weiter gibt es eine Fc- und zwei Fab-Domänen, sowie variable und konstante Anteile des AK. Das JAM-A Oberflächenprotein des Thrombozyten (Struktur der Schleifen) ist aus einer Abbildung von Prota et al. zur Struktur des JAM-A und der homodimeren Bindung zweier JAM-A Moleküle entnommen [19]. Zu erkennen sind hier die extrazelluläre Polypeptidkette sowie die Ig-ähnlichen Domänen D1 und D2 des JAM-A Proteins.

#### **1.4 Rolle von Thrombozyten und Dendritischen Zellen in der Atherosklerose**

Thrombozyten spielen bei der Hämostase eine wichtige Rolle und führen bei Dysfunktion zu erhöhter Blutungsneigung oder Thrombosen [20]. In den letzten Jahrzehnten hat sich gezeigt, dass Thrombozyten an Entzündungsprozessen wie der RA oder dem Systemischen Lupus Erythematoses beteiligt sind [21]. Auch in der Atherosklerose, bei der es sich um eine chronisch-entzündliche Erkrankung handelt [22-24], spielen sie bei der Entstehung, Aufrechterhaltung und dem Fortschreiten eine wesentliche Rolle [25, 26].

Eine Entzündung allgemein tritt bei Infektionen, aber auch bei mechanischem Stress, Reperfusion oder Ischämie auf [27, 28].

Im Rahmen der Atherosklerose adhären Thrombozyten an Endothelzellen (EC). Dies erfolgt auf zwei Wegen:

Thrombozyten können bei einer Plaqueruptur an EC binden, da durch die Ruptur bedingt extrazelluläre Matrixproteine (EMP) wie der von Willebrand Faktor (vWF) und Kollagen freigelegt werden [20, 29]. Die Bindung an den vWF findet über Glykoprotein (GP) Ib/IX/V (von Willebrand Rezeptorkomplex) statt [20], die Bindung an Kollagen über GPVI [30, 31]. Diese Bindungen ermöglichen die Aktivierung der Thrombozyten. Es kommt zur Transformationsänderung der Integrinrezeptoren  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (Fibrinogenrezeptoren, GPIIb/IIIa) [32] und Kollagenrezeptoren  $\alpha\text{2}\beta\text{1}$  [33], was die feste Bindung zwischen Thrombozyt und EC bedingt. Weiter wird die Plättchenaggregation durch die Bindung von Fibrinogen und  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  erleichtert [32].

Auf dem zweiten Weg binden Thrombozyten an intakte, aktivierte EC [34]. Theilmeier et al. zeigten 2002, dass im Rahmen von Hypercholesterinämie endothelialer vWF exprimiert wird und damit Thrombozyten an die für Atherosklerose prädisponierten Orte gelockt werden [35]. Es kommt hier also zu einer Bindung der Thrombozyten an die EC ohne vorherige Plaqueruptur. P-Selektine führen im Weiteren zur lockeren Bindung zwischen zirkulierenden Thrombozyten und EC („platelet rolling“) [28, 36]. Ein weiterer Unterschied zu dem vorherig beschriebenen Bindungsweg zwischen Thrombozyten und EC ist, dass für den Schritt des „platelet rolling“ keine vorherige Thrombozytenaktivierung erforderlich ist [29]. Diese Aktivierung der Thrombozyten erfolgt im Rahmen der Thrombozytenadhäsion [29]. Das P-Selektin der EC bindet über PSGL-1 [37] und GPIb/IX/V [38] der Thrombozyten. Die darauffolgende feste Bindung zwischen Thrombozyt und EC erfolgt über  $\beta\text{3}$  Integrin und Fibrinogen [29, 39].

Im Weiteren exprimieren und sezernieren aktivierte Thrombozyten mitogene und inflammatorische Substanzen. Bei diesen Substanzen handelt es sich um Chemokine, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsproteine und Zytokin-ähnliche Stoffe.

Durch sie werden Eigenschaften wie Chemotaxis und Adhärenzverhalten der EC beeinflusst, was wiederum Chemotaxis, Adhärenz und Transmigration von Monozyten unterstützt [29, 40, 41]. Monozyten sind wiederum Zellen, die ebenfalls wesentlich an Atherosklerose beteiligt sind [23].

Beispiele Zytokin-ähnlicher Stoffe sind Interleukin-1 beta (Il-1 $\beta$ ) und Cluster of differentiation 40L (CD 40L) [42, 43]. Il-1 $\beta$  aktiviert weitere EC [42] und führt zur Sekretion von monocyte chemoattractant proteine-1 (MCP-1) [44], ein Protein, das Monozyten zu Entzündungen lockt [29]. Il-1 $\beta$  steigert ebenfalls die Expression der Adhäsionsmoleküle Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) und  $\alpha\beta$ 3 auf EC, was die Adhäsion von Monozyten und Neutrophilen an EC fördert [44]. ICAM-1 und MCP-1 wiederum aktivieren den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und dadurch werden vermehrt Chemokine abgelesen [45, 46].

Alle beschriebenen Mechanismen fördern so über verschiedene Wege Inflammation, eine wichtige Grundlage der Atherosklerose. Thrombozyten sind dabei sehr wesentliche Mitspieler und stellen daher einen möglichen wichtigen Ansatzpunkt zur Therapie der Atherosklerose dar.

Eine bisher nicht hinreichend verstandene Zellpopulation im Rahmen der Atherosklerose sind Dendritische Zellen (DCs). Es sind Antigenpräsentierende Zellen (APC), die sich in Lymphorganen, nicht zu Lymphorganen gehörenden Organen sowie im Blut finden [47]. Weiter konnten sie in humanen Arterien im Bereich der Intima nachgewiesen werden [48-50]. DCs spielen bei der angeborenen und erworbenen Immunität eine wichtige Rolle [51, 52], wobei sie bei Atherosklerose mit T-Zellen interagieren. Hierdurch lösen DCs deren Aktivierung aus, fördern deren Proliferation und führen zur Ausschüttung von TNF $\alpha$  und Interferon gamma (INF $\gamma$ ) [47, 53, 54]. TNF $\alpha$  wiederum, aber auch Il-1 $\beta$ , wurden im Rahmen von Angina pectoris (AP) vermehrt durch DCs ausgeschüttet und wirken proinflammatorisch [55].

Van Vre et al. [56] sowie Yilmaz et al. [57] zeigten, dass sich bei Patienten mit koronarer arterieller Erkrankung im Blut geringere Konzentrationen von DC-Vorläuferzellen fanden, unabhängig davon, wie viele Gefäße befallen waren.

Dafür zeigten sich vermehrt DCs in instabilen und weiter fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques [58, 59].

Es konnte durch Paulsen et al. immunhistochemisch gezeigt werden, dass Cluster of differentiation 11c positive (CD11c<sup>+</sup>) DCs der Intima von Low-density-lipoprotein receptor deficient <sup>-/-</sup> (Ldlr <sup>-/-</sup>) Mäusen bei bestehender Hypercholesterinämie nach wenigen Tagen eine Lipidakkumulation aufwiesen [60]. Da diese DCs Schaumzellen ähneln, vermuten Paulsen und Kollegen, dass es sich um die früheste Form von atherosklerotischen Plaques handelt [60].

Die Rolle der DCs in der Atherosklerose wird jedoch kontrovers diskutiert. So konnten Bauriedel et al. nachweisen, dass DCs von Ratten nach einer Verletzung der Karotiden eine Neointima bilden [61]. B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) und Heat Shock Protein 47 (HSP 47) wurden vermehrt exprimiert [61]. Durch Hou et al. wiederum wurde gezeigt, dass Bcl-2 die Lebensspanne von DCs verlängert und ihre Immunogenität beeinflusst [62]. Gautier et al. machten sich dies zu Nutze und konnten so zeigen, dass DCs bei der Cholesterollhomöostase wesentlich beteiligt sind [63]. Und zwar führten DCs zu erniedrigten Cholesterolplasmawerten, was wiederum antiatherogenetisch wirkt [63].

Um die Rolle von DCs in der Atherosklerose zu verstehen, sind also weitere Untersuchungen nötig, um zu klären, ob sie proatherogenetisch oder antiatherogenetisch wirken, wovon dies abhängt und ob DCs eventuell auch in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung pro- bzw. antiatherogenetisch wirken können.

Dass es Interaktionen zwischen humanen Thrombozyten und DCs gibt, demonstrierten Langer et al. bereits 2007. Sie zeigten eine Interaktion als heterophile Zell-Zellverbindung über das  $\beta$ 2 Integrin MAC-1 auf DCs und JAM-C auf Thrombozyten [64]. In der erwähnten Versuchsreihe wurde ebenfalls eine mögliche Bindung zwischen MAC-1 und JAM-A untersucht, jedoch gab es hierfür keine aussagekräftigen Daten [64].

## 1.5 Junctional Adhesion Molecules (JAMs)

### 1.5.1 Allgemeines

Murine Junctional adhesion molecules (mJAMs) wurden 1998 von Martin-Padura et al. als transmembranöse Moleküle identifiziert [65]. Zu ihnen zählen als wichtigste Vertreter JAM-A (F11R), B und C, JAML und JAM4 [66].

JAMs sind zur Immunglobulin Superfamilie (IgSF) gehörende Proteine, und die humane Junctional Adhesion Molecule (hJAM) complementary Desoxyribonucleic acid (cDNA) weist eine große Homologie zur murinen cDNA auf [65, 67]. Liu et al. zeigten, dass 70% der Aminosäuresequenz muriner und humaner JAM-A Proteine identisch sind [68].

JAMs werden auf endothelialen und epithelialen Zellen sowie auf Leukozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Makrophagen und DCs exprimiert, wobei nicht jedes JAM Protein auf dem jeweiligen Zelltyp exprimiert wird [65, 67, 69]. Auch im Hinblick auf die Gewebeexpression der JAMs gibt es Unterschiede. Beispielsweise ist diese in der Leber und Niere sehr hoch, im Gewebe des Gehirns jedoch niedrig [67].

Immunhistochemisch konnte gezeigt werden, dass JAMs im Bereich von Tight junctions (TJ) der Epithel- und Endothelzellen lokalisiert sind [68, 70]. Bei einer Reovirusinfektion sind JAMs involviert und führen zur Endozytose des Virus [71]. Im Rahmen von Tumorgeschehen könnten JAMs auch eine wichtige Rolle spielen, da sie Angiogenese fördern und diese wesentlich für Tumorstadium ist [72]. Für JAM-C konnten Fuse et al. [73] beispielsweise bereits zeigen, dass eine Überexpression von humanem JAM-C bei HT 1080 Fibrosarkom Zellen im Vergleich zu Mäusen mit Fibrosarkom Zellen, die JAM-C nicht überexprimieren, die Lebensspanne von Mäusen signifikant verringert.

Weiter gibt es Erkenntnisse, dass JAM-A eine Rolle bei Atherosklerose spielt, wie dies in Kapitel 1.5.3 ausführlich beschrieben wird.

### **1.5.2 Grundstruktur**

Murine und humane JAMs besitzen eine extra- und intrazelluläre Komponente. Extrazellulär gibt es zwei Ig-ähnliche Domänen D1 und D2, sowie ein N-terminales Signalpeptid. In Abbildung 1 ist die D1 und D2 Domäne, wie sie durch Prota et al. beschrieben wurde, beispielhaft mit dargestellt (entnommen aus [19]). Intrazellulär findet sich ein einzelnes membranständiges Segment, ein kurzer zytoplasmatischer Anhang, sowie eine C-terminale PDZ Domäne, von der angenommen wird, dass sie die Interaktion zwischen Proteinen wie Zonula occludens-1 (ZO-1) oder Aktin Filament 6 (AF 6), die mit TJ assoziiert sind, und JAMs erleichtert [19, 66, 74].

### **1.5.3 Verschiedene Ergebnisse zur Rolle des JAM-A bei Atherosklerose**

JAM-A wurde als wichtiges Molekül der Thrombozytenadhäsion an aktivierte EC identifiziert [75, 76]. Es konnte durch Babinska et al. gezeigt werden, dass JAM-A und dessen messenger Ribonucleic acid (mRNA) in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques erhöht ist [77]. Außerdem wiesen sie nach, dass durch Zugabe von JAM-A Inhibitoren weniger Thrombozyten an durch TNF $\alpha$  und INF $\gamma$  aktivierte EC binden [77]. Papaspyridonos et al. [78] zeigten 2006, dass JAM-A im Bereich instabiler atherosklerotischer Plaques hochreguliert wird und Cavusoglu et al. [79] zeigten, dass die JAM-A Plasmawerte signifikant mit einem erhöhten Coronary Arterie Disease Score (CAD Score) assoziiert waren. Ebenso zeigten sie, dass eine signifikante Korrelation zwischen den Plasmaleveln von TNF $\alpha$  und JAM-A besteht [79]. Hierbei steigert TNF $\alpha$  die Expression von JAM-A in kultivierten EC [79]. TNF $\alpha$  wiederum ist ein Stoff des Immunsystems, der an Entzündungsprozessen wie Atherosklerose beteiligt ist [79]. TNF $\alpha$  und INF $\gamma$  führen zum Beispiel dazu, dass JAM-A, das normalerweise interzellulär lokalisiert ist, an die Oberfläche der entzündeten EC wandert. Ozaki et al. halten es für möglich, dass dies wiederum zu einem Rückgang der transendothelialen Migration von Leukozyten führt [80]. Andererseits zeigten Ostermann et al., dass JAM-A ein Ligand von LFA-1 ist und durch diese Bindung die Transmigration von Neutrophilen und T-Zellen unterstützt wird [81].



Eine weitere Rolle spielt JAM-A bei der Anlockung von Monozyten und T-Zellen zu atherogenen Regionen [82].

Zernecke et al. konnten 2006 nachweisen, dass Apolipoprotein E (Apo E) - negative und JAM-A Rezeptor-negative Mäuse bei einer arteriellen Verletzung eine reduzierte Infiltration von Makrophagen und eine geringere Bildung neointimaler Läsionen aufweisen [83]. Hierzu gibt es jedoch widersprüchliche Daten, denn Zhao et al. zeigten 2017, dass ein Fehlen von JAM-A auf Thrombozyten von Apo-E<sup>-/-</sup> Mäusen mit Hyperlipidämie in den frühen Phasen einer vaskulären Verletzung die neointimale Bildung beschleunigt, indem vermehrt mononukleäre Zellen einwandern [84]. Weiter gibt es neueste Daten, die zeigen, dass bei Fehlen von JAM-A auf Thrombozyten ihr Grenzwert, der zur Aktivierung nötig ist, sinkt, und es zeigten sich verstärkte Entzündungsaktivitäten [85]. Hierdurch wiederum nimmt die Plaquebildung vor allem in den frühen Stadien der Atherosklerose zu [85].

### **1.6 Expression von JAM-A und EMMPRIN auf humanen und murinen Thrombozyten und Dendritischen Zellen**

Williams et al. demonstrierten 1999 mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Analyse, dass hJAM sowohl auf humanen Thrombozyten, als auch auf CD14<sup>+</sup> Monozyten sowie auf je 50% der B- und T-Lymphozyten exprimiert wird [67]. Da DCs aus Monozyten entstehen können liegt es nahe, dass auch humane DCs (hDCs) hJAM exprimieren [86, 87]. Ogasawara et al. zeigten 2009, dass hDCs hJAM-A exprimieren und bei Entstehung aus Monozyten dieses zusätzlich vermehrt exprimiert wird [88]. Der Nachweis, dass murine Thrombozyten und murine DCs (mDCs) JAM-A exprimieren, erfolgte durch Malergue et al. [69] und Cera et al. [89].

Die Expression von EMMPRIN auf humanen Thrombozyten *in vivo* wurde durch Pennings et al. 2010 gezeigt [90]. Schmid et al. zeigten, dass EMMPRIN auf humanen Thrombozyten exprimiert wird und bei Aktivierung der Thrombozyten hochreguliert wird [91].

Für murine Thrombozyten zeigten Seizer et al. indirekt die Expression von EMMPRIN. Denn durch anti-EMMPRIN AK konnte die Interaktion von murinen Thrombozyten mit Cyclophilin A gehemmt werden [92]. Dass EMMPRIN auch auf hDCs lokalisiert ist, zeigten Woodhead et al. [93] sowie Leitner et al. [94].

