

Universität Ulm
Abteilung für Innere Medizin II – Kardiologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Rottbauer

Ivabradin inhibiert die MCP-1 induzierte Migration humaner Monozyten

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Universität Ulm

Von
Anna Elisabeth Koch
München

2017

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Daniel Walcher

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Oliver Adolph

Tag der Promotion: 14.12.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	II
1 Einleitung	1
1.1 Atherogenese	1
1.2 Monozyten.....	5
1.3 Wirkungsmechanismus von Ivabradin	6
1.4 Fragestellung	8
2 Material und Methodik	9
2.1 Material	9
2.1.1 Substanzen	9
2.1.2 Lösungen	13
2.1.3 Geräte und Zubehör	16
2.2 Methodik	19
2.2.1 Monozytenisolation	19
2.2.2 Monozytenmigration.....	23
2.2.3 Transendotheliale Migration.....	26
2.2.4 Western Blot	28
2.2.5 Statistik.....	33
3 Ergebnis	34
3.1 FACS-Auswertung der Monozytenisolation	34
3.2 Ivabradin reduziert die Chemokin-induzierte humane Monozytenmigration	35
3.3 Ivabradin reduziert die Chemokin-induzierte transendotheliale Migration von humanen Monozyten	36
3.4 Ivabradin hemmt die MCP-1 induzierten intrazelluläre Signalwege von ERK und MLC.....	37
3.4.1 Ivabradin hemmt die MCP-1 induzierte Phosphorylierung von ERK in humanen Monozyten	37
3.4.2 Ivabradin hemmt die MCP-1 induzierte Phosphorylierung von MLC in humanen Monozyten	39
4 Diskussion.....	41
4.1 Ivabradin.....	41
4.2 Wirkung von MCP-1.....	46
4.3 Intrazelluläre Signalkaskade	50
5 Zusammenfassung.....	53
6 Literaturverzeichnis.....	54

Abkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol
ApoB-LP	Apolipoprotein B tragende Lipoproteine
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest	Aqua bidestillata
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2
CD	Cluster of differentiation (Differenzierungsmuster)
Co	Kontrolle
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu	Kupfer
d	Tag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immune sorbent essay
ERK	extracellular-signal-regulated kinases
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fc-Teil	Teil der konstanten Kette des Antikörpers
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
h	Stunde
HBSS	hank`s balanced salt solution

HCAEC	Human Coronary Artery Endothelial Cells
HCl	Wasserstoffchlorid, Salzsäure
HCN	hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated
H ₂ O	Wasser
HRP	horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
I _f -Kanal	f für funny
IgG	Immunglobulin G
I _h -Kanal	h für hyperpolarization-activated
I _q -Kanal	q für queer
IL-1 β	Interleukin-1 beta/ β
kDA	Kilo-Dalton
KHK	Koronare Herzerkrankung
l	Liter
LDL	low-density lipoprotein
mA	Milli-Ampere
MACS	magnetic cell sorting
MAP	mitogen-activated protein-Kinase
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	macrophage-colony-stimulating factor
mg	Milligramm
min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
MLC	Myosin-light chain
mM	Millimolar

MMP	Matrix-Metalloproteinase
n	Fallzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF- κ B	Nukleärer Faktor – kappa B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)
nm	Nanometer
p	Signifikanzniveau
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
pH	Potentia hydrogenii (Maßeinheit für die Konzentration von Wasserstoffionen)
PS	Penicillin/Streptomycin
PVDF	polyvinyl difluoride
rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulphate
SSC	Seitwärtsstreulicht (Side Scatter)
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline Tween
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha/ α
Tween 20	Polyoxyethylene-sorbitan-monolaurate

V	Volt
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VLDL	very low-density lipoprotein

1 Einleitung

1.1 Atherogenese

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Ursache für Morbidität- und Mortalität in der westlichen Welt. Es wird davon ausgegangen, dass 2020 kardiovaskuläre Erkrankungen weltweit die führende Todesursache sein werden (Klingenberg und Hansson 2009). In den westlichen Industrieländern sterben 30% der 30- bis 65-Jährigen an Atherosklerose und ihren Folgeerkrankungen. In den höheren Altersgruppen ist Atherosklerose für 50% der Todesfälle verantwortlich (Baretton, Kirkpatrick und Bültmann 2008). Für 95 % der Koronaren Herzerkrankungen, wie akute Myokardinfarkte, für 70% der Durchblutungsstörungen in Hirnarterien mit Schlaganfällen und für 90% der peripheren arteriellen Gefäßverschlüsse ist Atherosklerose verantwortlich, ein chronisch inflammatorischer Prozess (Renz-Polster et al. 2008). Dieser betrifft vor allem die großen und mittelgroßen elastischen und muskulären Arterien (Ross 1999).

Dieser chronisch-entzündliche Prozess in den Arterien wird durch verschiedene Risikofaktoren, wie erhöhter LDL-Blutspiegel, Hypertonie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus und genetische Disposition bedingt. Der chronisch inflammatorische Prozess ruft eine endotheliale Dysfunktion hervor, welche vor allem an Stellen mit verändertem Blutfluss auftreten, wie an Gefäß-Verzweigungen (Ross 1999). Dadurch wird die Permeabilität des Endothels für Lipoproteine erhöht (Ross 1999). Der Schlüsselschritt in der Entstehung der Atherosklerose ist die subendotheliale Akkumulation von Apolipoprotein B tragende Lipoproteine, dem cholesterinreichen VLDL und LDL. Deren Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies löst eine Inflammation aus und führt dazu, dass die darüber liegenden Epithelzellen Monozyten und Lymphozyten aus dem Blut rekrutieren (Moore und Tabas 2011).

Dabei wird zunächst das Adhäsionsmolekül VCAM-1 auf den Endothelzellen exprimiert, welches auf Monozyten im Blut wirkt und diese bindet. Dessen Oberflächenexpression ist abhängig von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und TNF- α , die über den nukleären Faktor NF- κ B wirken (Cybulsky et al. 2001) (Libby 2002) (Libby 2006) (Moore und Tabas 2011).

Damit die Monozyten durch das Arterienendothel in die Intima migrieren können, muss der Monozyt an den Integrin-Rezeptor binden. Dieser muss zuvor durch das chemotaktisch wirkende Molekül MCP-1 aktiviert werden. MCP-1 wird vom Endothelium, den glatten Muskelzellen und den Monozyten gebildet und bindet an den Integrin-Rezeptor CCR2 (Libby 2002) (Koenig und Khuseyinova 2007) (Hansson et al. 2006). Die Expression von MCP-1 wird durch $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, Wachstumsfaktoren und oxidiertes LDL induziert, als auch durch Scherkräfte (Koenig und Khuseyinova 2007) (Sica et al. 1990) (Wang et al. 1991) (Yu et al. 2002).

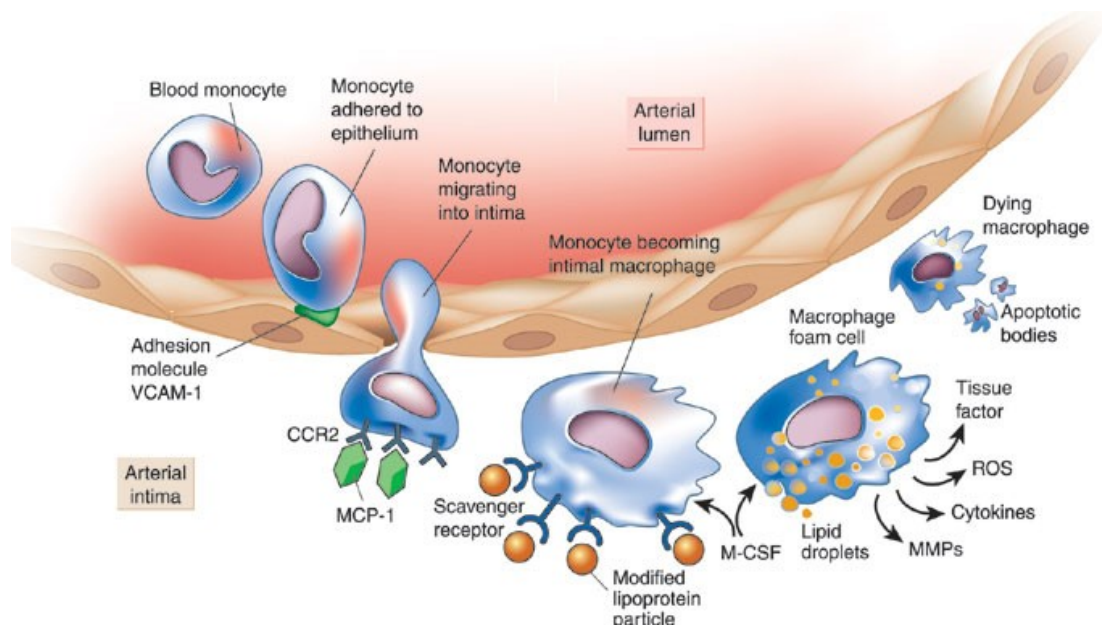


Abbildung 1: Übersicht über den Prozess der Monozytenmigration (Libby 2002)

Monozytenmigration durch das Gefäßendothel über die Bindung von Monozyten an VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) und deren Diapedese durch das Gefäßendothel in die Gefäßintima mit Hilfe von MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) und dessen Rezeptor CCR2 (chemokine (C-C motif) receptor2). Makrophagen in der Gefäßintima, die sich aus Monozyten nach Einwirken von M-CSF (macrophage-colony-stimulating factor) ausdifferenzieren, oxygenisieren die Lipoproteine in der Gefäßwand durch deren Bindung an den Scavenger Rezeptor und bilden so Schaumzellen aus, die wiederum proinflammatorische Zytokine, Proteasen (ROS (reactive oxygen species) und MMPs (Matrix-Metalloproteinasen)) und vasoaktiven Molekülen sezernieren (Libby 2002).