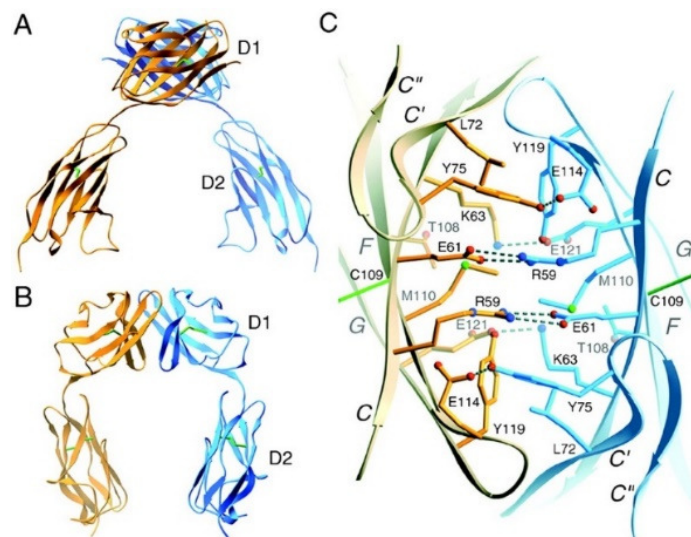
Bisher wurde keine Expression von EMMPRIN auf mDCs veröffentlicht, jedoch zeigt sich eine Expression von EMMPRIN auf murinen Leukozyten, die beispielsweise im Rahmen der Experimentellen Autoimmun Enzephalomyelitis vor Auftreten der ersten Symptome hochreguliert wird [95]. Auch auf murinen Monozyten, Neutrophilen und aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte eine EMMPRIN Expression nachgewiesen werden [96]. Da sich Leukozyten wiederum unter anderem in DCs differenzieren können, und DCs auch aus Monozyten hervorgehen können [97], war die Annahme wahrscheinlich, dass auch mDCs EMMPRIN exprimieren. Dass mDCs tatsächlich EMMPRIN exprimieren, konnte in einem Teilprojekt 2 der DFG KFO 274: „Struktur und Funktion thrombozytär exprimierter JAMs - Charakterisierung neuer heterophiler Interaktionen“ in der AG Langer, Kardioimmunologie, Universität Tübingen, unter der Leitung von Prof. Dr. med. Harald Langer, mittels FACS Analyse gezeigt werden (nicht publizierte Ergebnisse).

### **1.7 Homotypische und heterotypische Zell-Zellverbindung am Beispiel von JAM-A und EMMPRIN**

Homotypisch kommt wie auch heterotypisch aus dem Griechischen. Homos bedeutet *gleich*, heter *abweichend* und typos *Prägung*. Somit versteht man unter einer homotypischen Bindung eine Verbindung zwischen zwei gleichen Partnern, in dieser Arbeit also zwischen zwei JAM-A Molekülen oder zwischen zwei EMMPRIN Molekülen, und unter einer heterotypischen Verbindung die Bindung zwischen zwei verschiedenen Partnern, hier also zwischen JAM-A und EMMPRIN [98].

Ein anderer Begriff, der in der Literatur im Zusammenhang mit der homotypischen Bindung synonym verwendet wird, ist homodimer bzw. für heterotypisch heterodimer, wobei die Silbe -dimer ebenfalls aus dem Griechischen kommt und *Teil* bedeutet. In dieser Arbeit werden für die jeweiligen Bindungen die Begriffe homo- und heterotypisch verwendet.

Der Nachweis, dass zwei hJAM-A Proteine homotypisch binden können, wurde durch Prota et al. 2003 demonstriert [19]. Dabei beschrieben sie, dass die Bindung durch vier Salzbrücken sowie zusätzliche Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen im Bereich der D1 Domäne des N-Terminus erfolgt. Eine schematische Darstellung dieser Bindung, wie sie Prota et al. veröffentlicht haben, ist in Abbildung 2 zu sehen [19].



**Abbildung 2: Struktur eines humanen Junctional Adhesion Molecule A Dimers**

A, B) Abgebildet ist ein humanes JAM-A Dimer, wobei ein Monomer blau, das andere orange dargestellt ist. Zu sehen ist die extrazelluläre Polypeptidkette, die sich in zwei Ig-ähnliche Domänen D1 und D2 faltet. Es ist jeweils der orthogonale Blickwinkel zu sehen C) Hier ist in einer Detaildarstellung die Interaktion zweier D1 Domänen von zwei JAM-A Monomeren dargestellt [19]

Der Nachweis, dass die homotypische Bindung auch zwischen zwei murinen JAM-A (mJAM-A) Molekülen möglich ist, zeigten sowohl Bazzoni et al. [99] als auch Kostrewa et al. [70]. Prota et.al beschrieben, dass sich die murine homotypische Bindung von der humanen in der Konformation unterscheidet [19]. Beispielsweise weist die Bindung zweier mJAM-A Monomere nur zwei Salzbrücken und weniger zusätzliche Bindungsstellen auf, und die Schnittstelle zwischen den beiden murinen Monomeren ist kleiner als zwischen zwei hJAM-A Proteinen [19].

Zu einer möglichen heterotypischen Bindung zwischen den Proteinen JAM-A und EMMPRIN gibt es bisher keine Veröffentlichung. Jedoch gibt es andere bekannte Bindungspartner, über die JAMs bzw. EMMPRIN heterotyp binden können. Martínez-Estrada et al. zeigten beispielsweise, dass JAM mit Calcium/ Calmodulin-dependent Serine Protein Kinase (CASK/ LIN-2) eine heterotypische Bindung eingeht, wobei diese über die jeweilige PDZ-Domäne erfolgt [100]. EMMPRIN bindet beispielsweise über Annexin A2 [101]. Über weitere Schritte werden hierdurch Tumorzellbewegungen und die Entstehung von Metastasen gefördert [101].

## **1.8 Fragestellung der Arbeit**

In dieser Arbeit soll anhand von statischen Adhäsionsassays unter Verwendung von murinen und humanen Thrombozyten sowie DCs untersucht werden, ob diese beiden Zelltypen über eine heterotypische Bindung zwischen JAM-A und EMMPRIN interagieren.

JAM-A und EMMPRIN sind Oberflächenproteine, die auf den jeweiligen Zellen exprimiert werden und bei Atherosklerose eine Rolle spielen.

Atherosklerose wiederum hat gesamtgesellschaftlich eine große Relevanz und bedarf der weiteren Forschung, um neue Therapieansätze zu finden.

Ebenfalls hat sich in den letzten Jahrzehnten die wichtige Rolle der Thrombozyten im Rahmen von Atherosklerose gezeigt, und auch für DCs gibt es Hinweise, dass diese bei dem Krankheitsbild eine wesentliche Rolle spielen und zwischen Thrombozyten und DCs Interaktionen stattfinden.

Ein Nachweis der heterotypen Bindung zwischen dem Rezeptor-Liganden Paar JAM-A - EMMPRIN wäre daher ein möglicher neuer Ansatz zur Therapie der Atherosklerose, aber auch bei anderen kardiovaskulären Erkrankungen könnte es ein möglicher Ansatzpunkt für neue Therapien sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material, Geräte und Bezugsquellen

**Tabelle 1: Materialien und Geräte**

<b><u>Allgemeine Materialien und Geräte</u></b>	<b><u>Bezugsquelle</u></b>
96-Well Platte	Corning Inc.
Eppendorf-Cup-Ständer	Brand, Wertheim
Falconständer	Brand, Wertheim
IKAMAG RCT basic Magnetrührer	IKA Werke, Staufen
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Objektträger	Brand, Wertheim
Pipette Eppendorf research	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Accu Jet Pro	Brand, Wertheim
Sterilbank HERAsafe	Hereaus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Transferpipette	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellzählautomat Se 9000	Sysmex, Kobe, Japan
Butterfly Multifly Set	Braun, Melsungen
Einmalspritze (20 ml)	Braun, Melsungen
Falcon - Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Eppendorf Cups	Eppendorf, Hamburg
Milllex-GS Filtereinheit, 0,22 µm, hydrophil	Millipore, Bedford, USA
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Costar, Bodenheim
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
B.Braun, Sterican Einmalkanüle Größe 18	Braun, Melsungen
Sarstedt Membranadapter	Sarstedt, Nümbrecht
Pur-Zellin Zellstofftupfer	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Desinfektionsspray	Schülke & Mayr, Norderstedt
Stauschlauch	Kimetec, Ditzingen
pH Meter	Hanna Instruments, Kehl a.R.
Feinwaage ED6202S	Sartorius
FACS-Röhrchen	BD Biosciences
Glaspasteurpipetten	Brand, Wertheim
Glasküvette 450 µl	ChronoLog, Leiden, Niederlande
Citratpuffer	Thermo Fisher, Fremont, USA
Lichtmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Zentrifuge Multifuge 1S	Heraeus, Eppendorf

Zentrifuge (klein)	Heraeus, Eppendorf
Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung, PBS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
<b><u>Pufferlösungen und Medien</u></b>	<b><u>Bezugsquelle</u></b>
<u>ACD Puffer (Acid-Citrate-Dextrose)</u>  12,5 g Natriumcitrat 6,82 g Citronensäure 10 g Glukose Aqua dest. ad 500 ml, mit Natriumhydroxid (NaOH) auf pH 4,69 einstellen und sterilfiltrieren	Sigma, St. Louis, USA Sigma, St. Louis, USA Merck, Darmstadt Millipore, Bedford, USA Merck, Darmstadt
<u>Tyrodes Puffer (10x)</u>  80 g Natriumchlorid (NaCl) 10,15 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> ) 1,95 g Kaliumchlorid Aqua dest. ad 1000 ml und sterilfiltrieren	Sigma, St. Louis, USA Merck, Darmstadt  Sigma, St. Louis, USA
<u>Tyrodes Gebrauchslösung mit pH 7,4 oder 6,5 + je 0,1% Glucose/BSA</u>  20 ml Tyrodes Puffer (10x) 0,2 g Bovines Serumalbumin Fraktion V 96% (BSA) 0,2 g Glukose Aqua dest. ad 200 ml mit HEPES auf pH 7,4 einstellen, 50 ml abnehmen und Rest mit HCl auf pH 6,5 einstellen und Sterilfiltrieren	AppliChem GmbH, Darmstadt  Carl Roth GmbH, Karlsruhe Merck, Darmstadt
<u>DC Medium</u>  500 ml VLE RPMI-1640 50 ml FKS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich PAA Laboratories, Pasching, Österreich

5ml HEPES 1,8 µl β - Mercaptoethanol 5 ml Penicillin-Streptomycin Lösung	Sigma-Aldrich, München PAA Laboratories, Pasching, Österreich
<u>Ammoniumchlorid Puffer</u>  155 mM NH <sub>4</sub> CL 12 mM NaHCO <sub>3</sub> 1,1 mM EDTA	Applichem GmbH, Darmstadt Applichem GmbH, Darmstadt Sigma-Aldrich, München
<b><u>Isolation, Kultivierung und Ernten von DCs (human und murin)</u></b>	<b><u>Bezugsquelle</u></b>
Brutschrank Hera Cell 24	Hereaus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Ficoll Trennlösung	Biochrom, Berlin
Trypan Blue solution 0.4%	Sigma Aldrich, München
Zellkulturflaschen	Corning Inc.
Human IL-4	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mouse GM-CSF	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Human GM-CSF	Sargramostim Leukine®
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Filter 70µm Cell Strainer	Corning Inc. New York, USA
Türks Lösung	Merck Millipore, Darmstadt
Isofluran CP®	Henry Schein VET GmbH, Hamburg

**Tabelle 2: Verwendete Antikörper und Proteine**

<b><u>Verwendete Antikörper</u></b>	<b><u>Material</u></b>	<b><u>Bezugsquelle</u></b>
<u>Human</u>	Anti-human JAM-A Antibody	R & D Systems, Minneapolis, USA
	Anti-human EMMPRIN	R & D Systems, Minneapolis, USA
	Purified Human IgG	R & D Systems, Minneapolis, USA



<u>Murin</u>	Anti-JAM-A, clone BV11  Rabbit Anti-Bsg Polyclonal Antibody  Mouse IgG Antibody	Millipore, Bedford, USA  Creative BioMart, New York, USA  R & D Systems, Minneapolis, USA
<u>Verwendete Proteine</u>  <u>Human</u>     <u>Murin</u>	<u>Material</u>  Recombinant Human JAM-A Fc Chimera  Recombinant Human EMMPRIN Fc Chimera  Recombinant Human IgG1 Fc  Recombinant Mouse JAM-A Fc Chimera  Recombinant Mouse BSG / CD147 / Fc Chimera  Recombinant Mouse IgG2A Fc	<u>Bezugsquelle</u>  R&D Systems, Minneapolis, USA  R&D Systems, Minneapolis, USA  R & D Systems, Minneapolis, USA  R & D Systems, Minneapolis, USA  Sino Biological Inc., Beijing, China  R & D Systems, Minneapolis, USA

## 2.2 Isolation der humanen und murinen Zellen

### 2.2.1 Allgemeines

Bei der Isolation der Zellen wurde als Zentrifuge folgendes Modell verwendet: Multifuge® 1S von Heraeus. Die angegebenen Werte für die Umdrehungen pro Minute (U/ Min.) bzw. revolutions per minute (rpm) beziehen sich im Folgenden immer auf dieses Modell.

### **2.2.2 Thrombozytenisolation aus humanem Vollblut**

Für die Isolation der Thrombozyten wurde Vollblut von jungen, gesunden Probanden verwendet. Zunächst Desinfektion, Stauung und Punktion der Vena mediana cubiti mittels Butterfly Kanüle und Entnahme von 16 Milliliter (ml) Vollblut. Die Abnahme erfolgte dabei langsam, um eine Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Zur Entnahme wurden 20 ml Einmalspritzen verwendet. Diese enthielten als Antikoagulantium jeweils 4 ml ACD Puffer. Direkt nach der Entnahme vorsichtiges Schwenken der Spritze, um Vollblut und ACD Puffer zur Gerinnungshemmung zu vermischen. Nach der Entnahme wurden vorsichtig je 10 ml der Mischung in ein 15 ml Falcon überführt, und es folgte die Zentrifugation bei 1000 U/ Min. bei Raumtemperatur (RT) für 20 Min. ohne Bremse. Durch die Zentrifugation setzte sich plättchenreiches Plasma (PRP) ab, das mit einer Transferpipette entnommen wurde. Je max. 10 ml des PRP wurden in ein 50 ml Falcon gegeben und jedes Falcon mit Tyrodes pH 6,5 auf 35 ml aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation (2100 U/ Min., 10 Min., RT mit Bremse) wurden die Überstände abgenommen und das zurückbleibende Pellet in 500 µl Tyrodes pH 6,5 resuspendiert. Zum Neutralisieren wurde die gleiche Menge Tyrodes pH 7,4 hinzugegeben und alles gemischt. Die anschließende Thrombozytenzählung erfolgte am Zellzählautomat Se 9000® der Firma Sysmex. Hierzu wurde eine 1:10 Verdünnung mit Zellsuspension und Tyrodes pH 7,4 hergestellt.

### **2.2.3 Isolation, Kultivierung und Ernte humaner Dendritischer Zellen**

Für die Isolation der hDCs wurden Buffy Coats von gesunden Probanden verwendet. Die Buffy Coats wurden über die Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen bezogen. Alle weiter aufgeführten Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Zunächst wurde in 4 Falcons je 12 ml Ficoll mit der Dichte 1,077 pipettiert. Danach wurde je ein Buffy Coat in eine Zellkulturflasche überführt und jede Zellkulturflasche mit PBS auf 120 ml aufgefüllt und alles gemischt. Anschließend wurden je 30 ml der Mischung über das vorbereitete Ficoll geschichtet und für 15 Min. bei 2000 rpm, ohne Bremse zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde mittels einer Pasteurpipette die weiße Zellschicht, die hauptsächlich aus Lymphozyten und Monozyten besteht, entnommen und auf 4 Falcons à 50 ml verteilt. Jedes Falcon wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 5 Min. bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Abnehmen der Überstände erneut mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, das Ganze resuspendiert und für 5 Min. bei 1500 rpm zentrifugiert. Danach folgten zwei Thrombozytenwaschschritte. Hierzu wurde das Pellet in 20 ml PBS resuspendiert und bei 800 rpm für 12 Min. zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in 40 ml DC Medium aufgenommen und die Zellen gezählt. Hierzu wurde eine 1:10 Verdünnung mit 10µl Türks-Lösung, 80µl DC Medium und 10µl Zellsuspension hergestellt und mittels Neubauer-Zählkammer gezählt.

Zur Berechnung der absoluten Zellzahl nach dem Auszählen galt:

$$\begin{aligned} & \text{Anzahl gezählter Zellen} \times 10 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \\ & \times 40 \text{ (ml Medium, in dem DCs gelöst sind)} \times 10^4 \end{aligned}$$

Pro Zellkulturflasche wurden  $1 \times 10^8$  Zellen in 10 ml DC Medium ausgesät und für 2 Stunden bei 37°C im Inkubator kultiviert. Dieser Inkubationsschritt erlaubt die Adhäsion der Monozyten an der Zellkulturflasche. Die nicht adhärenen Lymphozyten werden dann bei einem Waschschrift (3-mal PBS, 3-mal DC Medium) entfernt. Nach dem Spülen wurden in jede Zellkulturflasche erneut 10 ml DC Medium pipettiert, und es erfolgte die Zugabe der Zytokine Il-4 (c = 20 Nanogramm (ng)/ml) und Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) (c = 100 ng/ml). Die Zugabe der Zytokine erfolgte auch an Tag 2, 4 und 6. Während der Kultivierungszeit befanden sich die Zellkulturflaschen bei 37°C im Inkubator.

Das Ernten der Zellen erfolgte an Tag 7. Hierzu wurde mit dem in den Zellkulturflaschen befindlichen DC Medium zehn Mal gespült. Nach dem Spülen wurde das DC Medium in Falcons à 50 ml pipettiert. Ein erneutes Spülen (10-mal) erfolgte mit PBS. Das PBS wurde zu den Falcons hinzugefügt. Nach mikroskopischer Kontrolle auf noch adhärenente Zellen erfolgte die Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 Min.. Das gewonnene Pellet wurde in 10 ml DC Medium gelöst.

Es folgte die Zellzählung mit einer Verdünnung von 1:2. Hierzu wurden 10µl der Zellsuspension, sowie 10µl Türks-Lösung gemischt und mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt, wobei hier ebenfalls die Formel zur Berechnung der absoluten Zellzahl aus Kapitel 2.2.2 zur Anwendung kam, jedoch unter Verwendung des Verdünnungsfaktors 2.

#### **2.2.4 Thrombozytenisolation aus murinem Vollblut**

Zur Blutentnahme wurden die Mäuse mittels Inhalationsnarkose (Isofluran: 5,0 rel. Vol. % in der Anästhesiekammer bei einem Sauerstoff-Flow von 1l/ Min.) narkotisiert. Dann Punktion des retrobulbären Venenplexus mittels einer Citrat beschichteten Glaskapillare. Das Vollblut wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße abgenommen, als Antikoagulantium diente Citrat im Verhältnis 1:10. Die Blutentnahme erfolgte durch Sarah Gekeler, Medizinisch-Technische-Assistentin (MTA) der AG Langer, Kardioimmunologie, Universität Tübingen. Das Blut wurde in FACS Röhrchen überführt und mit Tyrodes pH 6,5 auf 2 ml aufgefüllt. Es folgte die Zentrifugation bei 120 x g für 20 Min. ohne Bremse, anschließend wurde das PRP mittels Transferpipette entnommen und in neue FACS Röhrchen überführt. Auffüllen mit Tyrodes pH 6,5 auf 4 ml und erneute Zentrifugation bei 2600 x g für 10 Min. mit Bremse. Das entstandene Pellet wurde in 250µl Tyrodes pH 6,5 resuspendiert und mit 250µl Tyrodes pH 7,4 neutralisiert. Es folgte die Zellzählung am Zellzählautomat Se 9000® der Firma Sysmex. Hierzu wurde eine 1:10 Verdünnung mit Zellsuspension und Tyrodes pH 7,4 hergestellt.

#### **2.2.5 Isolation, Kultivierung und Ernte muriner Dendritischer Zellen**

Die Entnahme der murinen Knochen erfolgte durch Sarah Gekeler, MTA AG Langer, Kardioimmunologie, Universität Tübingen.

Nach der Entnahme der Knochen wurden diese mittels Pinzette und EtOH gesäubert, mit DC Medium abgewaschen und in eine Petrischale mit DC Medium auf Eis überführt. Den Knochen wurden die Epiphysen entfernt und das Knochenmark wurde mittels einer Braun Sterican® 18er Einmalkanüle und DC Medium ausgespült.

Das gewonnene Gemisch wurde über einen 70µm Filter in ein neues Falcon filtriert und anschließend bei 1200 rpm für 5 Min. bei RT mit Bremse zentrifugiert. Zum Lysieren der Erythrozyten wurde für 5 Min. in 1 ml Ammoniumchlorid Puffer inkubiert. Zum Neutralisieren Zugabe von 10 ml DC Medium und nochmals Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 Min.. Das Pellet wurde in 20 ml DC Medium resuspendiert, mit einem 70µm Filter filtriert und bei 1200 rpm für 5 Min. zentrifugiert. Das Pellet wurde in 18 ml DC Medium resuspendiert. Pro 1 ml DC Medium mit DCs wurden 0,1µl murines GM-CSF (mGM-CSF) mit c = 200 µg/ ml hinzugefügt. Je 3 ml wurden in ein Well einer 6-Well Platte pipettiert. Ein Medienwechsel erfolgte an Tag 2, 4 und 6 jeweils unter Zugabe von mGM-CSF.

An Tag 7 wurden die mDCs geerntet. Hierzu wurde zunächst das in den Well befindliche DC Medium verworfen, mit frischem DC Medium mehrmals gespült und dieses in Falcons gegeben. Anschließend mikroskopische Kontrolle auf noch adhärenente mDCs. Ggf. wurden diese Schritte wiederholt. Zum Zählen der mDCs wurde eine 1:10 Verdünnung mit 10µl Trypanblau, 80µl DC Medium und 10µl Zellsuspension hergestellt und mittels Neubauer-Zählkammer gezählt.

Zur Berechnung der absoluten Zellzahl nach dem Auszählen galt:

$$\begin{aligned} & \text{Anzahl gezählter Zellen} \times 10 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \\ & \times x \text{ ml (ml Medium, in dem mDCs gelöst sind)} \times 10^4 \end{aligned}$$

## **2.3 Durchführung der Adhäsionsassays unter statischen Bedingungen**

### **2.3.1 Humane Dendritische Zellen oder humane beziehungsweise murine Thrombozyten über immobilisiertem Protein**

Wells einer 96-Well Platte wurden mit je 60µl JAM-A Fc, EMMPRIN Fc, Kontroll Fc (c = 10 µg/ml) oder BSA 4% bei 4°C über Nacht beschichtet. Am folgenden Tag trockneten die Wells für 30 Min. bei RT, anschließend wurde mit 50µl BSA 4% für 30 Min. bei RT blockiert. Die Wells wurden mit PBS gewaschen.

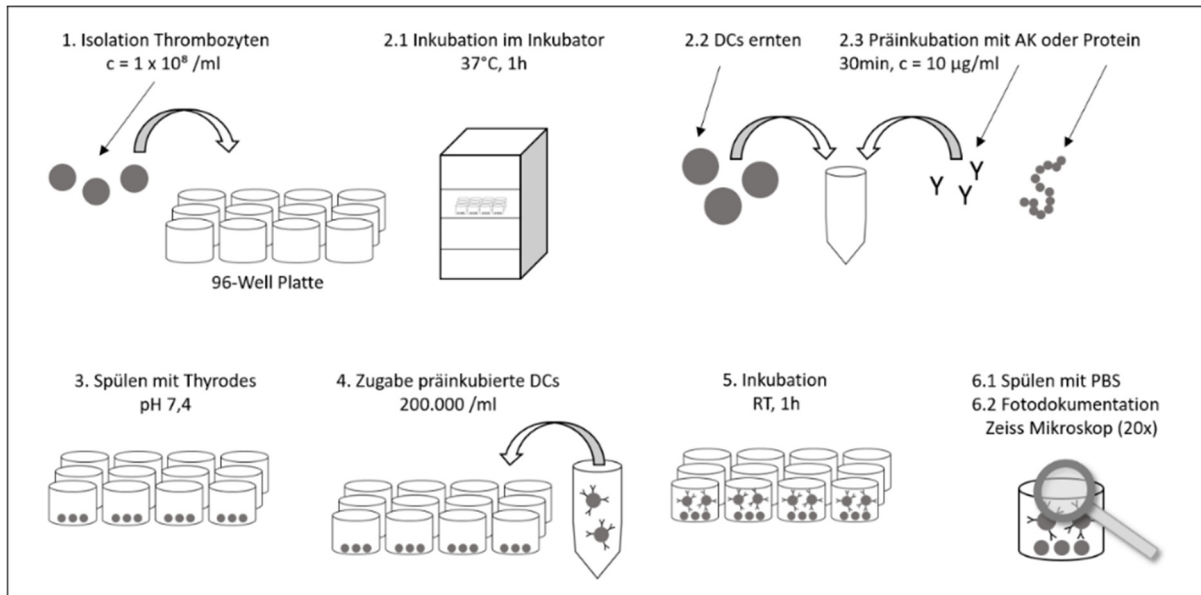
Während der verschiedenen Wartezeiten wurden die humanen oder murinen Thrombozyten isoliert (siehe Kapitel 2.2.2 bzw. 2.2.4) bzw. hDCs geerntet (siehe Kapitel 2.2.3) und die notwendigen Konzentrationen hergestellt. Pro Well wurden 100µl Thrombozyten- ( $c = 2 \times 10^7$ /ml) oder DC-Zellsuspension ( $c = 2 \times 10^5$ /ml) zugegeben. Nach Zugabe der humanen oder murinen Thrombozyten bzw. hDCs auf die immobilisierten Proteine erfolgte die Inkubation für 1 Stunde bei RT. Nach einem Waschschrift erfolgte die Fotodokumentation der jeweiligen Triplikate mit dem ZEISS Lichtmikroskop Axiovert 200. Es wurde bei hDCs und humanen Thrombozyten eine 10-fach Vergrößerung verwendet, bei murinen Thrombozyten eine 20-fach Vergrößerung.

### **2.3.2 Antikörper oder Protein behandelte humane Dendritische Zellen über immobilisierten humanen Thrombozyten**

Die humanen Thrombozyten wurden auf eine Konzentration von  $1 \times 10^8$  /ml eingestellt. Pro Well einer 96-Well Platte wurden 60µl Zellsuspension pipettiert und diese wurde zur Adhärenz der Zellen für 1 Stunde bei 37°C in den Inkubator gestellt. Nach einem Waschschrift erfolgte die mikroskopische Kontrolle des Zell-Monolayers.

Während der Adhäsionszeit der humanen Thrombozyten wurden hDCs geerntet (Kapitel 2.2.3), eine Konzentration der hDCs von  $c = 2 \times 10^5$  /ml hergestellt und diese mit den jeweiligen AK oder Proteinen ( $c = 10 \mu\text{g/ml}$ ) für 30 Min. inkubiert. Die inkubierten hDCs wurden anschließend zur Adhärenz für 1 Stunde bei RT auf die immobilisierten humanen Thrombozyten gegeben. Nach einem Waschschrift erfolgte die Fotodokumentation der jeweiligen Triplikate am ZEISS Lichtmikroskop Axiovert 200 mit einer 20-fach Vergrößerung.

Beispielhaft ist in Abbildung 3 die Versuchsdurchführung der Adhäsion von hDCs auf immobilisierten humanen Thrombozyten dargestellt.



**Abbildung 3: Darstellung der Versuchsdurchführung präinkubierte humane Dendritische Zellen über immobilisierten humanen Thrombozyten**

Zu sehen ist zunächst der Isolationschritt der humanen Thrombozyten, auf den die Inkubation im Inkubator folgt. Während dessen Präinkubation der hDCs mit AK oder Protein. Diese werden in einem weiteren Schritt auf die humanen Thrombozyten gegeben, alles wird inkubiert und anschließend erfolgt die Fotodokumentation mit dem ZEISS Lichtmikroskop Axiovert 200 in einer 20-fach Vergrößerung.

### **2.3.3 Antikörper präinkubierte murine Dendritische Zellen über immobilisiertem EMMPRIN Fc**

Zunächst Zugabe von je  $60 \mu\text{l}$  EMMPRIN Fc pro Well einer 96-Well-Platte ( $c = 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die Well-Platte kam über Nacht zur Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  in den Kühlschrank. Am folgenden Tag Überstände absaugen, trocknen der Well-Platte für 30 Min. bei RT und anschließende Blockierung mit BSA 4 % für 30 Min.. Die Überstände erneut absaugen und mit PBS waschen. Während den Wartezeiten mDCs ernten und zählen (Kapitel 2.2.5). Für diese Versuchsreihe Präinkubation der mDCs ( $c = 2 \times 10^5 / \text{ml}$ ) mit anti-JAM-A AK, anti-EMMPRIN AK und der Kontrolle (jeweils  $c = 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die präinkubierten mDCs wurden auf das immobilisierte EMMPRIN Fc pipettiert und inkubierten für 1 Stunde bei RT.

Danach Überstände absaugen, mit DC Medium waschen, jedes Well mit DC Medium auf 100µl auffüllen und mit dem ZEISS Lichtmikroskop Axiovert 200 bei einer 20-fach Vergrößerung die Bilder zur Fotodokumentation erstellen.

## **2.4 Dokumentation der Versuche und Methodik der statistischen Datenanalyse**

Die Fotodokumentation der Versuche erfolgte mit dem ZEISS Lichtmikroskop Axiovert 200. Die verwendete Vergrößerung der Bilder ist den Unterkapiteln von Kapitel 2.3 gesondert zu entnehmen. Pro Well wurden sofern möglich 3 von 5 Aufnahmen ausgewertet, um einen repräsentativen Querschnitt zu gewährleisten.

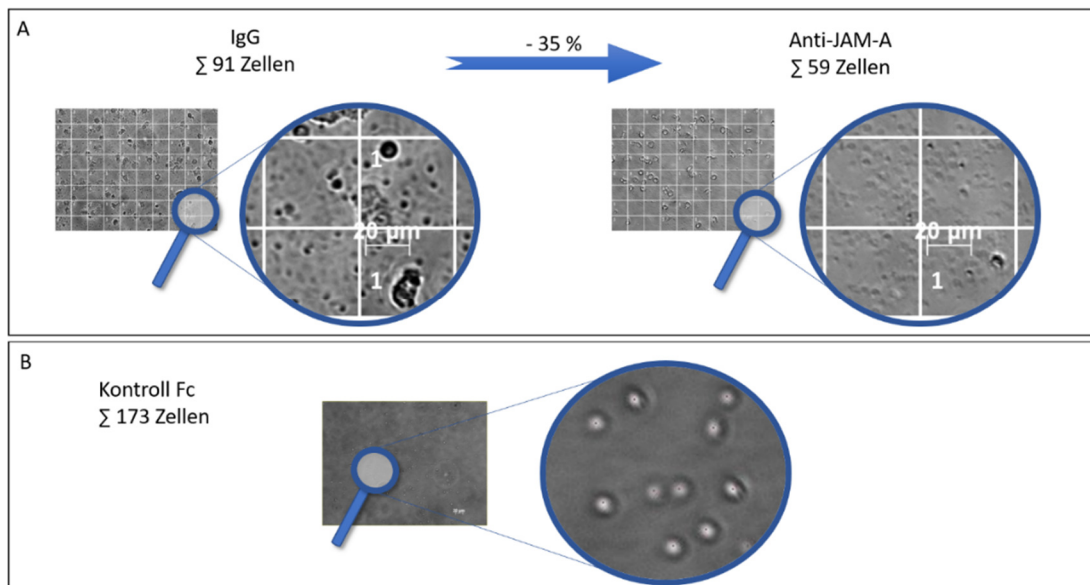
Experimente mit humanen oder murinen DCs wurden manuell unter Zuhilfenahme eines Auszählrasters ausgewertet wie dies in Abbildung 4 A dargestellt ist. Man sieht sowohl das Originalbild als auch einen vergrößerten Ausschnitt.

Bei Versuchen, in denen humane oder murine Thrombozyten auszählen waren, erfolgte die Auswertung aufgrund der hohen Zellzahl pro Bild, unter vorheriger Definition der benötigten Parameter für jedes Bild (maximale Breite, Abstand zwischen zwei Zellen, Grenzwert), mit dem Image-based Tool for Counting Nuclei (ITCN) Plug-In für ImageJ der University of California, Santa Barbara [102]. Je nach Bildqualität musste man bei diesen Einstellungen individuell Änderungen vornehmen. Nach jeder Auszählung durch das Programm sah man ein Bild „Results“, in dem alle Zellen, die das Programm detektiert hatte, rot markiert waren (siehe Abbildung 4 B), so dass die Überprüfung auf Korrektheit gut möglich war. Bei Bildern, in denen das Programm zum Beispiel auf Grund eines Zellhaufens zu viele Zellen gezählt hatte, wurden diese manuell ausgezählt und entsprechend von dem Ergebnis des Programms abgezogen. Ebenso wurden Zellen dazu gezählt, die das Programm nicht gezählt hatte, und wo sich keine gute Einstellung finden ließ, die nahezu alle Zellen erfasste.