Nach der Diapedese der Monozyten durch das Endothel in die Intima differenzieren sich diese zu Makrophagen, indem der Wachstumsfaktor M-CSF auf sie wirkt (Hansson et al. 2006). Dadurch wird den Makrophagen die Expression von Rezeptoren, den sogenannten Scavenger-Rezeptoren Typ A, ermöglicht. Über diese nehmen die Makrophagen Lipoproteine, vor allem apoB-LP, auf. Dies führt zur Bildung von

Schaumzellen, eine frühe Form der Atherosklerose, bei der die Makrophagen im Zytoplasma mit membran-gebundenen Lipidblasen beladen sind (Hansson et al. 2006) (Moore und Tabas 2011). Zusätzlich kommt es zur Expression von Toll-like Rezeptoren auf den Makrophagen, deren Aktivierung zu einer Sezernierung einer Vielzahl von Zytokinen, Proteasen und vasoaktiven Molekülen führt, die zu einem Fortschreiten der Atherosklerose beitragen (Hansson 2009).

Dadurch entstehen komplexe Läsionen in der Arterienwand, die sogenannten fatty streaks (Lipidflecke), die neben den Schaumzellen aus T-Zellen, dendritischen Zellen und Mastzellen bestehen (Libby 2002). Fatty streaks treten schon bei jungen Personen auf, ohne Symptome auszulösen. Diese sind bei nahezu allen Kindern über 10 Jahren nachweisbar, und dies unabhängig von ethnischen Faktoren, geographischer Herkunft und Umweltfaktoren (Baretton et al. 2008). Sie können sich zu einem „Atherom“ weiterentwickeln oder sich auflösen (Hansson 2005) (Hansson et al. 2006).

T-Helfer Zellen, vor allem CD4⁺ T-Zellen, in der Gefäßläsion erkennen lokale Antigene, wie oxidiertes LDL, und sezernieren pro-inflammatorische Zytokine, die zu einer lokalen Entzündung und zum Wachstum der Plaques beitragen (Frostegård et al. 1999) (Hansson et al. 2006). Dieser fortschreitende inflammatorische Prozess führt durch weitere Migration von mononukleären Zellen und von glatten Muskelzellen aus der Tunica media in die Intima und deren Proliferation sowie durch die Bildung von extrazellulärer Matrix zum „Atherom“ oder zur atherosklerotischen Plaque (Libby und Theroux 2005) (Ross 1999). Wenn durch die Größenprogredienz der Wandläsion das Lumen der Arterie zunehmend eingeengt wird, kommt es zu klinischen Manifestationen, wie Angina pectoris (Libby 2002).

Die atherosklerotische Plaque besitzt einen Lipidkern aus Schaumzellen und wird durch eine fibröse Kappe aus Gefäßmuskelzellen und extrazellulärer Matrix bedeckt. Diese stabile Plaque besitzt eine dicke fibröse Kappe und wird durch die steigende Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen instabiler. Durch die Zytokine wird bei den Makrophagen die Apoptose eingeleitet, ein Teil des Kerns der Plaque wird nekrotisch (Libby 2002) (Ross 1999). Bei einer vulnerablen Plaque, welche rupturieren kann, ist die fibröse Kappe über der Plaque sehr dünn und besteht aus einem großen Lipidkern mit

vielen inflammatorischen Zellen und wenigen glatten Muskelzellen (Libby und Theroux 2005).

Die fibröse Kappe wird durch die Zunahme der Matrix-Metalloproteinasen und Cystein-Protease, welche ebenfalls Zytokin-induziert sind, dünner (Dollery und Libby 2006) (Galis et al. 1994) (Hansson 2005) (Libby 2006). Bei Fortschreiten der Entzündung im „Atherom“ kann es zur Ruptur der vulnerablen Plaque vor allem an der Plaque-„Schulter“ kommen (Koenig und Khuseyinova 2007). Die MCP-1 Expression führt zusätzlich zur Expression von MMPs und trägt somit zur Instabilität der Plaques bei. Dies kann zum Bruch der fibrösen Kappe führen, dadurch kommt es zum Austritt des Lipidkerns, zur Bildung eines Thrombus und schließlich zum thrombotischen Verschluss eines Gefäßes (Libby 2002) (Ross 1999).

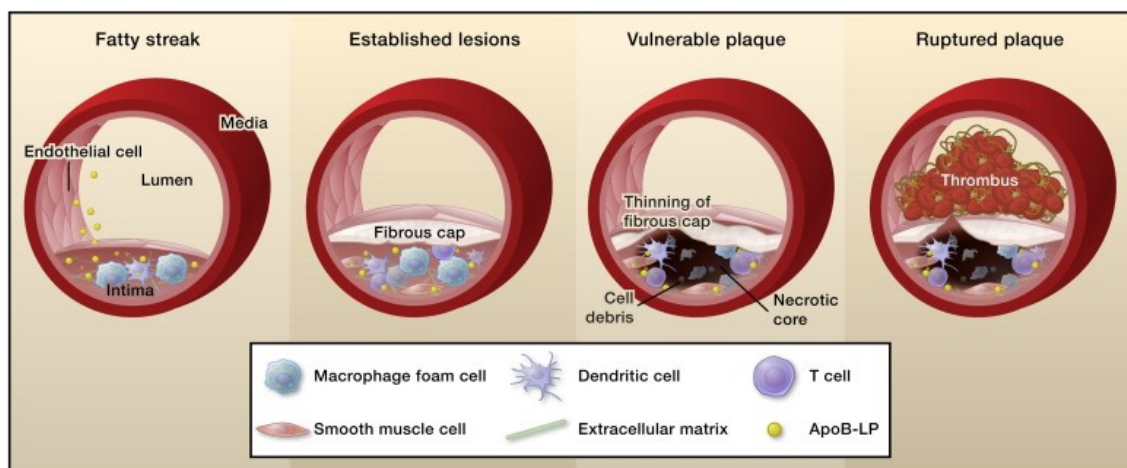


Abbildung 2: Übersicht über Entstehung und Progression einer atherosklerotischen Plaque (Moore und Tabas 2011)

Übergang von der frühen fatty streak Läsion mit der Akkumulation von ApoB-LPs (Apolipoprotein B tragende Lipoproteine) und die Einwanderung von Monozyten, glatten Muskelzellen und T-Zellen in die Intima und dem Übergang von einer Wandläsion mit fibröser Kappe in eine vulnerable Plaque mit dünner werdender fibröser Kappe bis zu deren Ruptur und daraus resultierender Thrombus-Bildung (Moore und Tabas 2011).

1.2 Monozyten

Monozyten sind Teil des menschlichen Immunsystems und spielen neben den CD4-positiven Lymphozyten eine große Rolle bei der chronisch-inflammatorischen Atherosklerose. Die Monozyten stammen von Progenitorzellen aus dem Knochenmark ab (Moore und Tabas 2011) und entstehen innerhalb von 1-3 Tagen aus den Vorläuferzellen. Circa 1-6% der zirkulierenden Leukozyten des peripheren Bluts sind Monozyten. Bei Entzündung steigt der prozentuale Anteil an. Die Monozyten verbleiben für 1-4 Tage im peripheren Blut, bis sich diese durch Einwanderung in das Gewebe zu Makrophagen differenzieren. Die Monozyten besitzen eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen, wie Rezeptoren für IgG/Immunglobuline, Scavenger-Rezeptor und TLR, die wichtig für die Funktion bei der Antigenerkennung, Zellaktivierung und Phagozytose sind (Müller et al. 2008).

Durch einen veränderten Blutfluss mit erhöhten hämodynamischen Scherkräften und die subendotheliale Entzündung kommt es zu einer Expression von Molekülen auf den Endothelzellen, die eine Adhäsion, Migration und Akkumulation von Monozyten ermöglichen (Moore und Tabas 2011) (Ross 1999). Die Migration und die transendotheliale Migration der Monozyten in das Gewebe, welche über die Aktivierung des Integrin-Rezeptor durch das MCP-1 Molekül und dessen chemotaktische Wirkung ermöglicht werden, stellt den entscheidenden Schritt in der Atherogenese dar (Aiello et al. 1999) (Ashida et al. 2001) (Custodis et al. 2008). Es zeigte sich, dass atherosklerotische Läsionen, welche viele Makrophagen beinhalten, deutlich instabiler sind als makrophagenarme Läsionen (Olzinski et al. 2010). Versuche von Smith et al. konnte zeigen, dass Monozyten eine Schlüsselrolle bei der Progression von atherosklerotischen Läsionen spielen. In Versuchen an ApoE^{-/-} und M-CSF-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit doppelter Mutation im Vergleich zu ApoE^{-/-} Mäusen, im Verlauf signifikant kleinere Läsionen zeigten (Smith et al. 1995). Folglich nimmt die Makrophagen Migration und transendotheliale Migration eine Schlüsselrolle in der Entstehung, in der Progression als auch in der Plaque Stabilität ein.