In Abbildung 4 B sieht man beispielhaft ein Bild, das durch das Programm ausgezählt wurde. Es ist sowohl das Bild in Originalgröße als auch ein Bildausschnitt dargestellt.



Die anschließende Auswertung aller Versuche erfolgte mit Excel 2016, wobei mit dem Student t-test die Versuche auf ihre Aussagekraft hin untersucht wurden. Angegeben werden die Mittelwerte +/- Standardabweichung (SD) und p kleiner als 0,05 wurde als signifikant angesehen. Die Grafiken und Tabellen wurden mit Excel 2016 sowie Power Point 2016 erstellt.



**Abbildung 4: Darstellung der Auswertung anhand zweier ausgewählter Versuche**

**A) Präinkubierte humane Dendritische Zellen über immobilisierten humanen Thrombozyten.** Dargestellt sind beispielhaft zwei Bilder in Originalgröße mit Gitternetz zum Auszählen adhärenter hDCs in. Weiter sieht man je eine Nahaufnahme dieser beiden Bilder. Das linke Bild zeigt die Präinkubation der hDCs mit der Kontrolle IgG. Rechts dargestellt sieht man im Vergleich ein Bild mit hDCs, die mit anti-JAM-A AK präinkubiert wurden. Es zeigt sich rein optisch die verringerte Adhäsion der hDCs bei Präinkubation mit anti-JAM-A AK im Vergleich zur Kontrolle IgG. Rechnerisch ist in den Beispielbildern eine Reduktion um 35% zu verzeichnen. Dargestellt ist ebenfalls der Maßstab.

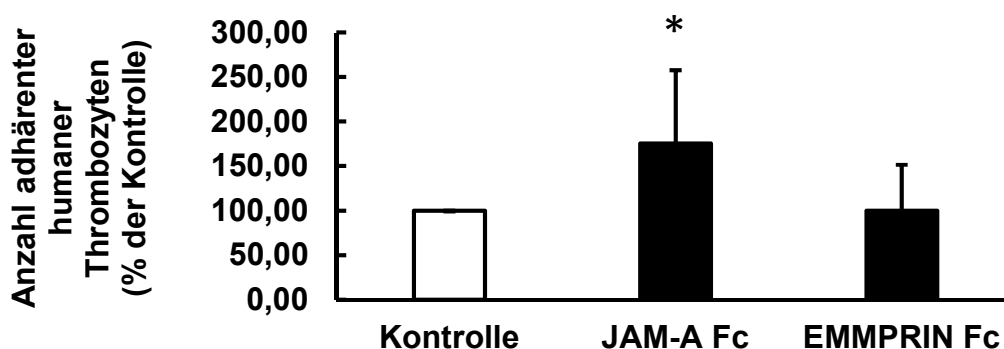
**B) Murine Thrombozyten über immobilisiertem Protein/ Kontrolle.** Dargestellt ist ein Originalbild sowie ein vergrößerter Ausschnitt des Bildes. Man sieht adhärenente murine Thrombozyten über dem Kontroll Fc. Im vergrößerten Ausschnitt sind die roten Punkte, die das Programm beim Auszählen der Thrombozyten erstellt, gut zu erkennen. Man sieht weiter die Summe der ausgezählten murinen Thrombozyten und den Maßstab. Folgendes Programm wurde mit freundlicher Genehmigung der University of California, Santa Barbara, verwendet: ImageJ Plug-In ITCN, [102].

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Humane Thrombozyten binden vermehrt über immobilisiertem humanen JAM-A Fc

In diesem Experiment wurde den humanen Thrombozyten erlaubt, über den immobilisierten humanen Proteinen JAM-A Fc, EMMPRIN Fc, oder dem Kontroll Fc zu adhären, um das Bindungsverhalten an die entsprechenden Proteine zu untersuchen (Kapitel 2.3.1).

In Abbildung 5 sieht man, dass im Vergleich zum entsprechenden Kontroll Fc Protein signifikant mehr humane Thrombozyten an immobilisiertem humanen JAM-A Fc gebunden haben. Bei Zugabe von humanen Thrombozyten über immobilisiertes humanes EMMPRIN Fc zeigte sich im Vergleich zum Kontroll Fc Protein praktisch keine vermehrte Adhäsion (Abbildung 5).



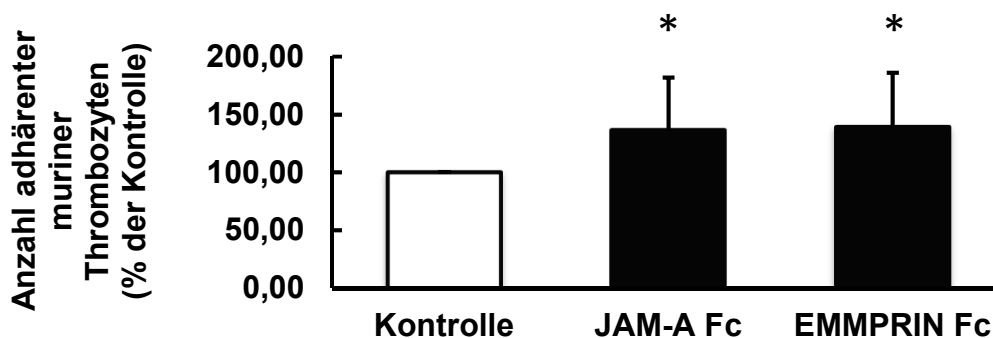
**Abbildung 5: Statischer Adhäsionsassay humane Thrombozyten über immobilisiertem humanen Protein**

Humane Thrombozyten adhären im Vergleich zum Kontroll Fc Protein über immobilisiertes humanes JAM-A Fc signifikant vermehrt. Eine vermehrte Adhärenz der humanen Thrombozyten über immobilisiertes humanes EMMPRIN Fc zeigte sich nicht. c (JAM-A Fc/ EMMPRIN Fc/ Kontroll Fc) = 10µg/ml, n = 6, p (JAM-A Fc) ≤ 0,0048, Mittelwert ± SD, \* p ≤ 0,05

### 3.2 Murine Thrombozyten binden über immobilisiertem murinen JAM-A Fc und EMMPRIN Fc vermehrt

Murinen Thrombozyten wurde erlaubt, auf immobilisiertem murinen JAM-A Fc, EMMPRIN Fc oder Kontroll Fc Protein zu adhären (Kapitel 2.3.1).

Man sieht in Abbildung 6, dass analog zu den Experimenten mit humanen Thrombozyten (Kapitel 3.1) murine Thrombozyten im Vergleich zur Adhäsion auf dem Kontroll Fc Protein vermehrt über immobilisiertem murinen JAM-A Fc adhären. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit humanen Thrombozyten, bei denen sich keine vermehrte Adhäsion über humanem immobilisiertem EMMPRIN Fc zeigte (Kapitel 3.1), binden murine Thrombozyten auch über immobilisiertem murinen EMMPRIN Fc signifikant vermehrt (Abbildung 6).



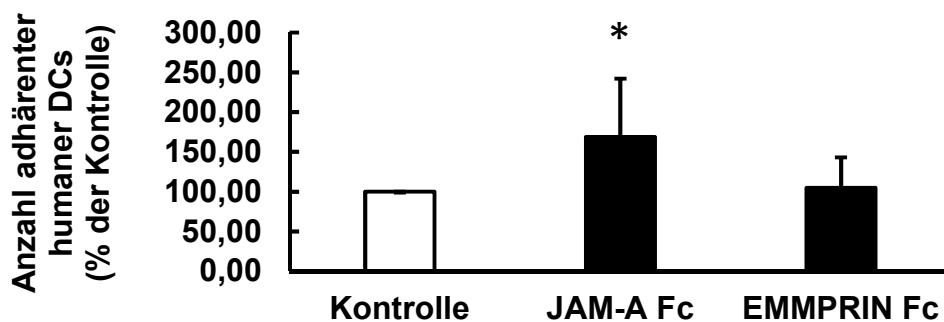
**Abbildung 6: Statischer Adhäsionsassay murine Thrombozyten über immobilisiertem murinen Protein**

Murine Thrombozyten adhären auf immobilisiertem murinen JAM-A Fc und EMMPRIN Fc im Vergleich zum Kontroll Fc Protein (jeweils  $c = 10 \mu\text{g/ml}$ ) signifikant vermehrt.  $n = 8$ ,  $p$  (JAM-A Fc)  $< 0,0223$ ,  $p$  (EMMPRIN Fc)  $< 0,0178$ , Mittelwert  $\pm$  SD, \*  $p \leq 0,05$ . Vier Versuche des Experiments wurden durch Dr. rer. nat. Marcus Olbrich, AG Langer, Kardiologie Universität Tübingen, durchgeführt und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

### 3.3 Humane Dendritische Zellen binden vermehrt über immobilisiertem humanen JAM-A Fc

Es wurde die Fähigkeit von hDCs untersucht, unter statischen Bedingungen über immobilisiertes humanes JAM-A Fc oder EMMPRIN Fc zu binden. Hierzu wurden hDCs auf den immobilisierten humanen Proteinen inkubiert (Kapitel 2.3.1).

Für hDCs auf immobilisiertem humanen JAM-A Fc zeigte sich im Vergleich zum Kontroll Fc Protein eine signifikant vermehrte Adhäsion (Abbildung 7). Auf immobilisiertem humanen EMMPRIN Fc konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Statischer Adhäsionsassay humane Dendritische Zellen über immobilisiertem humanen Protein**

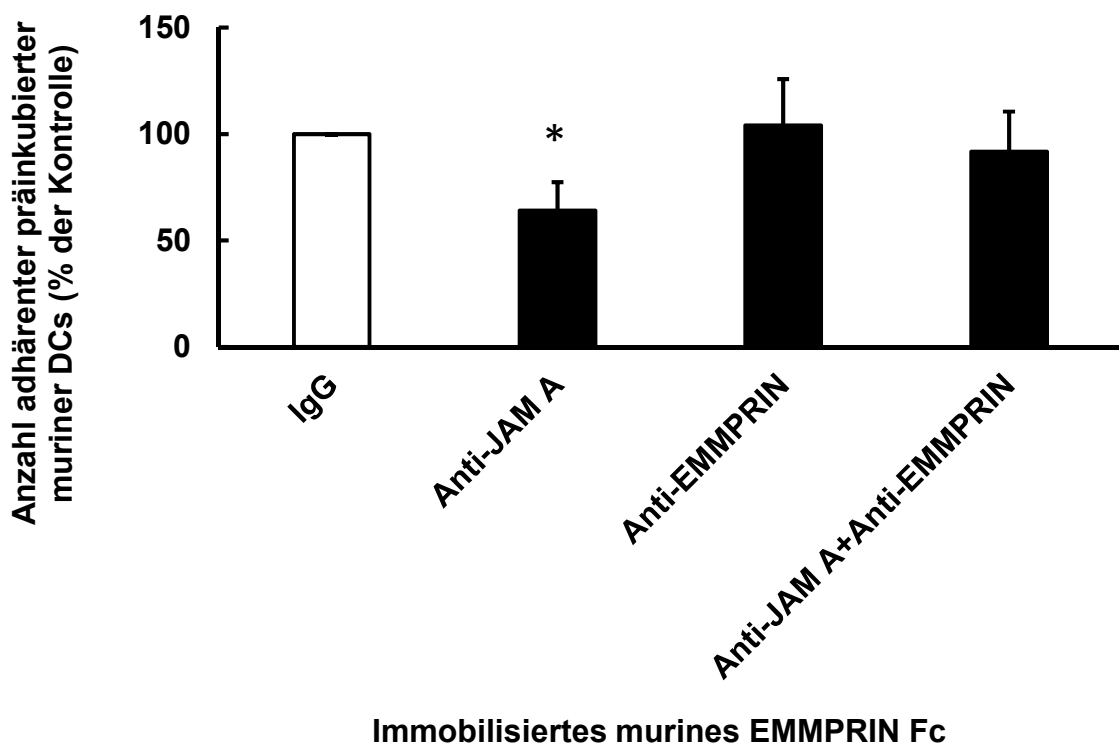
Die hDCs adhären im Vergleich zum Kontroll Fc Protein über immobilisiertem humanen JAM-A Fc signifikant vermehrt. Über immobilisiertem humanen EMMPRIN Fc lässt sich der Effekt der vermehrten Adhärenz der hDCs nicht zeigen. c (JAM-A Fc/ EMMPRIN Fc/ Kontrolle) = 10 µg/ml, n = 6, p (JAM-A Fc) < 0,0220, Mittelwert ± SD, \* p ≤ 0,05

### 3.4 Inhibition von JAM-A der murinen Dendritischen Zellen resultiert in verringerter Anzahl adhärenter muriner Dendritischer Zellen auf immobilisiertem murinen EMMPRIN Fc

Um zu untersuchen, wie sich eine Antikörperblockierung der Oberflächenproteine JAM-A und EMMPRIN der mDCs auf die Fähigkeit von mDCs an das Protein EMMPRIN Fc zu binden, auswirkt, wurde murines EMMPRIN Fc immobilisiert und mDCs erlaubt, darauf zu adhären.

Die mDCs wurden zuvor gruppenweise mit AK gegen JAM-A, EMMPRIN, oder mit beiden AK oder einer IgG Kontrolle behandelt.

In Abbildung 8 sieht man die verschiedenen Präinkubationen mit AK, sowie die prozentuale Anzahl adhärenter mDCs im Verhältnis zur Kontrolle. Es zeigt sich, dass die Präinkubation der mDCs mit murinem anti-JAM-A AK im Vergleich zum Kontroll AK zu einer signifikant reduzierten Anzahl adhätender mDCs auf immobilisiertem murinen EMMPRIN Fc führt. Die Behandlung mit murinem anti-EMMPRIN AK zeigte keinen Effekt. Bei Präinkubation mit beiden murinen AK konnte ein leichter Rückgang in der Anzahl adhätender mDCs beobachtet werden, dieser Rückgang war jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 8: Statischer Adhäsionsassay von Antikörper präinkubierten murinen Dendritischen Zellen über immobilisiertem murinen EMMPRIN Fc:**

In diesem Experiment wurde murines EMMPRIN Fc immobilisiert und den mit murinen AK vorbehandelten mDCs erlaubt darauf zu adhären. Zur Anwendung kamen zwei verschiedene murine AK, anti-JAM-A und anti-EMMPRIN AK.

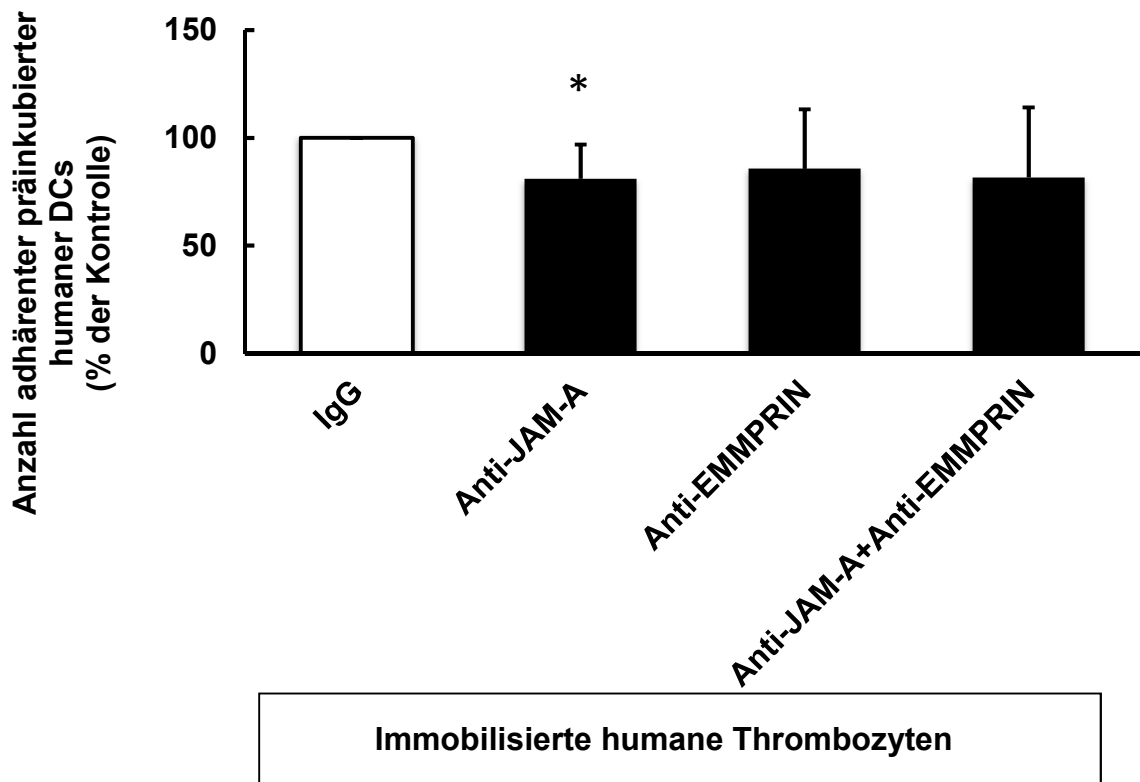
Bei Präinkubation mit murinem anti-JAM-A AK zeigt sich im Vergleich zum Kontroll AK eine signifikant verringerte Adhäsion der mDCs mit  $p < 0,0000$ , bei Verwendung beider muriner AK zusammen eine nicht signifikant verringerte Adhäsion bzw. keine verringerte Adhäsion bei alleiniger Verwendung von murinem anti-EMMPRIN AK. c (EMMPRIN Fc und AK) =  $10\mu\text{g/ml}$ ,  $n = 8$ , Mittelwert  $\pm$  SD, \*  $p \leq 0,05$

### **3.5 Humane Dendritische Zellen gehen über ihre Oberflächenproteine JAM-A und EMMPRIN mit humanen Thrombozyten eine Verbindung ein**

Zur Untersuchung der Relevanz der bisherigen Ergebnisse für die Zell-Zell Interaktion wurden humane Thrombozyten zunächst immobilisiert. Anschließend wurde den zuvor mit humanen AK präinkubierten hDCs (anti-JAM-A AK, anti-EMMPRIN AK, beide AK, Kontroll AK) erlaubt, darauf zu adhären.

Wie in

Abbildung 9 dargestellt zeigte sich im Vergleich zum Kontroll AK nur unter Verwendung des humanen anti-JAM-A AK eine signifikant verringerte Anzahl adhärenter hDCs über den immobilisierten humanen Thrombozyten. Bei Verwendung von humanem anti-EMMPRIN AK und der Kombination beider humaner AK zeigte sich ein geringer, jedoch nicht signifikanter Effekt.



**Abbildung 9: Statischer Adhäsionsassay mit Antikörper präinkubierten humanen Dendritischen Zellen über immobilisierten humanen Thrombozyten:**

Bei diesem Experiment wurde AK präinkubierten hDCs erlaubt, über immobilisierten humanen Thrombozyten zu adhären. Zur Anwendung kamen zwei verschiedene humane AK anti-JAM-A und anti-EMMPRIN AK. Bei der Präinkubation mit humanem anti-JAM-A AK zeigte sich eine signifikant verringerte Adhäsion der hDCs im Vergleich zum Kontroll AK mit  $p < 0,0023$ , bei Verwendung von humanem anti-EMMPRIN AK oder der Kombination beider AK zeigte sich eine nicht signifikant verringerte Adhäsion.  $c$  (AK) =  $10\mu\text{g/ml}$ ,  $c$  (Thrombozyten) =  $1 \times 10^8/\text{ml}$ ,  $n = 8$ , Mittelwert  $\pm$  SD, \*  $p \leq 0,05$

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Interaktion zwischen Thrombozyten und DCs über eine heterotypische Bindung zwischen JAM-A und EMMPRIN untersucht.

Thrombozyten und DCs spielen, wie in Kapitel 1.4 dargestellt, eine wesentliche Rolle in der Entstehung von Atherosklerose und beide exprimieren die Oberflächenproteine JAM-A und EMMPRIN (Kapitel 1.6). Eine Ausnahme stellen dabei mDCs dar, da bei ihnen bisher in der Literatur keine Expression von EMMPRIN auf der Oberfläche beschrieben wurde. Eine Expression von EMMPRIN wurde jedoch für murine Leukozyten, Monozyten, Neutrophile und aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben [95, 96]. Da DCs sowohl aus Leukozyten als auch aus Monozyten hervorgehen können [97], lag die Annahme nahe, dass auch mDCs EMMPRIN exprimieren. Der Nachweis, dass mDCs tatsächlich EMMPRIN exprimieren, konnte im Rahmen des Teilprojektes 2 der DFG KFO 274: „Struktur und Funktion thrombozytär exprimierter JAMs - Charakterisierung neuer heterophiler Interaktionen“ in der AG Langer, Kardioimmunologie, Universität Tübingen, unter der Leitung von Prof. Dr. med. Harald Langer, mittels FACS Analyse erbracht werden (nicht publizierte Ergebnisse).

Thrombozyten allgemein sind bekannt als Zellen mit verschiedenen Funktionen. Sie regulieren zum Beispiel die Hämostase des Blutes; hierbei kann es durch Dysfunktionen in diesem System zu Thrombosen oder Blutungen kommen [20]. Weiter wurden Thrombozyten als wesentliche Mitspieler bei entzündlichen Prozessen identifiziert [21, 103]. So ist es nicht verwunderlich, dass Thrombozyten auch an Atherosklerose beteiligt sind, da Atherosklerose als chronisch-entzündliche Erkrankung angesehen wird [22, 24].

Thrombozyten adhären im Rahmen von Gefäßverletzungen über vWF und Kollagen, aber auch über intakte und aktivierte EC erfolgt eine Adhäsion von Thrombozyten über P-Selektine [20, 28, 29, 36]. Über diese beiden Wege werden verschiedenste Signalkaskaden in Gang gesetzt, die Entzündung und damit Atherosklerose begünstigen und fortschreiten lassen [20, 28, 30, 31, 35, 36].



DCs wiederum sind Zellen die den APC angehören, und auch sie spielen bei Atherosklerose eine Rolle. Sie können beispielsweise T-Zellen aktivieren, dadurch initiieren sie die Aktivierungen von weiteren T-Zellen und fördern deren Proliferation [47, 53, 54]. Es kommt daraufhin zur Ausschüttung wesentlicher Entzündungsparameter wie TNF $\alpha$  und INF $\gamma$ , die bei Atherosklerose hochreguliert sind [47, 51-54].

Unter Verwendung dieser beiden Zelltypen konnte durch statische Adhäsionsassays die Möglichkeit der heterotypischen Bindung zwischen JAM-A und EMMPRIN und damit eine Zell-Zell Interaktion, die eventuell Einfluss auf die Entstehung und die Progression der Atherosklerose hat, untersucht werden.

Durch Prota et al. wurde bereits 2003 gezeigt, dass zwei humane JAM-A Monomere homotypisch binden können [19]. Bazzoni et al. [99] sowie Kostrewa et al. [70] zeigten, dass auch zwei murine JAM-A Moleküle homotypisch binden. Der Nachweis einer heterotypischen Bindung zwischen JAM-A und EMMPRIN liegt bisher nicht vor. Doch sowohl für JAM-A, als auch für EMMPRIN gibt es bereits untersuchte Bindungspartner, mit denen sie eine heterotypische Bindung eingehen können. So bindet JAM beispielsweise über CASK/ LIN-2 heterotypisch [100] und EMMPRIN über Annexin A2 [101].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass mDCs über eine heterotypische Bindung mit murinen Thrombozyten unter Beteiligung der Oberflächenproteine JAM-A und EMMPRIN interagieren können. Ein erster Hinweis der heterotypischen Bindung gelang durch die Präinkubation von mDCs mit murinem anti-JAM-A AK und der anschließenden Zugabe auf immobilisiertes murines EMMPRIN Fc. Im Vergleich zur AK Kontrolle resultierte die Antikörperbehandlung mit murinem anti-JAM-A AK in einer reduzierten Anzahl adhärenter mDCs, was für eine heterotypische Bindung spricht.

Aufgrund des Wissens über die relevanten Funktionen von Thrombozyten und DCs bei Atherosklerose und ihrer Beteiligung an der Initiierung von Atherosklerose macht es Sinn, die Interaktionen dieser Zellen und ihrer Rezeptoren weiter zu erforschen. Vor allem auch vor dem Hintergrund, dass bereits Langer et al. 2007 eine Interaktion zwischen Thrombozyten und DCs zeigen konnten [64].

Langer und Kollegen demonstrierten, dass humane Thrombozyten und DCs eine heterophile Zell-Zellverbindung über das  $\beta$ 2 Integrin MAC-1 der DCs und JAM-C der Thrombozyten eingehen können [64]. Hierdurch kommt es zur festen Bindung der DCs an Thrombozyten, die Fähigkeit der DCs Lymphozytenproliferation zu initiieren wird verstärkt, die Thrombozyten werden im weiteren Verlauf phagozytiert sowie die Apoptose der DCs eingeleitet [64]. Diese Schritte sind durch JAM-C vermittelt, und Langer et al. sehen dies als mögliche wichtige Faktoren beim Fortschreiten der Atherosklerose [64].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane Thrombozyten vermehrt über immobilisiertem humanen JAM-A Fc adhäreren. Eine vermehrte Adhäsion von humanen Thrombozyten auf immobilisiertem humanem EMMPRIN Fc konnte nicht beobachtet werden. Für murine Thrombozyten konnte ebenfalls eine vermehrte Anzahl adhärenter Zellen auf immobilisiertem murinen JAM-A Fc beobachtet werden, jedoch ließ sich auch bei Zugabe der murinen Thrombozyten auf immobilisiertes murines EMMPRIN Fc Protein eine vermehrte Anzahl adhärenter muriner Thrombozyten feststellen.

Aus den Ergebnissen mit humanen Thrombozyten lässt sich schlussfolgern, dass Thrombozyten Bindungspartner für JAM-A exprimieren.

Das Ergebnis für murine Thrombozyten demonstriert, dass diese sowohl Bindungspartner für JAM-A als auch für EMMPRIN exprimieren.

Mögliche Bindungen, die zur vermehrten Anzahl adhärenter humaner bzw. muriner Thrombozyten auf immobilisiertem JAM-A Fc beitragen, sind zum einen die homotypische Bindung zweier JAM-A Moleküle, wie sie für hJAM-A durch Prota und Kollegen [19] und für mJAM-A durch Bazzoni et al.[99] und Kostrewa et al. [70] beschrieben wurden, zum anderen ist aber auch eine heterotypische Bindung zwischen JAM-A und EMMPRIN bzw. weiteren nicht bekannten Bindungspartnern denkbar. Weitere Schritte wären nun, die Thrombozyten mit den jeweiligen AK gegen JAM-A, EMMPRIN und den entsprechenden Kontrollen zu präinkubieren und die so behandelten Zellen anschließend auf immobilisiertem JAM-A Fc adhäreren zu lassen.

Bei alleiniger Verwendung von anti-JAM-A AK ist eine verringerte Anzahl adhärenter Thrombozyten auf immobilisiertem JAM-A Fc zu erwarten, da dadurch das Oberflächenprotein JAM-A der Thrombozyten blockiert wird und die Bindungsstelle für die homotypische Bindung mit immobilisiertem JAM-A Fc nicht mehr zur Verfügung steht. Wenn unter alleiniger Verwendung von anti-EMMPRIN AK ebenfalls eine verminderte Anzahl adhärenter Thrombozyten auf immobilisiertem JAM-A Fc zu sehen ist, würde dies für eine zusätzliche heterotypische Bindung zwischen dem Oberflächenprotein EMMPRIN der Thrombozyten und immobilisiertem JAM-A Fc sprechen.

Es ist jedoch zu bedenken, dass bei alleiniger Verwendung von anti-EMMPRIN AK die Bindungsstelle der Thrombozyten für die homotypische Bindung über das immobilisierte JAM-A Fc nicht blockiert wird. Das heißt, die homotypische Bindung über zwei JAM-A Moleküle kann weiter erfolgen und je nachdem wie stark diese ist, kann hierdurch der Effekt der AK Blockade mit anti-EMMPRIN AK, und damit die Blockade der heterotypischen Bindung, verringert bzw. komplett aufgehoben werden. Es ist daher notwendig, die Thrombozyten zusätzlich mit beiden AK gleichzeitig zu behandeln. Wenn sich dann eine geringere Anzahl adhärenter Thrombozyten im Vergleich zur alleinigen Verwendung des jeweiligen AK auf immobilisiertem JAM-A Fc zeigt, deutet es darauf hin, dass sowohl eine heterotypische, als auch eine homotypische Bindung möglich ist.

Ein weiterer denkbarer Versuch, um eine klare Aussage zu erhalten, wäre, anstelle der humanen bzw. murinen Thrombozyten Zellen zu verwenden, die beispielsweise das Oberflächenprotein EMMPRIN artifiziell überexprimieren. Diese speziellen Zellen könnten dann auf das immobilisierte JAM-A Fc Protein gegeben werden. Bei einer möglichen heterotypischen Bindung zwischen JAM-A und EMMPRIN wäre dann über dem immobilisierten JAM-A Fc eine vermehrte Adhärenz zu erwarten. In einem nächsten Schritt könnte man die Zellen dann mit anti-EMMPRIN AK behandeln. Wenn sich hier nach Zugabe auf das immobilisierte JAM-A Fc eine verringerte Anzahl adhärenter Zellen zeigt, ist der Effekt ebenfalls auf eine heterotypische Bindung zwischen JAM-A und EMMPRIN zurückzuführen.

Ein anderer möglicher Versuch wäre, Zellen mit einem partiellen Knock-Down des JAM-A zu verwenden, bei dem mit kleinen small interfering Ribonucleicacid (siRNA) - Fragmenten verhindert wird, dass die mRNA des JAM-A abgelesen werden kann. Man kann hierdurch sehen, welchen Effekt der Verlust des JAM-A Oberflächenproteins auf die Bindung anderer Proteine, wie beispielsweise auf die heterotypische Bindung zwischen JAM-A und EMMPRIN, hat.

Durch die hier zusätzlich vorgeschlagenen Experimente kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es noch weitere Rezeptor-Liganden Paare gibt, die die Interaktion zwischen Thrombozyten und den immobilisierten Proteinen JAM-A und EMMPRIN beeinflussen.

Die vermehrte Anzahl adhätierender muriner Thrombozyten auf immobilisiertem murinem EMMPRIN Fc kann durch die homotypische Bindung zwischen dem Oberflächenprotein EMMPRIN der murinen Thrombozyten und dem immobilisierten murinen EMMPRIN Fc erklärt werden. Dass eine solche homotypische Bindung zwischen zwei EMMPRIN Molekülen möglich ist, wurde bereits 2001 durch Sun J. et al. beschrieben [104]. Zusätzlich könnte eine heterotypische Bindung zwischen dem immobilisierten murinen EMMPRIN Fc und dem Oberflächenprotein JAM-A der murinen Thrombozyten den Effekt verstärken. Aber auch hier sind bisher nicht identifizierte Bindungspartner nicht auszuschließen.

Zusätzlich zu den Versuchen zur Adhäsion von murinen Thrombozyten auf immobilisiertem murinem EMMPRIN Fc sollten in weiteren Versuchen ebenfalls die murinen Thrombozyten vor Zugabe auf das immobilisierte murine EMMPRIN Fc mit den entsprechenden murinen AK gegen JAM-A und EMMPRIN präinkubiert werden. Durch die Blockade des Oberflächenproteins EMMPRIN auf murinen Thrombozyten mit murinem anti-EMMPRIN AK ist die homotypische Bindung zweier EMMPRIN Moleküle nicht mehr möglich und es wäre eine verminderte Anzahl adhärenter muriner Thrombozyten zu erwarten. Bei Präinkubation der murinen Thrombozyten mit murinem anti-JAM-A AK und Zugabe auf das immobilisierte murine EMMPRIN Fc wäre eine verringerte Anzahl adhärenter muriner Thrombozyten ein Hinweis darauf, dass EMMPRIN und JAM-A heterotypisch binden können.

Denn anti-JAM-A AK blockiert das Oberflächenprotein JAM-A der murinen Thrombozyten und steht nicht mehr für die Bindung an immobilisiertes murines EMMPRIN Fc zur Verfügung.

Trotz allem ist es wie oben bereits beschrieben möglich, dass die Ergebnisse durch andere nicht blockierte Protein-Protein Interaktionen beeinflusst werden können. Auch hier ist es wichtig, die murinen Thrombozyten mit beiden AK gleichzeitig zu präinkubieren und im Vergleich zur alleinigen Präinkubation mit dem jeweiligen AK zu betrachten sowie die im oberen Abschnitt der Diskussion vorgeschlagenen weiteren Versuche mit artifiziell veränderten Zellen durchzuführen.

Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen murinen und humanen Thrombozyten könnte sein, dass murine Thrombozyten sich von humanen Thrombozyten in ihrem Oberflächenrezeptorexpressionsmuster unterscheiden. Es könnte dazu führen, dass unterschiedliche Interaktionen der Oberflächenrezeptoren der jeweiligen Zellen entstehen, die das Ergebnis begründen [29].