1.3 Wirkungsmechanismus von Ivabradin

Ivabradin (Procoralan®) ist ein Pharmakon, das die Herzfrequenz senkt, indem es den I_f -Ionenkanal am Sinusknoten selektiv blockiert. Dabei hat Ivabradin jedoch keine Wirkung auf die Herzkontraktilität oder den Blutdruck. I_f -Kanal-Hemmer stammen vom Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten Verapamil ab und gehören zur Gruppe der Benzazepinone.

Der Wirkmechanismus über die I_f -Kanal-Hemmung wird dabei nicht durch einen Phosphorylierungsmechanismus ausgelöst, sondern durch eine cAMP-Bindung (Speranza et al. 2012). Durch eine Hyperpolarisation wird der aktivierte I_f -Kanal gehemmt. Die Substanz kann dabei nur am geöffneten Kanal während der Hyperpolarisation wirken, dieser Mechanismus wird als „use dependence“ bezeichnet. Die Substanz wirkt von intrazellulär, löst dabei aber keine Potenzialverschiebung aus. Durch die Kanal-Hemmung wird die Leitfähigkeit von Na^+ - und K^+ - Ionen reduziert, was wiederum zu einer Verzögerung der Depolarisation führt. Durch N-Demethylierung entsteht im menschlichen Plasma der Hauptmetabolit von Ivabradin (Canet et al. 2011) (Schipke et al. 2006).

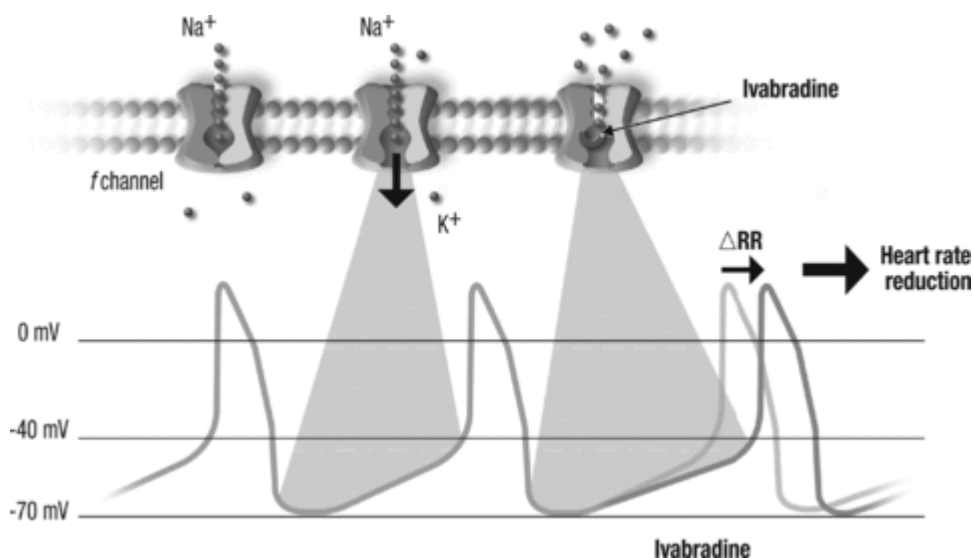


Abbildung 3: Wirkungsweise von Ivabradin (Canet et al. 2011)

Durch die Hemmung des Ionenflusses durch den Natrium-Kanal wird die Depolarisation des Aktionspotentials gehemmt und so die Herzfrequenz reduziert (Canet et al. 2011).

Dem I_f -Kanal ähnliche Kanäle wurden sowohl im kardialen Gewebe in den sinuatrialen Zellen, in den Purkinje-Fasern und in den ventrikulären Myozyten als auch im neuronalen Gewebe in den zentralen und peripheren Neuronen, in den Stäbchen und Zapfen der Retina und in den endothelialen Zellen der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen. In neuronalem Gewebe werden die Kanäle I_h - oder I_q - Kanal genannt. Ein ähnlicher Kanal

kommt auch in den glatten Muskelzellen vor, wobei dieser sich in der Kinetik und Sensitivität gegenüber cAMP unterscheidet. Mittlerweile sind vier verschiedene Isoformen des I_f -Kanals bekannt und diese werden der HCN („hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated“; HCN1-HCN4) Familie zugeschrieben. Im Sinusknotengewebe von Maus und Kaninchen ist vor allem die HCN4-Isoform und in der Retina des Auges vor allem die Isoformen HCN1 und HCN2 vorhanden (Schipke et al. 2006).

Neben Ivabradin existieren weitere I_f -Kanal Hemmer Alinidin, Falipamil, Zatebradin, Cilobradin und ZENECA ZD 7288, die mit Ausnahme von Alinidin und ZD 7288 ebenfalls vom Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten Verapamil abstammen. Diese sind jedoch im klinischen Gebrauch nicht zugelassen (Schipke et al. 2006) (Speranza et al. 2012).

1.4 Fragestellung

Die Monozytenmigration durch das Gefäßendothel in die Intima der Arterienwand stellt einen wichtigen Schritt in der Atherogenese dar. Dieser Prozess wird durch das chemotaktisch wirkende Molekül MCP-1, welches auf humane Monozyten wirkt, gefördert.

Die vorliegende Studie untersucht in vitro die Wirkung von Ivabradin auf die transendotheliale Migration und die Migration von humanen Monozyten.

Dabei wurden folgende Punkte untersucht:

1. Welchen Effekt hat Ivabradin auf die Migration von Monozyten nach Stimulation mit MCP-1?
2. Welchen Effekt hat Ivabradin auf die transendotheliale Migration von humanen Monozyten nach Stimulation mit MCP-1?
3. Welchen Effekt hat Ivabradin auf die Phosphorylierung von ERK und MLC bei Monozyten nach Stimulation mit MCP-1?

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Substanzen

30% Acrylamid

Bio-Rad Laboratories, USA

Antikörper:

- anti-Biotin Micro Beads (MACS)
- anti-GAPDH Santa Cruz, USA
- anti CD14-PE BD Biosciences Pharming TM; USA
- anti-goat Polyclonal Rabbit Anti-GOAT
Immunglobulins/HRP;

Dako, Denmark
- anti-rabbit Polyclonal Swine Anti-Rabbit
Immunglobulins/HRP;

Dako, Denmark
- anti-pERK (Phospho-p44/42 MAP-Kinase) Cellsignaling; USA
- anti-pMLC Ser Typ 19 Cellsignaling, USA
- Monocyte Biotin-Antibody Cocktail:
(MACS)

Anti-human CD3, CD7, CD16, CD19,

CD556, CD123, Glycophorin A

APS 10%	Sigma-Aldrich, USA
Aqua bidest.	Delta-Pharma, Germany
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Austria
Bromphenolblau	SERVA Elektrophoresis GmbH, Germany
B-Mercaptoethanol	Sigma Diagnostics, USA
Buffy-Coats (ungekühlt, am selben Tag verwendet)	Blutspendezentrale Ulm
Chemolumineszenzlösung Super Signal® West Pico Luminol/Enhancer Solution; Peroxide Solution	Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA
Collagen I (in 3,32 ml 0,5 M Essigsäure) 0,03 mg/ml Collagen I in PBS	Sigma Diagnostics, USA
Diff-Quick	Dade Behring
EDTA	Sigma Diagnostics, USA
Endothelial Cell Growth Medium MV Kit	Promo Cell, Germany
Eosin (Diff-Quick I)	Medion Diagnostics, Switzerland
Essigsäure	Riedel-de Haen, Germany
Ethanol	Riedel-de Haen, Germany
Eukitt	Kindler GmbH, Germany
Glycerol/ Glycerin	Sigma Diagnostics, USA
HBSS, modified, 10-fach konzentriert	Sigma
HCl	T.J. Baker

Humanes Serum	PAA Laboratories GmbH, Austria
Ivabradin (Procorolan® 5mg)	Servier GmbH, Deutschland
Lymphozyten Trennlösung; Dichte 1,077 g/ml	PAA Laboratories GmbH, Austria
MCP-1	Sigma Diagnostics, USA
Methanol	Merck, Germany
Micro BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co, Germany
NaCl	Sigma Diagnostics, USA
PBS Dulbecco's	PAA Laboratories GmbH, Austria
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Austria
Percoll® Trennlösung; Dichte 1,13 g/ml	Sigma Diagnostics, USA
PMSF (Phenylmethanesulfonylfluoride)	Sigma-Aldrich, USA
Proteinaseinhibitoren	Sigma-Aldrich, USA
RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Austria
SDS (Sodium Dodecylsulfate)	Carl Roth GmbH & Co, Germany
SOV (Sodium Orthovanadate)	Sigma-Aldrich, USA
Stripping Buffer Restore™ Western Blot	Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA
Temed	Sigma-Aldrich, USA
Thiazin (Diff-Quick II)	Medion Diagnostics, Switzerland
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)	USB (United States Biochemical), USA

Tween 20

Sigma-Aldrich, USA

Xylol

Merck

2.1.2 Lösungen

Collagenlösung

50 µl Collagen I

50 µl NaOH 1 N

9,9 ml PBS

Laemmli (5x)

5 ml 0,5 M Tris pH 6,8

4 ml Glycerol

0,8 g SDS

0,5 ml β-Mercaptoethanol

125 mg Bromphenolblau

Ad 10 ml Aqua bidest

LIMK- Lysepuffer

NP40%

1:200 Proteinaseinhibitoren

1:100 PMSF

1:100 SOV

MACS-Puffer

PBS mit 2mM EDTA

10% humanes Serum

0,5% BSA

Medium Monozyten

RPMI 1640

0,5% humanes Serum

	1% Penicillin /Streptomycin
PBS + EDTA	500 ml PBS
	2 ml 0,5M EDTA (2mM EDTA)
Running Buffer 10 x	30,3 Tris Base
	141 g Glycin
	10 g SDS
	Ad 1 l Aqua bides
	pH 8,3
Sample Gel 12%	72 ml 30% Acrylamide
	59,04 ml Aqua bides
	45 ml 1,5 M Tris Base pH 8,8
	1,8 ml 10% SDS
Stack Gel 5%	15 ml 30% Acrylamide
	61,8 ml Aqua bides
	11,25 ml 1,9 M Tris pH 8,8
	0,9 ml 10% SDS
TBS	20 mM Tris Base

150 mM NaCl

TBST

TBS

0,1 % Tween 20

Transfer Buffer 10x

30,2 g Tris Base

112,6 g Glycin

Ad 1l Aqua bides

pH 8,8

to use Buffer:

10% 10x Stock Transfer

10% Methanol

80% Aqua bides

2.1.3 Geräte und Zubehör

Blot-Kammer (Tankblot) für Elektrophorese	Bio-Rad Laboratories, USA
Brutschrank „Hera cell“	Heraeus, Germany
Compact Line OV4	Biometra, Germany
Counterzähler Casy TTC	Schärfe Systeme
Deckplättchen	Marienfeld, Germany
FACS Calibur Durchflusszytometer	Becton Dickinson, USA
Filter „Nucleopore® Track-Etch Membrane“	Whatman, England
Filterpapier	Bio-Rad Laboratories, USA
Heizblock „Thermomixer compact“	Eppendorf
Ice Systems „AF 100“	Scotsman, USA
Kammer „Standard 48 Well Chemotaxis Chamber“	Neuro Probe
Kimwipes Lite (fusselfreie Tücher)	Kimberly-Clark, USA
Kulturflaschen 250 ml	Greiner bio-one, Germany
Laminar Air Flow bench „Hera safe“	Heraeus Instruments, Germany
Leukosep® 15ml und 50ml Polypropylenröhrchen mit Filter	Greiner bio-one, Germany
MACS Monocytes Isolation Kit II	Miltenyi Biotech, USA
MACS Separation Columns, 25LS Columns	Miltenyi Biotech, USA

MACS Multi Stand	Miltenyi Biotech, USA
Mikroskop „Axioskop 2plus“	Zeiss, Germany
Mikroskop Digital sight DS-Fi1	Nikon, Switzerland
Neubauer Zählkammer	Brand, Germany
Objektträger	Glasbläserei Ulm, Germany
pH Meter „pH538“	Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim
Photometer	Beckman, USA
Pipet-lite	Rainin, USA
Pipetten	Gilson, France
Pipetten 10 ml	Costar Stripette, Corning New York
Pipetten 25 ml	Costar Stripette, Corning New York
Pipetus-Akku	Hirschmann, Germany
Power Pack P25	Biometra, Germany
Pre-Separation Filters	Miltenyi Biotech, USA
PVDF Transfer Membran	Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA
Reagenzgläser	Greiner, Germany
Reaktionsgefäß 1,5 ml und 2 ml	Safe Lock, Eppendorf, Germany
Reaktionsgefäß 15 ml und 50 ml	Falcon, Becton Dickinson, USA
Reaktionsplatten	
6-well	Falcon, Becton Dickson, USA

24- well	Costar Stripette, Corning New York
96-well	Greiner, Germany
Röntgenfilme	Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA
Röntgenkassette	Rego, Germany
Schüttelgerät Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Schwenkwinkelzentrifuge „Varifuge 3.0 R“	Haraeus, Sepatech, Germany
Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (Festwinkel-Rotor)	Du Pont Instruments
Thermocycler	Biometra, Germany
Trennsäule	MACS Separation Columns, 25LS Columns, Miltenyi Biotech, USA
Waage	Ohaus, USA
Wasserbad Julabo SW 21	Julabo, Germany
Western Blot Kammer (Gel- Elektrophorese)	Biometra, Germany
Wippe	Duomax 1030; Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Germany
Zellkultur Mikroskop „DMIL“	Leica
Zentrifuge	Biofuge, Multifuge 1S-R, Multifuge 3S-R; Haraeus, Kendro, Germany 5417C; Eppendorf Germany

2.2 Methodik

2.2.1 Monozytenisolation

Bei der Monozytenisolation werden zunächst die mononukleären Zellen aus Buffy-Coats, die am selben Tag aus der Blutspendezentrale Ulm abgeholt wurden, isoliert. Dies wurde im Vorhinein durch die Ethikkommission der Universität Ulm bewilligt (180/ 12). Die Buffy-Coats sind der Zellüberschuss, der bei der Erythrozyten Gewinnung aus Spenderblut entsteht. Aus den mononukleären Zellen werden anschließend mit verschiedenen Methoden die Monozyten separiert.

Zunächst werden je 15 ml warmes Separationsmedium Ficoll-PaqueTM in vier 50 ml Polypropylenröhrchen mit Filter (Leukosep-Isolationsröhrchen) pipettiert und anschließend unter den Filter zentrifugiert (2100 rpm, 1 min, RT). Die Buffy-Coats werden in einer Zellkulturflasche im Wasserbad erwärmt und mit PBS auf 80 ml verdünnt und je 20 ml der Verdünnung in die vier Polypropylenröhrchen über den Filter gegeben.

Nach dem Zentrifugieren (2500 rpm, 15 min, RT) wird das Plasma, die oberste Schicht, abgesaugt. Die Schicht mit den peripheren mononukleären Blutzellen befindet sich unter der Plasmaschicht, darunter liegt das Separationsmedium mit dem Filter. Die untersten beiden Schichten bestehen aus Granulozyten und Erythrozyten. Die Schicht der mononukleären Zellen aus je zwei Röhrchen wird abpipettiert und in ein 50 ml Röhrchen gegeben und mit warmen PBS auf 50 ml aufgefüllt.

Anschließend findet der erste Waschvorgang statt, indem man zunächst zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT), den Überstand abpumpt und das Pellet erneut mit PBS + EDTA resuspendiert und erneut auf 50 ml auffüllt. Dieser Waschvorgang wird im Folgenden wiederholt.

2.2.1.1 Monozytenisolation mittels zweifachen Dichtegradientenzentrifuge

Bei dieser Methode werden die Monozyten von den übrigen mononukleären Zellen getrennt. Zunächst wird das entstandene Pellet mit den Zellen in 3 ml PBS aufgenommen. Anschließend werden 15 ml Percoll^R mit 2,5 ml HBSS vermischt und die Trennlösung auf einen pH zwischen 7,18 und 7,29 mit Hilfe von Zutropfen von HCl eingestellt. In die

beiden Polypropylenröhrchen werden je 7 ml der Trennlösung gegeben und die in 3 ml PBS gelösten mononukleären Zellen dazu gegeben. Anschließend wird das Gemisch zentrifugiert (2000 rpm, 30 min, RT), wobei dieser Zentrifugationsvorgang ohne Bremse durchgeführt wird. Die oben schwimmende Monozytenbande aus den beiden Röhrchen wird mit Hilfe einer Pipette vorsichtig abgenommen, in ein Polypropylenröhrchen gegeben und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach dem Zentrifugieren (1200 rpm, 10 min, RT) wird nach dem Absaugen und Resuspendieren erneut gewaschen.

Diese Methode wurde von De Almeida et al. etabliert (De Almeida et al. 2000).

2.2.1.2 Monozytenisolation mittels Antikörper

Bei dieser Methode werden die mononukleären Zellen über Antikörperbindung magnetisiert, wobei die Antikörper an den Monozyten nicht binden und somit beim Durchlauf durch den Magneten nicht angezogen werden.

Das Pellet wird in 10 ml PBS + EDTA aufgenommen. Die Zellsuspension wird anschließend durch einen mit 30 µm großen Poren versetzten Pre-Separations Filter gegeben, um die Zellen voneinander zu lösen. Von den 10 ml der Lösung wird 1/100 also 10 µl entnommen, um die Zellzahl in der Neubauer Zählkammer zu ermitteln und ungefähr 35×10^7 mononukleären Zellen zu erhalten.