Ein Beispiel für einen solchen Rezeptor, bei dem sich die murine von der humanen Spezies bezüglich der Expression unterscheidet, ist der Toll-like-Rezeptor (TLR), der unter anderem an der angeborenen Immunantwort beteiligt ist und beispielsweise auf Leukozyten und DCs exprimiert wird [105]. Ein Beispiel ist der TLR-3. Heinz und Kollegen zeigten bei Untersuchungen mit verschiedenen monokleären Zellen mittels Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR), dass bei der humanen Spezies die vorherrschende Expression des TLR-3 bei den unreifen myeloiden DCs zu finden ist, bei der murinen Spezies jedoch bei den Makrophagen [106].

Für die Versuche zur Zell-Zell Interaktion konnte eine reduzierte Anzahl adhären-der hDCs durch die Präinkubation mit AK gezeigt werden, wobei diese nur bei alleiniger Verwendung von humanem anti-JAM-A AK signifikant war. Anhand dieses Versuchs konnte demonstriert werden, dass zwischen humanen Thrombozyten und DCs allgemein eine Bindung stattfindet, wobei diese u.a. durch die Oberflächenproteine JAM-A und EMMPRIN der hDCs vermittelt wird.

Der Bindungspartner der humanen Thrombozyten, über die die Oberflächenproteine JAM-A und EMMPRIN der hDCs ohne Verwendung der AK binden würden, geht aus dem Experiment nicht hervor. Bei diesem Versuch wäre es hilfreich, die n-Zahl weiter zu erhöhen, um die Ergebnisse für die Gruppen mit anti-EMMPRIN AK Behandlung und Behandlung mit beiden AK zu verifizieren.

Für die Adhäsionsversuche mit hDCs über immobilisierten humanen Proteinen zeigte sich auf der Beschichtung mit humanem JAM-A Fc eine vermehrte Anzahl adhärenter hDCs im Vergleich zur Kontrolle. Daraus ist der Schluss zu ziehen, dass hDCs Bindungspartner für JAM-A exprimieren. Die vermehrte Anzahl adhärenter hDCs zeigte sich nicht auf immobilisiertem humanem EMMPRIN Fc. Erklären lässt sich die vermehrte Anzahl adhärenter hDCs auf immobilisiertem humanen JAM-A Fc durch die bereits beschriebene homotypische Bindung zweier JAM-A Moleküle durch Protá et al. [19]. Trotz allem kann der Effekt zusätzlich durch eine heterotypische Bindung zwischen dem immobilisierten humanen JAM-A Fc und einem nicht bekannten Bindungspartner verstärkt werden. Da sich bei hDCs über immobilisiertem humanen EMMPRIN Fc keine vermehrte Anzahl adhärenter hDCs zeigte, spricht dies auf den ersten Blick gegen eine heterotypische Bindung zwischen dem Oberflächenprotein JAM-A der hDCs und dem immobilisierten humanen EMMPRIN Fc. Damit würde die heterotypische Bindung auch bei hDCs über immobilisiertem humanen JAM-A Fc nicht zur vermehrten Anzahl adhärenter hDCs beitragen können.

Unabhängig von den Ergebnissen ist eine heterotypische Bindung zwischen JAM-A und EMMPRIN dennoch erklärbar. Es kann sein, dass an der heterotypischen Bindung nicht nur die Proteine JAM-A und EMMPRIN beteiligt sind, sondern zusätzlich ein drittes nicht bekanntes Protein, das für die Bindung von EMMPRIN an JAM-A in einer ganz bestimmten Nähe zu EMMPRIN lokalisiert sein muss und die Bindung stabilisiert. Bei dem Versuch hDCs über immobilisiertem humanen EMMPRIN Fc wäre durch die ausschließliche Beschichtung mit humanem EMMPRIN Fc dieses Zusammenspiel der Proteine nicht gegeben und eine heterotypische Bindung somit nicht möglich.

In einem letzten Versuch wurden mit murinen anti-EMMPRIN AK und/ oder anti-JAM-A AK präinkubierte mDCs auf immobilisiertes murines EMMPRIN Fc gegeben. Hier zeigt sich, dass es bei Präinkubation der mDCs mit murinem anti-JAM-A AK im Vergleich zum Kontroll AK zu einer signifikant reduzierten Anzahl adhärerender mDCs auf immobilisiertem murinem EMMPRIN Fc kommt. Bei Präinkubation mit murinem anti-EMMPRIN AK zeigte sich kein Effekt. Bei Präinkubation mit beiden AK konnte ein leichter Rückgang in der Anzahl adhärerender mDCs beobachtet werden, dieser Rückgang war jedoch nicht signifikant. In diesem Versuch konnte die heterotypische Bindung zwischen dem Oberflächenprotein JAM-A der mDCs und dem immobilisierten murinen EMMPRIN Fc demonstriert werden. Welche weiteren Bindungspartner eine Rolle spielen bleibt offen.

Für die weitere Forschung an der heterotypischen Bindung zwischen JAM-A und EMMPRIN gibt es sicher noch viel zu tun und viel wurde bereits im Rahmen des Projektes der AG Langer, Kardioimmunologie, Universität Tübingen, unter der Leitung von Prof. Dr. med. Harald Langer, durchgeführt. Beispielsweise konnte wie bereits erwähnt die Expression des Oberflächenproteins EMMPRIN auf mDCs mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden (nicht publizierte Ergebnisse) und auch *in vivo* Versuche sind bereits durchgeführt worden.

Eine interessante Frage für die hier dargestellten Ergebnisse ist, ob sich bei Verwendung von unreifen versus reifen DCs Unterschiede in den Ergebnissen zeigen würden.

Bei den hier durchgeführten statischen Adhäsionsassays wurde die Differenzierung der DCs aus Monozyten unter Verwendung von GM-CSF und Il-4 induziert. Bei aus Monozyten hervorgegangenen DCs handelt es sich um unreife DCs. Für eine Reifung wäre es notwendig die DCs zusätzlich mit Lipopolysaccharid (LPS) oder TNF $\alpha$  zu behandeln [107]. Reife DCs können dann über den Oberflächenmarker CD83 detektiert werden [107].

Langer und Kollegen haben bei ihren Versuchen zu der möglichen heterotypen Bindung zwischen MAC-1 der DCs und JAM-C der Thrombozyten sowohl unreife als auch reife DCs verwendet [64].

Es zeigte sich hier, dass die Effekte bei Verwendung der reifen DCs stärker ausgeprägt waren, als bei Verwendung von unreifen DCs [64], weswegen es sinnvoll wäre, die hier beschriebenen Versuche mit reifen DCs durchzuführen und so eventuell aussagekräftigere Ergebnisse zu erzielen.

Auch im Hinblick auf die Oberflächenmarkerexpression unterscheiden sich unreife von reifen DCs, was zu verschiedenen Interaktionen zwischen Zellen führen kann. Es ist auch denkbar, dass hierdurch Rezeptorbindungen, wie die hier untersuchte heterotypische Bindung zwischen JAM-A und EMMPRIN, beeinflusst werden, was dann die Ergebnisse positiv oder negativ beeinflussen würde. Unreife DCs exprimieren beispielsweise hohe Level an CD86, jedoch nicht CD80 [108]. Weiter findet sich bei unreifen DCs CD1 und CD40, nicht jedoch CD14 [109]. Reife DCs dagegen exprimieren zusätzlich zum CD86 auch CD80 [108] und CD83 [107].

Eine weitere Überlegung ist, ob DCs, die aus anderen Vorläuferzellen als Monozyten entstehen, ebenfalls andere Ergebnisse hervorbringen würden. Es wäre zum Beispiel möglich, in weiteren Versuchen DCs zu verwenden, die aus Langerhans' Zellen entstehen, wobei Langerhans' Zellen eine unreife Form der DCs darstellen und in der Haut lokalisiert sind [109]. Auch aus CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen des Knochenmarks können DCs durch die Behandlung mit GM-CSF und TNF $\alpha$  generiert werden [110]. Interessant ist dabei, dass CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen, die bereits JAM-A exprimieren, darüber die Adhäsion auf immobilisierten Thrombozyten oder auf entzündetem Endothel regulieren können [111].

Analog wäre es sinnvoll, Versuche mit aktivierten Thrombozyten durchzuführen. Denn Schmidt et al. haben in ihrem Paper: „Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (CD147) Is a Novel Receptor on Platelets, Activates Platelets, and Augments Nuclear Factor  $\kappa$  B-Dependent Inflammation in Monocytes“ gezeigt, dass durch eine Aktivierung der Thrombozyten mit ADP, Thrombin oder Kollagen das in den  $\alpha$ -Granula lokalisierte EMMPRIN in die Plasmamembran wandert [91].



Man könnte also bei weiterführenden Versuchen sowohl ruhende als auch aktivierte Thrombozyten des gleichen Donors verwenden und würde so sehen, ob durch diese vermehrte Expression des EMMPRINs bei aktivierten Thrombozyten die Ergebnisse variieren.

Das Ziel für weitere Versuche sollte zum einen sein, einen Vergleich zwischen ruhenden und aktivierten Zellen zu erhalten, zum anderen könnte man im gleichen Zug eine höhere n-Zahl anstreben und durch diese Erhöhung mögliche Schwankungen bei der Durchführung der Experimente und auch zwischen den einzelnen Zellspendern ausgleichen. So würde man ein noch verlässlicheres Endergebnis erzielen.

In einem letzten Abschnitt dieses Kapitels möchte ich einen Ausblick in die Zukunft der Therapie von Atherosklerose geben oder viel mehr die Vision dessen, dass Atherosklerose nicht tertiär oder sekundär, sondern primär behandelt werden könnte. Dieses Ziel wäre realisierbar, wenn man Rezeptoren finden würde, die eine Hauptrolle am Anfang der Entstehung der Atherosklerose spielen und zusätzlich auf Zellen lokalisiert sind, die ebenfalls am Anfang der Entstehung der Erkrankung stehen.

Ein möglicher solcher Rezeptor wäre JAM-A, der wie in Kapitel 1.5.3 beschrieben, eine wesentliche Rolle bei der Thrombozytenadhäsion an aktivierte EC spielt und damit am Beginn der Atherosklerose steht [75, 76]. Weiter wurde beschrieben, wie JAM-A Monozyten und T-Zellen zu atherogenen Regionen lockt. Dies sind Zellen, die wesentlich an Atherosklerose beteiligt sind [23, 54]. JAM-A scheint für einen primären Therapieansatz gut geeignet zu sein, sofern sich seine wesentliche Rolle an Atherosklerose in der weiteren Forschung bestätigt. Es wäre dann das Ziel, gegen dieses Oberflächenprotein einen spezifischen mAK, der am Menschen angewendet werden darf und dafür eine entsprechende Zulassung erhält, zu produzieren. Durch die spezifische Blockade der Bindungsstelle mit dem mAK könnten die verschiedenen Schritte, die am Anfang der Entstehung der Atherosklerose stehen, nicht mehr initiiert werden.

Die oben beschriebenen Zellen würden nicht angelockt werden, Entzündung würde nicht gefördert werden und Atherosklerose könnte nicht entstehen oder zumindest würde der Prozess der Entstehung verlangsamt werden.

Für eine solche neue und sehr spezifische Therapie wäre es nötig, neue und klare Kriterien zu erstellen, wie beispielsweise, bei welcher Patientengruppe ein solches Medikament primär angewendet werden darf und auch kann. Eventuell findet sich in der Zukunft ein Marker im Blut, der anzeigt, wie hoch das Lebenszeitrisiko zur Entstehung einer Atherosklerose ist, und dieser Marker könnte eine Entscheidungshilfe zur Therapiefrage darstellen.

Die hier dargestellte Vision einer neuen Therapie ist sicher eine sehr vereinfachte Sicht, denn es wird nicht nur ein spezifischer mAK ausreichen, um die Entstehung der Atherosklerose zu unterbinden. Denn wie in dieser Arbeit deutlich wurde, sind es sehr viele und komplex ineinander verwobene Schritte, die zur Atherosklerose führen und sie fortschreiten lassen. Weiter muss man bei neuen Therapien stets auch das Nebenwirkungsprofil betrachten sowie jeden Patienten mit seinem individuellen Risikoprofil.

Vor Anwendung eines mAK gegen JAM-A beim Menschen müssten daher zunächst *in vivo* Experimente an einem dem Menschen nahestehenden Tiermodell durchgeführt werden, die die protektive Wirkung und seine Überlegenheit gegenüber anderen Therapien zeigen, aber die auch deutlich machen, mit welchem Nebenwirkungsprofil bei einer solchen Blockade zu rechnen ist. Eventuell könnten durch dieses Wissen Wege gefunden werden, spezifische Nebenwirkungen zu unterbinden, in dem man den mAK zum Beispiel an spezifischen Stellen modifiziert.

Eine mögliche denkbare Nebenwirkung eines mAK gegen JAM-A wäre, dass es zu einem unkontrollierten Durchtritt von Substanzen und Flüssigkeiten zwischen Zellen kommt, was weitreichende Folgen hätte. Dieser Durchtritt ist möglich, da JAM-A auch bei TJ eine Rolle spielt [68, 70]. TJ wiederum sind wesentlich an Zell-Zell Kontakten beteiligt und steuern die epitheliale Barriere [68].

Wenn nun ein mAK gegen JAM-A verabreicht wird, bindet dieser auch an das JAM-A der TJ und diese schließen nicht mehr korrekt, was den unkontrollierten Durchtritt von Substanzen und Flüssigkeiten ermöglichen würde.

Trotz allem ist es meiner Ansicht nach ein möglicher Anfang in die richtige Richtung einer neuen Therapie, an dem weiter geforscht werden sollte. Auch wenn es zunächst vielleicht nur die Entstehung der Atherosklerose hinauszögert, wäre dies ein großer Gewinn für jeden einzelnen, der an Atherosklerose und den Folgeerkrankungen leidet.

Zum Abschluss dieser Arbeit noch ein Beispiel, dass die Vision einer solchen neuen Therapie mit einem spezifischen mAK nicht unrealistisch ist. Das folgende Beispiel wird in einem Bericht vom August 2017 aus dem Deutschen Ärzteblatt mit dem Titel: „Antientzündlicher Antikörper verlangsamt „inflammatorische“ Atherosklerose nach Herzinfarkt“, vorgestellt [112]. Hier werden die Ergebnisse einer Studie in groben Zügen dargelegt. Bei dieser Studie fand der spezifische humane mAK Canakinumab, der seit acht Jahren im Rahmen von autoinflammatorischen Erkrankungen gegeben wird, seinen Einsatz [113]. Der mAK wurde Patienten nach stattgehabtem Herzinfarkt, bestehender schwerer Atherosklerose und erhöhten C-reaktiven Protein (CRP) Werten verabreicht [113]. Das heißt der mAK wurde hier im Rahmen einer Tertiärprävention eingesetzt.

Canakinumab bindet und neutralisiert Il-1 $\beta$ , eine Substanz, die zur Zytokinfamilie gehört und wesentlich an Entzündungen beteiligt ist [112-114]. Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, ist Il-1 $\beta$  ein wichtiger Mitspieler bei Atherosklerose, denn er setzt bei dieser Erkrankung viele Schritte in Gang, die zur Entstehung nötig sind, wie beispielsweise das Anlocken von Monozyten durch Sekretion von MCP-1 [29, 44], aber durch Il-1 $\beta$  werden auch weitere EC aktiviert [42].

Durch Gabe dieses spezifischen mAK zeigte sich bei den Patienten ein dosisabhängiger Rückgang des hochsensitiven CRP, und über den Beobachtungszeitraum von 3,7 Jahren traten im Vergleich zur Placebogruppe weniger kardiovaskuläre Ereignisse wie Herzinfarkt oder Schlaganfall auf [112, 113].

Nachteilig war, dass es im Beobachtungszeitraum zu einer erhöhten Zahl tödlicher Infektionen und Sepsis-Erkrankungen kam, weswegen die Gesamtmortalität der mit Canakinumab therapierten Patienten nicht gesenkt werden konnte [112, 113]. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der Beobachtung von 2010 aus dem Paper „Canakinumab“ von Dhimolea E. [114]. Er beschreibt hier, dass Canakinumab bei den bis dato eingesetzten Erkrankungen wie Familiäres kälteinduziertes autoinflammatorisches Syndrom und Muckle-Wells Syndrom von den meisten Patienten gut vertragen wird [114].