Die restliche Lösung wird unterdessen zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT). Der Überstand wird abgesaugt und es werden pro 10^7 Zellen 30 µl des MACS Puffers hinzugegeben, das entspricht 1050 µl. Nach diesem Schritt werden pro 10^7 Zellen 10 µl Blocking Reagenz dazugegeben. Nun werden pro 10^7 Zellen 10 µl des Biotin-Antikörper Cocktails als Erstantikörper zu der Lösung hinzugefügt und für 10 Minuten bei 4° C inkubiert. Der Erstantikörper besteht aus Oberflächen-Antikörpern gegen CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 und gegen Glycophorin A. Als nächster Schritt werden pro 10^7 Zellen jeweils 30 µl MACS-Puffer und 20 µl Anti-Biotin Micro Beads, der Zweitantikörper, hinzu pipettiert und anschließend erneut für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Bei dem Zweitantikörper handelt es sich um einen monoclonalen Antibiotin-Antikörper der sich auf den Erstantikörper setzt und damit die markierten Zellen magnetisiert. Dabei werden alle Zellen des mononukleären Systems markiert, außer den unmarkierten Monozyten.

Die Lösung wird mit MACS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt und anschließend zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4°C). Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, werden die Zellen bis zu 10^8 in 1000 µl MACS-Puffer resuspendiert. Durch die MACS Separation-Säulen ohne Stempel werden zunächst 3 ml MACS-Puffer zum Befeuchten gegeben und in einem Reagenzglas unter der Säule aufgefangen und verworfen. Anschließend wird die Zellsuspension mit schrittweise hinzugefügten 9 ml MACS-Puffer durch die MACS Separations-Säule gegeben und die Monozyten, die durch die Säule gelaufen sind, in einem Reagenzglas aufgefangen. Dies entspricht einer negativen Selektion, da die magnetisierten Zellen nicht durch die Säule gelangen und von dem magnetischen Feld um diese absorbiert werden. Im nächsten Schritt wird die aufgefangene Zelllösung erneut zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT), der Überstand nach dem Zentrifugieren abgesaugt.

Nach den beiden unterschiedlichen Separation-Methoden wird die Anzahl der Monozyten mithilfe einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Pro Bedingung werden jeweils 3 Mio/ 5 Mio Monozyten in 2 ml Lösung in eine 6-well-plates untreated gegeben, indem die vorher gewonnene Zellsuspension mit im Wasserbad erwärmten RPMI + 5 % humanem Serum und PS (Penicillin/Streptomycin) verdünnt wird. Die Zellkulturplatte wird anschließend über Nacht in den Brutschrank (37°C, 5% CO₂) gelegt.

2.2.1.3 Reinheitsmessung mittels FACS-Analyse

Um die Reinheit der isolierten Monozyten zu überprüfen, wird nach der Isolation eine qualitative Analyse durchgeführt. Dies geschieht mithilfe der Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse.

Aus den isolierten Zellen wird ein Aliquot von 2 Mio. Monozyten entnommen. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt werden 50 µl PBS und 20 µl eines Antikörpers gegen CD14 hinzugegeben. Dieser Antikörper ist mit dem fluoreszierenden Stoff PE markiert. So bewirkt der Stoff eine indirekte Fluoreszenz der Monozyten. Die Zellen werden bei RT für 30 min lichtgeschützt inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen, wird die Probe in 1%igen Paraformaldehyd bei 4°C über Nacht gelagert.

Die Monozyten-Expression ergibt sich aus der mittleren Stärke der Fluoreszenz bei der FACS-Analyse. Dabei wird der Prozentsatz der Monozyten an der Gesamtpopulation angegeben.

2.2.2 Monozytenmigration

Für die Monozytenmigration benötigt man eine 48 well boyden chamber. Die Kammer besteht aus zwei Platten, die durch eine Dichtung und einen Filter getrennt sind. In die obere Platte werden die Zellen gegeben, die anschließend durch den Filter wandern. In die untere Platte wird die chemotaktische Substanz gegeben, die auf die Monozyten wirkt. Auf der Filterunterseite sammeln sich die gewanderten Monozyten.

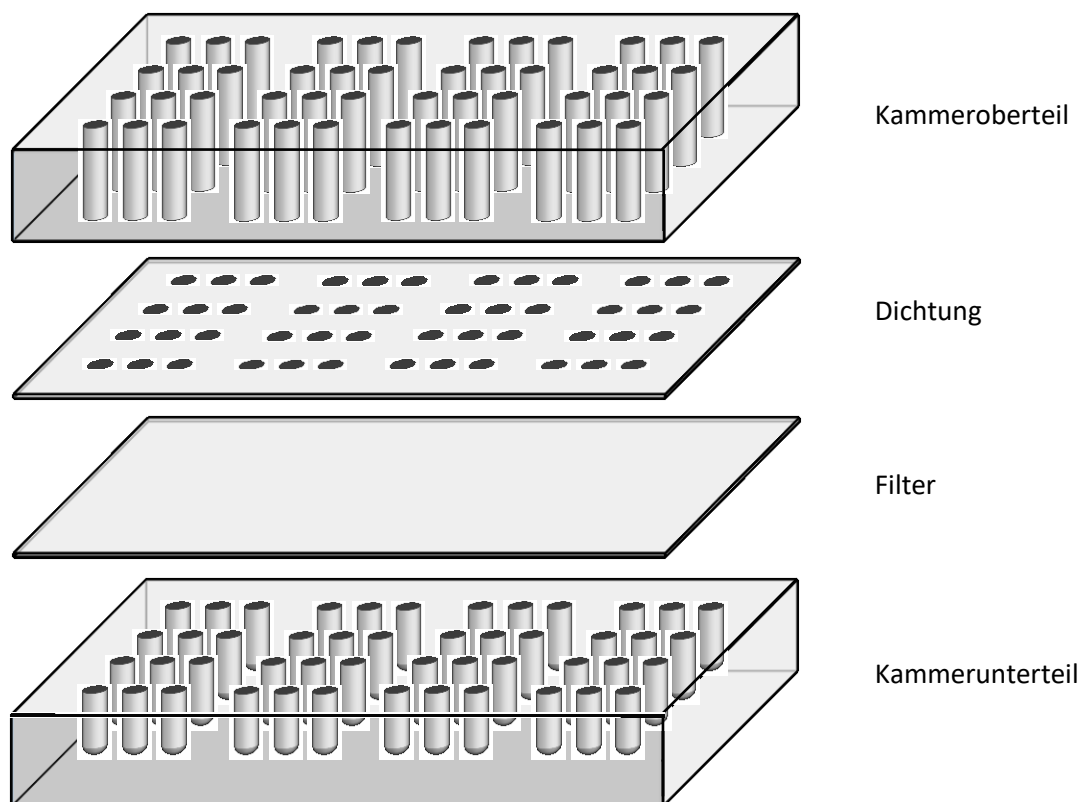


Abbildung 4: Skizze einer 48 well boyden chamber mit Kammeroberteil, Dichtung, Filter und Kammerunterteil nach Martinet et al. 1994

Der Filter wird zunächst für vier Stunden in eine Collagenlösung bei Raumtemperatur gelegt, wobei die raue Seite des 5 µm dicken Filters nach oben zeigt. Zusätzlich wird die Kammer im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) gelagert und vorgewärmt. Nachdem der Filter an der Luft getrocknet ist, wird er für eine Stunde in RPMI-Medium, welches vorher im Wasserbad auf 37°C erwärmt wird, gelegt.

Die Monozyten, welche am Vortag isoliert und im Brutschrank über Nacht im Nährmedium gelagert wurden, werden herunter zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT). Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet mit 1 ml RPMI resuspendiert. Die Zellen werden in 10 ml RPMI gelöst und gemischt. Um die Zelldichte zu messen, werden 15 µl aus der Verdünnung entnommen und in eine Zählkammer gegeben. Die Zählung erfolgt unter dem Mikroskop. Anschließend wird eine Verdünnung von 5×10^5 Monozyten/ml durch Zugabe von RPMI hergestellt. Für die Kontrolle mit und ohne MCP-1 wurden 1,5 ml der Verdünnung in ein Reaktionsgefäß gegeben. Danach werden jeweils 0,5 ml der Verdünnung mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors Ivabradin (0,01 µmol/l, 0,05 µmol/l, 0,1 µmol/l) in einem Reaktionsgefäß vermischt. Die Reaktionsgefäße mit den Suspensionen werden für 15 Minuten vorstimuliert.

Währenddessen werden in die Vertiefungen der unteren Platte 28,5 µl der chemotaktischen Substanz MCP-1 in einer Verdünnung von 50ng/ml mit RPMI-Medium gegeben. Bei der Kontrolle wird nur RPMI in die Vertiefung gegeben. Auf die untere Platte wird der Filter gelegt, wobei die raue Seite zur unteren Platte zeigt. Danach kommen die Abdichtung und die obere Platte darauf. Die Konstruktion wird mit sechs Schrauben justiert.