Canakinumab und die eben beschriebene Studie ist zusammenfassend zum einen ein Beispiel, dass spezifische mAK neue und interessante Therapieoptionen für Atherosklerose bieten können, zum anderen zeigt dieses Beispiel aber auch, dass neue Therapien immer kritisch betrachtet werden müssen und vor Anwendung am Menschen die möglichen Folgen und Interaktionen durch das Medikament betrachtet und die Nutzen-Risiko-Konstellation genau abgewogen werden müssen.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Interaktion zwischen Thrombozyten und DCs über eine heterotypische Bindung zwischen JAM-A und EMMPRIN untersucht.

Thrombozyten und DCs sind vielfach in der Literatur als Zellen beschrieben worden, die wesentlich an Atherosklerose, einer chronisch-entzündlichen Erkrankung [22-24], beteiligt sind. Beide Zelltypen spielen bereits am Anfang der Entstehung von Atherosklerose eine Rolle [25, 26, 47, 53, 54].

Da es wichtig ist, eine Erkrankung wie Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen primär zu behandeln, macht es Sinn für neue Therapieansätze zum einen Zellen, zum anderen aber auch Rezeptoren zu finden, die am Anfang der Erkrankung stehen.

Ein solcher Rezeptor, der bereits am Anfang der Erkrankung eine Rolle spielt, ist JAM-A, denn er ist beispielsweise an der Thrombozytenadhäsion an aktivierte EC beteiligt [20, 30, 31, 34]. Aus der Literatur ist weiter bekannt, dass sowohl JAM-A, als auch EMMPRIN als Oberflächenproteine auf den hier verwendeten Zellen vorkommen [69, 88-94].

Die homodimere Bindung wurde für humanes JAM-A bereits durch Prota et al. [19] und für murines JAM-A durch Bazzoni et al. [99] sowie Kostrewa et al. [70] beschrieben. Eine mögliche heterodimere Bindung zwischen JAM-A und EMMPRIN wurde bisher nicht beschrieben, ebenso wenig die Expression von EMMPRIN auf mDCs. Diese Expression des Oberflächenproteins EMMPRIN auf mDCs konnte jedoch im Rahmen des Teilprojektes 2 der DFG KFO 274: „Struktur und Funktion thrombozytär exprimierter JAMs - Charakterisierung neuer heterophiler Interaktionen“ in der AG Langer, Kardioimmunologie, Universität Tübingen, unter der Leitung von Prof. Dr. med. Harald Langer mittels durchflusszytometrischer Analyse gezeigt werden und ist Grundlage der hier beschriebenen Experimente, jedoch noch nicht veröffentlicht.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit im Hinblick auf Zell-Protein Interaktionen folgendes gezeigt werden:

- 1) Humane und murine Thrombozyten sowie humane Dendritische Zellen binden auf immobilisiertem JAM-A Fc vermehrt und murine Thrombozyten ebenfalls auf immobilisiertem EMMPRIN Fc
- 2) Die Inhibition des Oberflächenproteins JAM-A auf murinen Dendritischen Zellen resultiert in einer verringerten Anzahl adhärenter muriner Dendritischer Zellen auf immobilisiertem murinen EMMPRIN Fc

In Hinblick auf Zell-Zell Interaktion wurde folgendes gezeigt:

- 1) Humane Dendritische Zellen gehen über ihre Oberflächenproteine JAM-A und EMMPRIN mit humanen Thrombozyten eine Verbindung ein. Der Bindungspartner der humanen Thrombozyten, über den dies erfolgt, ist nicht bekannt.

Zur Beantwortung der Ausgangsfragestellung dieser Arbeit, ob eine Bindung zwischen Thrombozyten und Dendritischen Zellen über eine heterotypische Bindung unter Beteiligung der Oberflächenproteine JAM-A und EMMPRIN möglich ist, kann man sagen, dass es hierzu in dieser Arbeit erste positive Hinweise gibt. Im statischen Adhäsionsassay mit anti-JAM-A oder anti-EMMPRIN AK präinkubierten mDCs über immobilisiertem murinen EMMPRIN Fc wurde dies gezeigt. Es ergab sich hier bei Verwendung des anti-JAM-A AK eine verringerte Anzahl adhärenter mDCs auf immobilisiertem EMMPRIN Fc. Da es jedoch nur in einem der Experimente gezeigt werden konnte, nur für murine Zellen und auch nur in einem statischen Experiment, müssen weitere Versuche folgen, um diese Aussage zu bestätigen, die heterotypische Bindung ebenfalls für humane Zellen nachzuweisen und dies auch in *in vivo* Versuchen darzustellen. Auch über die Stärke der heterotypischen Bindung, die tatsächliche Relevanz im Rahmen von Atherosklerose und weiterer Einflussfaktoren auf die heterotypische Bindung kann anhand dieser Grundlagenversuche keine Aussage getroffen werden.

Es ist daher sicher noch viel zu erforschen, bevor man darüber nachdenken kann, wie man daraus eine neue Therapie der Atherosklerose ableiten kann.

Trotz allem stellen die Ergebnisse dieser Arbeit einen viel versprechenden ersten Schritt zum besseren Verständnis grundlegender Prozesse in der Inflammation, mit Potential für neue Therapien in der Atherosklerose, dar, und die Ergebnisse müssen weiter untersucht und verfolgt werden.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

**Tabelle 3: Abkürzungen**

%	Prozent
°C	Grad Celsius
ACD	Acid-Citrate-Dextrose
ADP	Adenosindiphosphat
AF 6	Aktin Filament 6
AK	Antikörper
anti-JAM-A AK	Monoklonaler Antikörper gegen Junctional adhesion molecule-A
anti-EMMPRIN AK	Monoklonaler Antikörper gegen Extracellular matrix metalloproteinase inducer
AP	Angina Pectoris
APC	Antigenpräsentierende Zelle
Apo-E	Apolipoprotein E
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BSA	Bovines Serum Albumin Fraktion V 96%
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CASK/ LIN-1	Calcium/ Calmodulin-dependent Serine Protein Kinase
CD40L	Cluster of differentiation 40L
CD147	Cluster of differentiation 147, EMMPRIN
cDNA	complementary Desoxyribonucleic acid
CRP	C-reaktives Protein
DC	Dendritische Zelle
DCs	Dendritische Zellen
DM	Diabetes mellitus
EC	Endothelzelle
EMP	Extrazelluläres Matrixprotein
EMMPRIN	Extracellular matrix metalloproteinase inducer, Cluster of differentiation 147, CD147, Basigin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc	Fragment crystallisable
FCS	Fetales Kälberserum
F11R	F11 Rezeptor, JAM-A
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor



GP	Glykoprotein
GPIb/IX/V	von Willebrand Faktor Komplex
h	Stunde
HDL	High density Lipoprotein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hJAM-A	humanes Junctional adhesion molecule-A
HSP47	Heat-shock-protein 47
IgA	Immunglobulin A
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
Il-1 $\beta$	Interleukin- 1 beta
IgM	Immunglobulin M
IgSF	Immunglobulin Superfamilie
INF $\gamma$	Interferon gamma
ITCN	Image-based Tool for Counting Nuclei
JAM-A	Junctional Adhesion Molecule-A
JAM-C	Junctional Adhesion Molecule-C
KHK	Koronare Herzkrankheit
L	Liter
LDL	Low Density Lipoprotein
Ldlr -/-	Low-density lipoprotein receptor – deficient
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
mAK	Monoklonaler Antikörper
Mac-1	alpha(M)beta(2), CD11b
mDCs	murine Dendritische Zellen
MCP-1	monocyte chemoattractant proteine-1
mg	Milligramm
MHC II	Major Histocompatibility Complex II
Min.	Minute
mJAM-A	murines Junctional adhesion molecule-A
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	messenger Ribonucleic acid
MTA	Medizinisch-Technische-Assistentin
n	Fallzahl
ng	Nanogramm
P	Irrtumswahrscheinlichkeit

pAVK	peripher arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCI	percutaneous coronary intervention
pH	pondus Hydrogenii
PRP	Plättchenreiches Plasma
RA	Rheumatoide Arthritis
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
siRNA	Small interfering Ribonuceic acid
sJAM-A-Fc	soluble Junctional adhesion molecule-A fragment crystallisable
STEMI	ST-segment elevation myocardial infarction
Tight Junction	TJ
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
U/ Min.	Umdrehungen pro Minute
vWF	von Willebrand Faktor
ZO-1	Zonula occludens-1
u.a.	unter anderem
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	Mikromol

## 7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Darstellung der Bindung eines anti-JAM-A AK vom IgG Typ über das JAM-A Oberflächenprotein eines Thrombozyten .....	6
Abbildung 2: Struktur eines humanen Junctional Adhesion Molecule A Dimers .....	14
Abbildung 3: Darstellung der Versuchsdurchführung präinkubierte humane Dendritische Zellen über immobilisierten humanen Thrombozyten .....	26
Abbildung 4: Darstellung der Auswertung anhand zweier ausgewählter Versuche .....	28
Abbildung 5: Statischer Adhäsionsassay humane Thrombozyten über immobilisiertem humanen Protein.....	29
Abbildung 6: Statischer Adhäsionsassay murine Thrombozyten über immobilisiertem murinen Protein.....	30
Abbildung 7: Statischer Adhäsionsassay humane Dendritische Zellen über immobilisiertem humanen Protein .....	31
Abbildung 8: Statischer Adhäsionsassay von Antikörper präinkubierten murinen Dendritischen Zellen über immobilisiertem murinen EMMPRIN Fc: .....	32
Abbildung 9: Statischer Adhäsionsassay mit Antikörper präinkubierten humanen Dendritischen Zellen über immobilisierten humanen Thrombozyten: .....	34

## **8 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Materialien und Geräte.....	17
Tabelle 2: Verwendete Antikörper und Proteine.....	19
Tabelle 3: Abkürzungen.....	51

## 9 Literaturverzeichnis

1. Andreae S., Avelini P., Berg M., Blank I., et al., *Lexikon der Krankheiten und Untersuchungen*. 2. überarbeitete und erweiterte Auflage ed. 2008: Thieme Verlag. 1468.
2. Thomas C., Büttner R., Fend F., Mennel H.-D., et al., *Allgemeine Pathologie*. 3. erweiterte Auflage ed. 2003: Verlag Schattauer. 310.
3. Pschyrembel W., *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 260. Auflage ed. 2004: Walter de Gruyter. 2022.
4. Sary H.C., Chandler A.B., Dinsmore R.E., Fuster V., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(9): s. 1512-31.
5. Sary H.C., Chandler A.B., Glagov S., Guyton J.R., et al., *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. *Circulation*, 1994. **89**(5): s. 2462-78.
6. Sary H.C., *Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults*. *Arteriosclerosis*, 1989. **9**(1 Suppl): s. 119-32.
7. Brasen J.H. und Niendorf A., *[Atherosclerosis. Formal pathogenesis, classification and functional significance]*. *Pathologie*, 1997. **18**(3): s. 218-27.
8. *Statistisches Bundesamt, Statistisches Jahrbuch 2016*. 2016. s. 119 - 148.
9. Piepoli M.F., Hoes A.W., Agewall S., Albus C., et al., *2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR)*. *Eur Heart J*, 2016. **37**(29): s. 2315-81.
10. *Europäische Kommission, Was sie über Biosimilar - Arzneimittel wissen sollten (Konsensusinformationsblatt)*. [http://ec.europa.eu/geninfo/query/index.do?queryText=biosimilar&summary=summary&more\\_options\\_source=global&more\\_options\\_date=\\*&more\\_options\\_date\\_from=&more\\_options\\_date\\_to=&more\\_options\\_language=de&more\\_options\\_formats=.pdf&swlang=en](http://ec.europa.eu/geninfo/query/index.do?queryText=biosimilar&summary=summary&more_options_source=global&more_options_date=*&more_options_date_from=&more_options_date_to=&more_options_language=de&more_options_formats=.pdf&swlang=en), 2014: s. 7 - 9.

11. Freissmuth M., Offermanns S., und Böhm S., *Pharmakologie und Toxikologie - von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. 2. Auflage ed. 2016: Springer Verlag. 870.
12. Dziewierz A., Rakowski T., und Dudek D., *Abciximab in the management of acute myocardial infarction with ST-segment elevation: evidence-based treatment, current clinical use, and future perspectives*. Ther Clin Risk Manag, 2014. **10**: s. 567-76.
13. Wolf D. und Clausen D.J., *Biologika/ Biologicals*. 2015, Deutsche Rheuma Liga. s. 3.
14. Perdriger A., *Infliximab in the treatment of rheumatoid arthritis*. Biologics, 2009. **3**: s. 183-91.
15. Koolman J. und Röhm K.-H., *Taschenatlas Biochemie des Menschen*. 4. Auflage ed. 2009: Thieme Verlag. 544.
16. Schmidt R.F., Lang F., und Heckmann M., *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 31. Auflage ed. 2010: Springer Verlag. 979.
17. Pezzutto A., Ulrichs T., und Burmester G.-R., *Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen, Labor, Klinik*. 2. Auflage ed. 2006: Thieme Verlag. 362.
18. Institut R.K. *Tollwut*  
*RKI Ratgeber für Ärzte*. 30.07.2013; Available from:  
[https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Tollwut.html;jsessionid=8809A75295244127931B0249103C2479.2\\_cid381#doc2392880bodyText12](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tollwut.html;jsessionid=8809A75295244127931B0249103C2479.2_cid381#doc2392880bodyText12).
19. Prota A.E., Campbell J.A., Schelling P., Forrest J.C., et al., *Crystal structure of human junctional adhesion molecule 1: implications for reovirus binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): s. 5366-71.
20. Ruggeri Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med, 2002. **8**(11): s. 1227-34.
21. Boilard E., Blanco P., und Nigrovic P.A., *Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE*. Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(9): s. 534-42.
22. Ross R., *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. Am Heart J, 1999. **138**(5 Pt 2): s. S419-20.
23. Ross R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): s. 115-26.
24. Rosenfeld M.E., *Inflammation and atherosclerosis: direct versus indirect mechanisms*. Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(2): s. 154-60.
25. Linden M.D. und Jackson D.E., *Platelets: pleiotropic roles in atherogenesis and atherothrombosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(11): s. 1762-6.

26. Sevitt S., *Platelets and foam cells in the evolution of atherosclerosis. Histological and immunohistological studies of human lesions.* Atherosclerosis, 1986. **61**(2): s. 107-15.
27. Massberg S., Enders G., Leiderer R., Eisenmenger S., et al., *Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin.* Blood, 1998. **92**(2): s. 507-15.
28. Frenette P.S., Johnson R.C., Hynes R.O., and Wagner D.D., *Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): s. 7450-4.
29. Gawaz M., Langer H., and May A.E., *Platelets in inflammation and atherogenesis.* J Clin Invest, 2005. **115**(12): s. 3378-84.
30. Nieswandt B., Brakebusch C., Bergmeier W., Schulte V., et al., *Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen.* EMBO J, 2001. **20**(9): s. 2120-30.
31. Massberg S., Gawaz M., Gruner S., Schulte V., et al., *A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo.* J Exp Med, 2003. **197**(1): s. 41-9.
32. Arya M., Lopez J.A., Romo G.M., Cruz M.A., et al., *Glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin alpha(IIb)beta(3): effects of receptor clustering and von Willebrand factor adhesion.* J Thromb Haemost, 2003. **1**(6): s. 1150-7.
33. Kahn M.L., *Platelet-collagen responses: molecular basis and therapeutic promise.* Semin Thromb Hemost, 2004. **30**(4): s. 419-25.
34. Gawaz M., Neumann F.J., Ott I., Schiessler A., et al., *Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty.* Circulation, 1996. **93**(2): s. 229-37.
35. Theilmeyer G., Michiels C., Spaepen E., Vreys I., et al., *Endothelial von Willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis-prone sites in response to hypercholesterolemia.* Blood, 2002. **99**(12): s. 4486-93.
36. Subramaniam M., Frenette P.S., Saffaripour S., Johnson R.C., et al., *Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice.* Blood, 1996. **87**(4): s. 1238-42.
37. Frenette P.S., Denis C.V., Weiss L., Jurk K., et al., *P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo.* J Exp Med, 2000. **191**(8): s. 1413-22.
38. Romo G.M., Dong J.F., Schade A.J., Gardiner E.E., et al., *The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin.* J Exp Med, 1999. **190**(6): s. 803-14.

39. Massberg S., Enders G., Matos F.C., Tomic L.I., et al., *Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo*. Blood, 1999. **94**(11): s. 3829-38.
40. Gawaz M., *Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): s. 498-511.
41. Lindemann S., Kramer B., Seizer P., und Gawaz M., *Platelets, inflammation and atherosclerosis*. J Thromb Haemost, 2007. **5 Suppl 1**: s. 203-11.
42. Hawrylowicz C.M., Howells G.L., und Feldmann M., *Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production*. J Exp Med, 1991. **174**(4): s. 785-90.
43. Lindemann S., Tolley N.D., Dixon D.A., McIntyre T.M., et al., *Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis*. J Cell Biol, 2001. **154**(3): s. 485-90.
44. Gawaz M., Brand K., Dickfeld T., Pogatsa-Murray G., et al., *Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis*. Atherosclerosis, 2000. **148**(1): s. 75-85.
45. Gawaz M., Page S., Massberg S., Nothdurfter C., et al., *Transient platelet interaction induces MCP-1 production by endothelial cells via I kappa B kinase complex activation*. Thromb Haemost, 2002. **88**(2): s. 307-14.
46. Gawaz M., Neumann F.J., Dickfeld T., Koch W., et al., *Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells*. Circulation, 1998. **98**(12): s. 1164-71.
47. Steinman R.M., *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: s. 271-96.
48. Bobryshev Y.V. und Lord R.S., *S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions*. Cardiovasc Res, 1995. **29**(5): s. 689-96.
49. Millonig G., Niederegger H., Rabl W., Hochleitner B.W., et al., *Network of vascular-associated dendritic cells in intima of healthy young individuals*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(4): s. 503-8.
50. Bobryshev Y.V. und Lord R.S., *Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of Vascular Dendritic Cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta*. Arch Histol Cytol, 1995. **58**(3): s. 307-22.
51. Hansson G.K., Robertson A.K., und Soderberg-Naucler C., *Inflammation and atherosclerosis*. Annu Rev Pathol, 2006. **1**: s. 297-329.
52. Greaves D.R. und Channon K.M., *Inflammation and immune responses in atherosclerosis*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): s. 535-41.



53. Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: s. 767-811.
54. Koltsova E.K., Garcia Z., Chodaczek G., Landau M., et al., *Dynamic T cell-APC interactions sustain chronic inflammation in atherosclerosis*. J Clin Invest, 2012. **122**(9): s. 3114-26.
55. Ranjit S., Dazhu L., Qiutang Z., Yibo F., et al., *Differentiation of dendritic cells in monocyte cultures isolated from patients with unstable angina*. Int J Cardiol, 2004. **97**(3): s. 551-5.
56. Van Vre E.A., Hoymans V.Y., Bult H., Lenjou M., et al., *Decreased number of circulating plasmacytoid dendritic cells in patients with atherosclerotic coronary artery disease*. Coron Artery Dis, 2006. **17**(3): s. 243-8.
57. Yilmaz A., Schaller T., Cicha I., Altendorf R., et al., *Predictive value of the decrease in circulating dendritic cell precursors in stable coronary artery disease*. Clin Sci (Lond), 2009. **116**(4): s. 353-63.
58. Yilmaz A., Lochno M., Traeg F., Cicha I., et al., *Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques*. Atherosclerosis, 2004. **176**(1): s. 101-10.
59. Doring Y., Manthey H.D., Drechsler M., Lievens D., et al., *Auto-antigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis*. Circulation, 2012. **125**(13): s. 1673-83.
60. Paulson K.E., Zhu S.N., Chen M., Nurmohamed S., et al., *Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis*. Circ Res, 2010. **106**(2): s. 383-90.
61. Bauriedel G., Jabs A., Skowasch D., Hutter R., et al., *Dendritic cells in neointima formation after rat carotid balloon injury: coordinated expression with anti-apoptotic Bcl-2 and HSP47 in arterial repair*. J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(5): s. 930-8.
62. Hou W.S. und Van Parijs L., *A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells*. Nat Immunol, 2004. **5**(6): s. 583-9.
63. Gautier E.L., Huby T., Saint-Charles F., Ouzilleau B., et al., *Conventional dendritic cells at the crossroads between immunity and cholesterol homeostasis in atherosclerosis*. Circulation, 2009. **119**(17): s. 2367-75.
64. Langer H.F., Daub K., Braun G., Schonberger T., et al., *Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function in vitro*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(6): s. 1463-70.
65. Martin-Padura I., Lostaglio S., Schneemann M., Williams L., et al., *Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration*. J Cell Biol, 1998. **142**(1): s. 117-27.

66. Kenneth J.M. und Parkos C.A., *The JAM family of Proteins*. Advanced Drug Delivery Reviews 57, 2005: s. 857 - 867.
67. Williams L.A., Martin-Padura I., Dejana E., Hogg N., et al., *Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecule (JAM)*. Mol Immunol, 1999. **36**(17): s. 1175-88.
68. Liu Y., Nusrat A., Schnell F.J., Reaves T.A., et al., *Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia*. J Cell Sci, 2000. **113 ( Pt 13)**: s. 2363-74.
69. Malergue F., Galland F., Martin F., Mansuelle P., et al., *A novel immunoglobulin superfamily junctional molecule expressed by antigen presenting cells, endothelial cells and platelets*. Mol Immunol, 1998. **35**(17): s. 1111-9.
70. Kostrewa D., Brockhaus M., D'Arcy A., Dale G.E., et al., *X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif*. EMBO J, 2001. **20**(16): s. 4391-8.
71. Barton E.S., Forrest J.C., Connolly J.L., Chappell J.D., et al., *Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus*. Cell, 2001. **104**(3): s. 441-51.
72. Weber C., Fraemohs L., und Dejana E., *The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): s. 467-77.
73. Fuse C., Ishida Y., Hikita T., Asai T., et al., *Junctional adhesion molecule-C promotes metastatic potential of HT1080 human fibrosarcoma*. J Biol Chem, 2007. **282**(11): s. 8276-83.
74. Ebnet K., Schulz C.U., Meyer Zu Brickwedde M.K., Pendl G.G., et al., *Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1*. J Biol Chem, 2000. **275**(36): s. 27979-88.
75. Babinska A., Kedees M.H., Athar H., Sobocki T., et al., *Two regions of the human platelet F11-receptor (F11R) are critical for platelet aggregation, potentiation and adhesion*. Thromb Haemost, 2002. **87**(4): s. 712-21.
76. Babinska A., Kedees M.H., Athar H., Ahmed T., et al., *F11-receptor (F11R/JAM) mediates platelet adhesion to endothelial cells: role in inflammatory thrombosis*. Thromb Haemost, 2002. **88**(5): s. 843-50.
77. Babinska A., Azari B.M., Salifu M.O., Liu R., et al., *The F11 receptor (F11R/JAM-A) in atherothrombosis: overexpression of F11R in atherosclerotic plaques*. Thromb Haemost, 2007. **97**(2): s. 272-81.
78. Papaspyridonos M., Smith A., Burnand K.G., Taylor P., et al., *Novel candidate genes in unstable areas of human atherosclerotic plaques*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(8): s. 1837-44.
79. Cavusoglu E., Kornecki E., Sobocka M.B., Babinska A., et al., *Association of plasma levels of F11 receptor/junctional adhesion*

- molecule-A (F11R/JAM-A) with human atherosclerosis. J Am Coll Cardiol, 2007. 50(18): s. 1768-76.*
80. Ozaki H., Ishii K., Horiuchi H., Arai H., et al., *Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. J Immunol, 1999. 163(2): s. 553-7.*
  81. Ostermann G., Weber K.S., Zerneck A., Schroder A., et al., *JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. Nat Immunol, 2002. 3(2): s. 151-8.*
  82. Ostermann G., Fraemohs L., Baltus T., Schober A., et al., *Involvement of JAM-A in mononuclear cell recruitment on inflamed or atherosclerotic endothelium: inhibition by soluble JAM-A. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. 25(4): s. 729-35.*
  83. Zerneck A., Liehn E.A., Fraemohs L., von Hundelshausen P., et al., *Importance of junctional adhesion molecule-A for neointimal lesion formation and infiltration in atherosclerosis-prone mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(2): s. e10-3.*
  84. Zhao Z., Vajen T., Karshovska E., Dickhout A., et al., *Deletion of junctional adhesion molecule A from platelets increases early-stage neointima formation after wire injury in hyperlipidemic mice. J Cell Mol Med, 2017.*
  85. Karshovska E., Zhao Z., Blanchet X., Schmitt M.M., et al., *Hyperreactivity of junctional adhesion molecule A-deficient platelets accelerates atherosclerosis in hyperlipidemic mice. Circ Res, 2015. 116(4): s. 587-99.*
  86. Gadner H., Gaedicke, G., Niemeyer, C., Ritter, J., *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. 1. Auflage ed. 2006, Berlin Heidelberg: Springer Verlag. 1226.*
  87. Saloga J., *Allergologie-Handbuch: Grundlagen und klinische Praxis. 2006: Schattauer Verlag. 549.*
  88. Ogasawara N., Kojima T., Go M., Fuchimoto J., et al., *Induction of JAM-A during differentiation of human THP-1 dendritic cells. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 389(3): s. 543-9.*
  89. Cera M.R., Del Prete A., Vecchi A., Corada M., et al., *Increased DC trafficking to lymph nodes and contact hypersensitivity in junctional adhesion molecule-A-deficient mice. J Clin Invest, 2004. 114(5): s. 729-38.*
  90. Pennings G.J., Yong A.S., und Kritharides L., *Expression of EMMPRIN (CD147) on circulating platelets in vivo. J Thromb Haemost, 2010. 8(3): s. 472-81.*
  91. Schmidt R., Bultmann A., Fischel S., Gillitzer A., et al., *Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on*

- platelets, activates platelets, and augments nuclear factor kappaB-dependent inflammation in monocytes.* Circ Res, 2008. **102**(3): s. 302-9.
92. Seizer P., Ungern-Sternberg S.N., Schonberger T., Borst O., et al., *Extracellular cyclophilin A activates platelets via EMMPRIN (CD147) and PI3K/Akt signaling, which promotes platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(3): s. 655-63.
  93. Woodhead V.E., Binks M.H., Chain B.M., und Katz D.R., *From sentinel to messenger: an extended phenotypic analysis of the monocyte to dendritic cell transition.* Immunology, 1998. **94**(4): s. 552-9.
  94. Leitner J., Grabmeier-Pfistershammer K., Majdic O., Zlabinger G., et al., *Interaction of antithymocyte globulins with dendritic cell antigens.* Am J Transplant, 2011. **11**(1): s. 138-45.
  95. Agrawal S.M., Silva C., Tourtellotte W.W., und Yong V.W., *EMMPRIN: a novel regulator of leukocyte transmigration into the CNS in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis.* J Neurosci, 2011. **31**(2): s. 669-77.
  96. Damsker J.M., Okwumabua I., Pushkarsky T., Arora K., et al., *Targeting the chemotactic function of CD147 reduces collagen-induced arthritis.* Immunology, 2009. **126**(1): s. 55-62.
  97. Chapuis F., Rosenzweig M., Yagello M., Ekman M., et al., *Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro.* Eur J Immunol, 1997. **27**(2): s. 431-41.
  98. Freudig D., *Lexikon der Biologie.* 2006, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 7072.
  99. Bazzoni G., Martinez-Estrada O.M., Mueller F., Nelboeck P., et al., *Homophilic interaction of junctional adhesion molecule.* J Biol Chem, 2000. **275**(40): s. 30970-6.
  100. Martinez-Estrada O.M., Villa A., Breviario F., Orsenigo F., et al., *Association of junctional adhesion molecule with calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK/LIN-2) in human epithelial caco-2 cells.* J Biol Chem, 2001. **276**(12): s. 9291-6.
  101. Cui H.Y., Wang S.J., Miao J.Y., Fu Z.G., et al., *CD147 regulates cancer migration via direct interaction with Annexin A2 and DOCK3-beta-catenin-WAVE2 signaling.* Oncotarget, 2016. **7**(5): s. 5613-29.
  102. Byun J., Verardo M.R., Sumengen B., Lewis G.P., et al., *Automated tool for the detection of cell nuclei in digital microscopic images: application to retinal images.* Mol Vis, 2006. **12**: s. 949-60.
  103. Boilard E., Nigrovic P.A., Larabee K., Watts G.F., et al., *Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production.* Science, 2010. **327**(5965): s. 580-3.

104. Sun J. und Hemler M.E., *Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions*. Cancer Res, 2001. **61**(5): s. 2276-81.
105. Rehli M., *Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression*. Trends Immunol, 2002. **23**(8): s. 375-8.
106. Heinz S., Haehnel V., Karaghiosoff M., Schwarzfischer L., et al., *Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): s. 21502-9.
107. Zhou L.J. und Tedder T.F., *CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): s. 2588-92.
108. Weissman D., Li Y., Orenstein J.M., und Fauci A.S., *Both a precursor and a mature population of dendritic cells can bind HIV. However, only the mature population that expresses CD80 can pass infection to unstimulated CD4+ T cells*. J Immunol, 1995. **155**(8): s. 4111-7.
109. Sallusto F. und Lanzavecchia A., *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1994. **179**(4): s. 1109-18.
110. Ryncarz R.E. und Anasetti C., *Expression of CD86 on human marrow CD34(+) cells identifies immunocompetent committed precursors of macrophages and dendritic cells*. Blood, 1998. **91**(10): s. 3892-900.
111. Stellos K., Langer H., Gnerlich S., Panagiota V., et al., *Junctional adhesion molecule A expressed on human CD34+ cells promotes adhesion on vascular wall and differentiation into endothelial progenitor cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(6): s. 1127-36.
112. Ärzteblatt D., *Antientzündlicher Antikörper verlangsamt „inflammatorische“ Atherosklerose nach Herzinfarkt*. Deutsches Ärzteblatt, 2017.
113. Ridker P.M., Everett B.M., Thuren T., MacFadyen J.G., et al., *Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease*. N Engl J Med, 2017.
114. Dhimolea E., *Canakinumab*. MAbs, 2010. **2**(1): s. 3-13.

## **10 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Diese Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen, Kardioimmunologie, AG Langer, unter Betreuung von Prof. Dr. med. Harald Langer (Doktorvater) eigenständig durchgeführt.

Die Versuche (Kapitel 2.3) sowie die Isolationen der Zellen (Kapitel 2.2) wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Marcus Olbrich (jetziger Betreuer), Dr. med. Stephan Gnerlich (ehemaliger Betreuer), Sarah Gekeler (MTA, AG Langer), und Jadwiga Kwiatkowska-Balon (MTA) von mir eigenständig durchgeführt. Ebenfalls wurde die statistische Datenanalyse eigenständig mittels Excel 2016 durchgeführt. Grafiken wurden, wenn nicht anders ausgewiesen, eigenständig mit Power Point 2016 erstellt. Unterstützung erhielt ich hierbei durch Edgar Alejandro Orte Lampka.

Bei dem Auszählen der Versuche mit Thrombozyten wurde folgendes Programm verwendet: Image-based Tool for Counting Nuclei (ITCN) Plug-In für ImageJ der University of California, Santa Barbara.

Bei dem Versuch murine Thrombozyten über immobilisiertem murinen Protein wurden vier der insgesamt acht Versuche durch meinen Betreuer Dr. rer. nat. Marcus Olbrich durchgeführt und mit seinem Einverständnis hier verwendet. Weiter wurden die Knochen der Mäuse für die Versuche mit murinen Dendritischen Zellen durch Sarah Gekeler, MTA, AG Langer, gewonnen sowie auch das murine Blut zur Isolation der murinen Thrombozyten.

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

Felicitas Orte Lampka

Sindelfingen, den 22. Januar 2018

## 11 Danksagung

An erster Stelle gilt mein herzlicher Dank Prof. Dr. med. Harald Langer, der mir dieses sehr interessante Thema überlassen hat und bei dem ich sehr viel über Forschung und wissenschaftliches Arbeiten und Denken lernen konnte.

Dank gilt auch dem ärztlichen Direktor der Kardiologie des Universitätsklinikums Tübingen, Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz, der durch seine Forschungseinrichtung hervorragende Arbeitsbedingungen geschaffen hat und so zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Auch danken möchte ich meinen beiden Betreuern, Dr. med. Stephan Gnerlich und Dr. rer. nat. Marcus Olbrich, die mir immer bei Fragen mit Rat und Tat zur Seite standen und vor allem auch Dr. rer. nat. Marcus Olbrich herzlichen Dank für die Unterstützung beim Schreiben der Dissertation.

Ein weiterer Dank gilt dem gesamten Team der AG Langer, sowie Jadwiga Kwiatkowska-Balon, der guten Seele des Labors.

Besonders danken möchte ich auch Sarah Gekeler, MTA der AG Langer, die stets ein offenes Ohr hatte und immer sehr hilfsbereit war.

Ein letzter und ganz besonderer Dank geht an meine Familie – meine liebevollen Eltern, meine zwei wunderbaren Brüder und meinen liebevollen Ehemann und unseren kleinen Sohn. Ihr seid die Besten und immer da, wenn man Euch braucht! Danke!