In die Vertiefungen der oberen Platte werden 45,5 µl der im Brutschrank gelagerten Zellsuspensionen mit Monozyten in Medium gegeben. Wobei in die Positiv- und Negativkontrolle die Monozyten ohne den Inhibitor Ivabradin (Procorolan®) pipettiert werden. Die restlichen Vertiefungen werden mit den Zellsuspensionen gefüllt, die mit unterschiedlichen Konzentrationen des Hemmstoffes versetzt sind. Die Kammer wird nun 3 Stunden im Brutschrank (37°C, 5%CO₂) gestellt.

Anschließend wird der Filter, auf dessen rauer Seite die Monozyten sitzen, gefärbt. Zunächst werden die Zellen auf dem Filter fixiert. Mit Methanol und Triacrylmethane (Diff-Quick Fixativ) wird für 10 Minuten fixiert, wobei die raue Seite des Filters nach oben zeigen muss. Im nächsten Schritt wird der Filter mit Diff-Quick (Diff-Quick I (Eosin) für 1,5 Minuten und Diff-Quick II (Thiazin) für 3 Minuten) angefärbt und mit Aqua bidest. gewaschen. Der Filter wird dann auf einen Objektträger gelegt, wobei die raue Seite nach unten weißen muss. Nun wird der Filter mit einem fusselfreien Papier abgetupft und das

Deckglas mit Eukitt festgeklebt. Um das Deckglas abzudichten wird auf den Rand Xylol gegeben.

Nach dem Trocknen erfolgt das Auszählen mit Hilfe des Mikroskops. Bei 40x Vergrößerung werden jeweils 5 aneinander liegende Gesichtsfelder ausgezählt. Für die Kontrolle werden 200-300 Zellen und für die mit MCP-1 behandelten Zellen 600-700 ausgezählt. Im Folgenden wird daraus der Mittelwert errechnet.

2.2.3 Transendotheliale Migration

Die Methode wurde erstmals von Ryu , J.W. et al. beschrieben (Ryu et al. 2004).

Bei dieser Methode wird ein Filter mit einer 8 µm Porengröße und eine dazu passende 24 well plate verwendet. Auf die Oberseite des Filters werden die Endothelzellen platziert. Dabei werden 40.000 HCAEC auf dem Filter mit 200 µl Medium (HBSS) ausgezählt. In die untere Vertiefung werden 600 µl HCAEC-Medium gegeben und die Filter in das well gestellt. Anschließend werden die Zellen in der well plate für 3 Tage (37°C, 5% CO₂) inkubiert, so dass die Endothelzellen auf dem Filter wachsen und diesen dicht bedecken.

Zur Kontrolle des Zellwachstums werden in einer 96-well plate ebenfalls 40.000 HCAEC ausgesät und regelmäßig unter dem Mikroskop beurteilt. Diese Beurteilung ist mit der 24-well plate nicht möglich, da man bei der 24 well-plate den Filter unter dem Mikroskop nicht sehen kann.

Die aus den Buffy-Coats isolierten Monozyten, die über Nacht in RPMI + 0.5% humanem Serum mit 1% PS im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert worden sind, werden ab zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT) und in reinem RPMI aufgenommen.

Das Medium, welches vorher in der well plate war, wird vorsichtig abpipettiert und durch 600 µl neues RPMI-Medium ersetzt. Außer bei der Negativ-Kontrolle wird dem Medium mit einer Verdünnung von 50ng/ml das auf Monozyten chemotaktisch wirkende MCP-1 zugefügt. Das Medium oberhalb des Filters wird ebenfalls vorsichtig abpipettiert und durch 300 µl Zellsuspensionen ersetzt, die bei der Monozytenisolation gewonnen wurde. Diese Zellsuspensionen bestehen bei der Positiv- und Negativ-Kontrolle aus Monozyten die auf 2 x 10⁶ Zellen/ ml verdünnt wurden, auf die übrigen Filter gibt man zusätzlich zu den Monozyten den Inhibitor Ivabradin in unterschiedlichen Konzentrationen (0.05 µmol/l und 0.1 µmol/l). Dabei wurden die Monozyten mit dem Hemmstoff Ivabradin für 30 min vorstimuliert. Pro well sind es 0.5 x 10⁵ Monozyten.

Nun werden die Zellen für 1 h in den Brutschrank (37°C, 5% CO₂) gestellt, damit die Monozyten durch die Epithelzellen migrieren können. Im nächsten Schritt wird die 24 well plate für 1 h auf Eis bei 4 °C gestellt. Die Platte muss im Folgenden mehrmals abgeklopft werden und die Filter entfernt werden. Anschließend wird die Zellsuspension im Falcon

aufgenommen und mit 10 ml NaCl aufgefüllt. Die migrierten Zellen werden abzentrifugiert (1200 rpm, 7 min, RT) und das Pellet erneut in 10 ml NaCl aufgenommen. Zum Schluss wird die Zellzahl mit Hilfe des Counterzählers ermittelt.

2.2.4 Western Blot

2.2.4.1 Stimulation

Nachdem die Zellen über Nacht im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) gelagert wurden, werden unterschiedliche Bedingungen mit Ivabradin (0.01 µmol/l, 0.05 µmol/l oder 0.1 µmol/l) vorgelegt und die Monozyten mit dem Hemmstoff 30 Minuten inkubiert. Anschließend wird zu den unterschiedlichen Bedingungen je 2 µl MCP-1 (50 ng/ml) in 2 ml Lösung hinein pipettiert. Dabei werden zusätzlich eine Positiv-Kontrolle und eine Negativ-Kontrolle angesetzt. Anschließend wird die Zellkulturplatte für 5 Minuten in den Brutschrank (37°C, 5% CO₂) gestellt.

2.2.4.2 Ernte und Lyse

Um die Stimulation zu beenden, wird die Zellkulturplatte nach 5 Minuten im Brutschrank auf Eis gestellt und 4°C kaltes PBS hinzu pipettiert. Um die Zellen zu ernten wird mehrmals mit der Pipette die Lösung in den verschiedenen wells aufgezogen und wieder entlassen. Anschließend wird die Lösung mithilfe der Pipette in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 4°C kaltem PBS auf 10 ml aufgefüllt. Die Reaktionsgefäße mit den Zellen werden danach zentrifugiert (1200 rpm, 7 min, 4°C).

Der Überstand wird mit einer Pumpe abgesaugt. Zu dem Zellpellet wird 180 µl / 150 µl LIMK-Lysepuffer (LIMK: 180µl pro Bedingung, NP 40%, Proteinaseinhibitor 1:200, SOV 1:100, PMSF: 1:100) gegeben. Nach dem Mischen wird die Lösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und im Kühlraum für 20 Minuten auf Eis gelagert. Nach der Inkubation werden die Reaktionsgefäße erneut zentrifugiert (13 000 rpm, 10 min, 4°C), um die lysierten Zellen von den Membranfragmenten zu trennen.

Den so erhaltenen Überstand pipettiert man in 1,5 ml Reaktionsgefäße und entnimmt diesem 15µl für die Proteinbestimmung. Der Rest wird in flüssigen Stickstoff abgefroren und bei -80°C gelagert. Den Teil der Lösung für die Proteinbestimmung lagert man bei -20°C.

2.2.4.3 Proteinassay

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration benötigt man eine ELISA-Platte mit 96 wells. Dabei geht man nach der BCA-Methode mit der Thermo Scientific Pierce Micro

BCATM Protein Assay Kit (Firma Pierce) vor. In die ersten beiden Reihen der Platte gibt man in jedes well 100 µl eines Albumin-Standard in absteigender Konzentration (60, 50, 40, 30, 20, 10 und reines H₂O). Anschließend pipettiert man 100 µl Aqua bidest in die wells in die nächsten Reihen und gibt dazu jeweils 1 µl der Lysate hinzu, um eine 1:100 Verdünnung zu erreichen. Für jede Probe macht man eine Doppelbestimmung. Im Folgenden gibt man zu jeder Bedingung 100 µl der Micro-BCA (B Cell-attracting Chemokine 1) Farbreagenz (50%, 48%, 2%) hinzu und stellt die ELISA-Platte für 60 Minuten zum Inkubieren in einen Brutschrank bei 60°C. Dabei wird Cu²⁺ in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zu Cu¹⁺ reduziert und bildet dann mit Bicinchoninsäure einen Komplex.

Nach der Inkubation wird der Farbwechsel der Reagenz photometrisch gemessen, dieser korreliert mit der Proteinkonzentration bei 562 nm linear. Daraus wird der Mittelwert der Doppelbestimmungen errechnet.

2.2.4.4 Herstellung von Polyacrylamidgel und Elektrophorese

Zunächst reinigt man die Glasplatten, die als Form für das Gel dienen, mit Alkohol und dichtet diese mit einem Gummi ab. Anschließend stellt man das Trenn-Gel unter dem Abzug her, indem man 15 ml eines 12%igen Sample-Gel mit 150 µl APS und 30 µl TEMED gut vermischt und zügig zwischen die Glasplatten pipettiert. Um eine glatte Oberfläche zu erhalten, gibt man noch Aqua bidest auf das Gel.

Nach 15 Minuten ist das Sample-Gel ausgehärtet und das Aqua bidest kann entfernt werden. Anschließend mischt man 5 ml Stackgel mit 50 µl APS und 10 µl TEMED unter dem Abzug und gibt das Gel auf das Trenngel und steckt einen Kamm hinein, um Taschen für die Proben zu erhalten.

Die Glasplatten mit den ausgehärteten Gelen und ohne die Gummiabdichtung werden nun in die Elektrophorese-Kammer eingespannt. Anschließend füllt man die Kammer mit 1x Runningpuffer ohne, dass Luftblasen entstehen.

Die Proteinproben werden entsprechend ihrer Proteinkonzentration, die vorher photometrisch bestimmt wurden, mit Aqua bidest versetzt, so dass 35 µl Proben im gleichen Verhältnis entstehen. Zu den Proben wird je 8,75 µl 5-fach Laemmli ein negativ geladener Farbstoff Bromphenolblau und SDS ein anionisches Tensid im Überschuss, welches die Eigenladung der Proteine abschirmt, gegeben. Das Gemisch wird nun 10

Minuten lang bei 100°C gekocht, um die Proteine zu denaturieren. Anschließend werden die Proben kurz für wenige Sekunden herunterzentrifugiert.

In die erste Tasche des Gels werden 15 µl eines vorher aufgetauten Markers gegeben, der seine Bande bei 64 kDa hat. In die folgenden Taschen wird die gesamte Menge der Probe mit einer 50 µl Pipette gegeben. Die restlichen freien Taschen werden mit 15 µl 2-fach Laemmli aufgefüllt, um die Laufstrecke zu verbessern.

Bei der Elektrophorese wird eine Spannung von 109 V angelegt und die Stromstärke (mA) auf Maximum gestellt. Dabei wandern die negativ geladenen Proteine ihrer Größe entsprechend durch das Gel. Nach 2,5 Stunden ist die Gelelektrophorese mit der Auftrennung der Proteine fertig.

2.2.4.5 Blotting

Zunächst aktiviert man die PVDF-Membran für 10 sec. in Methanol und legt die Membran danach für 1-2 min. in Aqua bidest, um die Membran zu waschen. Anschließend legt man die Membran für 15 min zusammen mit dem Schwamm, dem Gel und dem Filter in den Transferpuffer, der aus 100 ml 10x Transferpuffer, 100 ml Methanol und 800 ml Aqua bidest. besteht.

Beim Aufbau wird folgende Reihenfolge eingehalten: Auf das Plexi-Oberteil, das die Anode darstellt, wird ein Schwamm, eine Membran, das Gel, das Filterpapier, ein Schwamm gelegt und anschließend mit dem Plexi-Unterteil, der Kathode verschlossen. Der Blot läuft bei einer Spannung von 80 V und einer Stromstärke von 400 mA für 40 min im Kühlraum, nachdem man die Kammern mit Transferpuffer aufgefüllt hat. Dabei werden die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen, indem das elektrische Feld senkrecht auf das Gel steht und die Proteine auf der Membran durch hydrophobe Wechselwirkungen haften bleiben. So können weitere Methoden auf die Proteine angewendet werden.

Nach dem Blotten wird die Membran kurz in TBST (100 ml 10x TBS, 900 ml Aqua bidest, 1 ml Tween) gegeben und anschließend für 60 min in 5%ige Milch (5 g Milchpulver, 100 ml TBST) gelegt.

2.2.4.6 Markierung

Danach wird die Membran 3-mal mit TBST für je 10 min gewaschen, um die SDS-Reste aus der Membran zu entfernen und die Struktur der Proteine zurückzubilden und für die Antikörper zugänglich zu machen. Anschließend wird der Primär-Antikörper auf die Membran gegeben und über Nacht im Kühlraum auf der Wippe inkubiert. Dabei binden die Antikörper spezifische Epitope auf den Proteinen.

- Anti-p-ERK in 1:400 Verdünnung in 5%igem BSA (1,25 g BSA-Pulver, 25 ml TBST)
- Anti-p-MLC in 1:400 Verdünnung in 5%igem BSA (1,25 g BSA-Pulver, 25 ml TBST)
- Anti-GAPDH in 1:200 Verdünnung in 5%iger Milch

Nach der Inkubation wird die Membran für 10 min 3-mal mit TBST gewaschen, um überschüssige Antikörper herauszulösen. Anschließend wird der Zweitantikörper für 60 min auf die Membran gegeben:

- Für p-ERK und p-MLC: anti-rabbit HRP in 1:2000 Verdünnung in 5%iger Milch
- Für GAPDH: anti-goat HRP in 1:2000 Verdünnung in 5%iger Milch

Danach erfolgen erneute 3 Waschschrte für 10 min mit TBST, um die Reste des Zweitantikörpers herauszuwaschen. Der Zweitantikörper bindet an den F_c-Teil der Primärantikörper und enthält HRP das Enzym Meerrettich-Peroxidase. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Luminol in eine Form, die zu Chemolumineszenz fähig ist. Anschließend wird die Membran in eine 12 ml Chemolumineszenz Lösung, bestehend aus zwei Reagenzien Supersignal im Verhältnis 6 ml : 6 ml, getaucht, die die Zweitantikörper sichtbar macht. Daraufhin legt man einen Röntgenfilm auf die Membran und kann so die Proteine sichtbar machen. Bei p-MLC muss der Röntgenfilm 30 min auf der Membran bleiben, bei p-ERL 10 min und bei GAPDH 1 min, um ein gut sichtbares Ergebnis zu erlangen.

2.2.4.7 Strippen

Beim Strippen werden die Membranen für 10 sec in Methanol gelegt und danach mit TBST gewaschen. Anschließend wird die Membran für 10 min in Stripping Puffer gegeben, um diese von gebundenen Antikörpern zu befreien. Danach erfolgen wieder drei 10-

minütige Waschschrirte mit TBST. Anschließend wird die Membran mit 5%iger Milch für 60 min blockiert. Nun ist es möglich erneut Antikörper auf die Membran zu geben.

2.2.5 Statistik

Die Ergebnisse dieser experimentellen Arbeit wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung des Mittelwertes dargestellt. Die Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA und anschließend post hoc test ermittelt. Ein p-Wert < 0.05 wurde als signifikant angesehen.

3 Ergebnis

3.1 FACS-Auswertung der Monozytenisolation

Die Reinheitsmessung der Monozytenisolation wurde mithilfe der FACS-Analyse durchgeführt. Dabei wurde der Anteil der Monozyten ermittelt. Für diesen ergaben sich Werte über 80%.

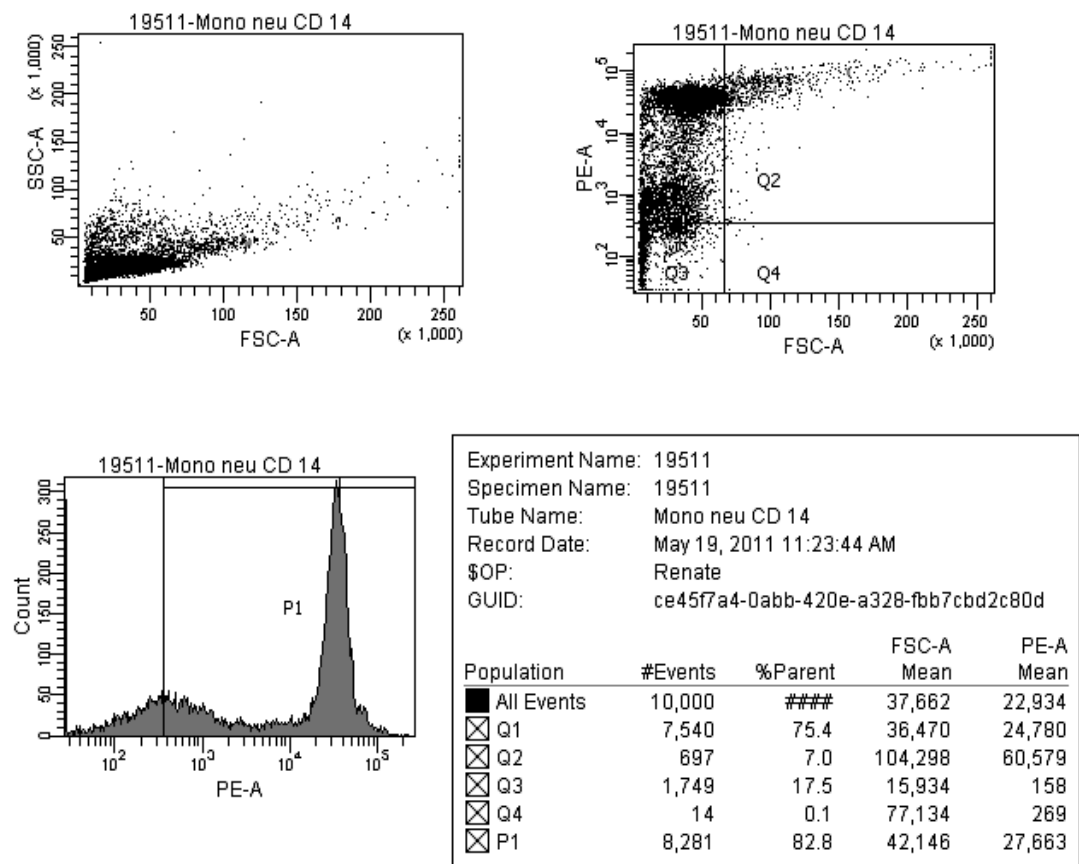


Abbildung 5: FACS (fluorescence-activated cell sorting)-Analyse nach Monozytenisolation

Die X/Y-Achsen sind in den Abbildungen beschriftet. Die Abbildung mit den Achsen SSC-A (Side Scatter-A) (y-Achse) und FSC-A (Forward Scatter-A) (x-Achse) zeigt identifizierte Monozyten. Die Abbildung mit den Achsen PE-A (Phycoerythrin -A) (y-Achse) und FSC-A (Forward Scatter-A) (x-Achse) ermittelt die Anzahl an Monozyten in der Probe mittels Oberflächenprotein CD 19 (Cluster of differentiation 19) Markierungen. So ergibt P1 den prozentualen Anteil der Zellen an Monozyten.

3.2 Ivabradin reduziert die Chemokin-induzierte humane Monozytenmigration

In diesem Versuch wurden die Effekte von Ivabradin in verschiedenen Konzentrationen (0.01 $\mu\text{mol/l}$, 0.05 $\mu\text{mol/l}$ und 0.1 $\mu\text{mol/l}$) auf die, durch MCP-1 ausgelöste Migration der humaner Monozyten, ermittelt (Abbildung 6). Dabei wurde MCP-1 in der Konzentration 50 ng/ml verwendet und zeigte nach 3 stündiger Inkubation im Vergleich zur unstimulierten Probe eine Induktion der Migration von 1.9 ± 0.1 ($p < 0.01$; $n=4$). Die 15-minütige Vorstimulation mit Ivabradin führte zu einer Hemmung der Migration. Wobei diese mit 1.0 ± 0.2 bei einer Ivabradin Konzentration von 0.1 $\mu\text{mol/l}$ maximal und signifikant war (* $p < 0.01$ im Vergleich zu den mit MCP-1 behandelten Zellen; $n=4$).

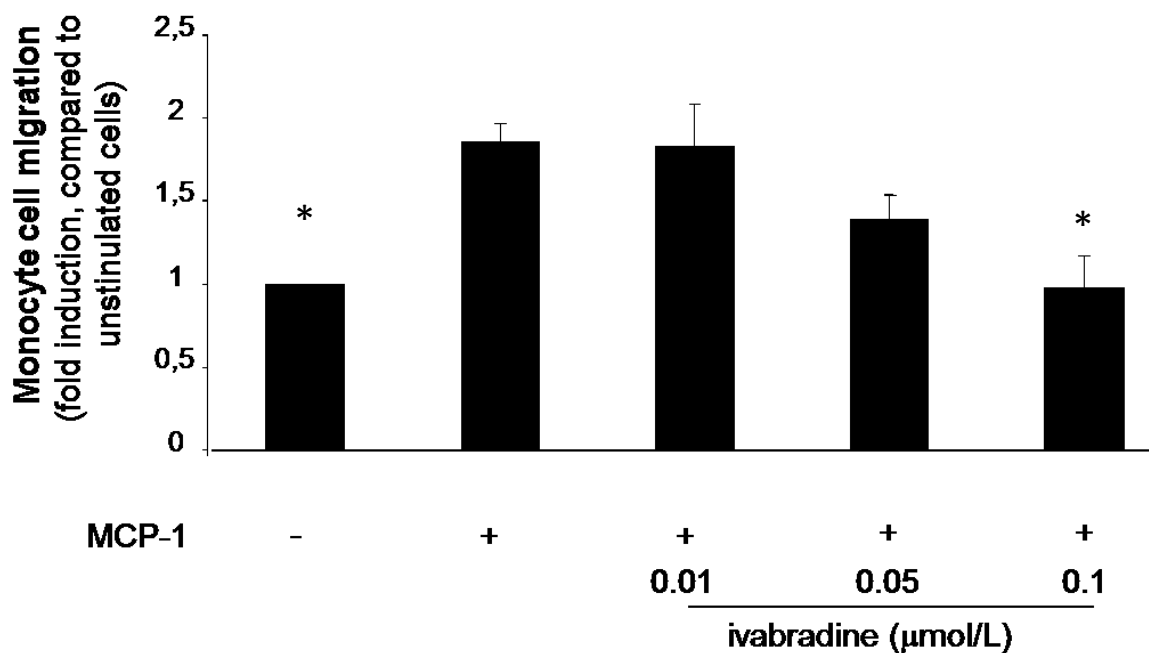


Abbildung 6: Ivabradin hemmt die Monozytenmigration

Ivabradin (0.01 $\mu\text{mol/l}$, 0.05 $\mu\text{mol/l}$ oder 0.1 $\mu\text{mol/l}$) inhibiert konzentrationsabhängig die Monozytenmigration. Die Monozyten wurden 15 Minuten mit Ivabradin in verschiedener Konzentration vorinkubiert und dann mit MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) (50 ng/ml) für die Migration (3h) stimuliert. Die Säulen zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; * $p < 0.01$ im Vergleich zu den mit MCP-1 stimulierten Zellen; $n=4$

3.3 Ivabradin reduziert die Chemokin-induzierte transendotheliale Migration von humanen Monozyten

Bei der Transmigration migrieren die Monozyten durch eine von HCAEC-Zellen gebildeten Endothelzellschicht. Dabei wurde die transendotheliale Migration durch das Chemokin MCP-1 (50ng/ml) induziert. Die Vorstimulation mit Ivabradin für 15 Minuten in verschiedenen Konzentrationen (0.5 $\mu\text{mol/l}$, 0.1 $\mu\text{mol/l}$) führte zu einer Abnahme der Monozyten-Transmigration (Abbildung 7). Dabei zeigte sich, dass nach 1 h Inkubation, die Transmigration bei Vorstimulation mit MCP-1 (50ng/ml) 2.1-fach höher ist, als die der unstimulierten Probe. Bei der Stimulation mit Ivabradin mit einer Konzentration von 0.1 $\mu\text{mol/l}$ zeigte sich eine maximale Hemmung der transendothelialen Migration um 0.61 ± 0.09 .

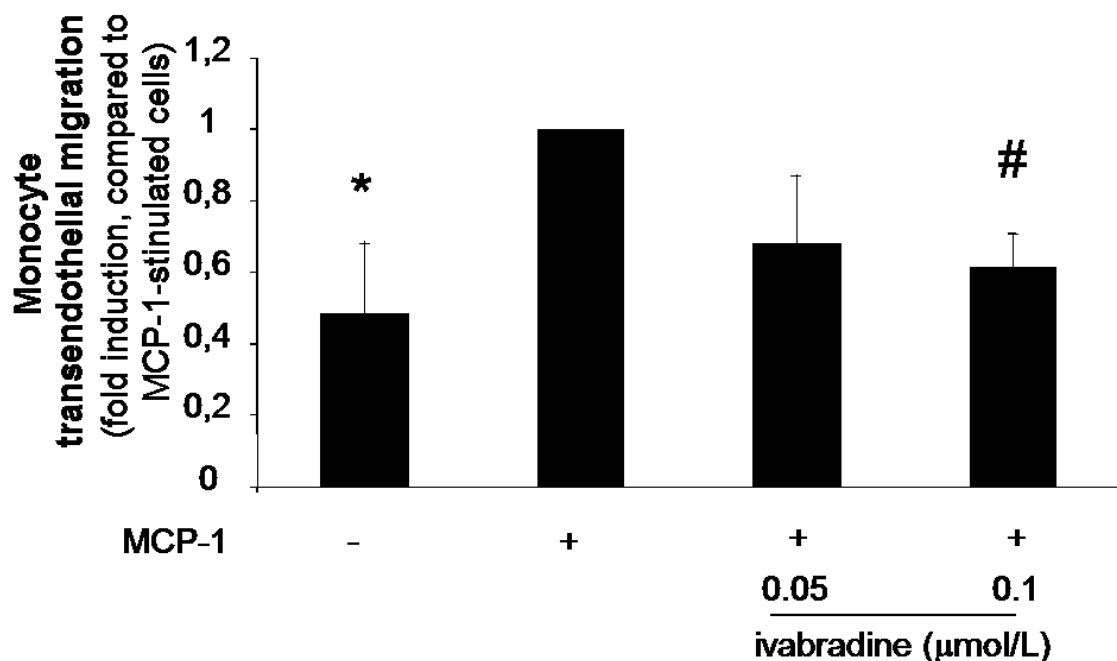


Abbildung 7: Ivabradin hemmt die Monozyten transendotheliale Migration

Ivabradin (0.05 $\mu\text{mol/l}$ und 0.1 $\mu\text{mol/l}$) inhibiert konzentrationsabhängig die transendotheliale Migration von Monozyten. Die Monozyten wurden 15 Minuten mit Ivabradin in verschiedener Konzentration vorstimuliert. Ivabradin hemmt die MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) ausgelöste transendotheliale Migration der humanen Monozyten. Die Säulen zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; * $p < 0.01$ und # $p < 0.05$ im Vergleich zu den mit MCP-1 stimulierten Zellen; $n=3$

3.4 Ivabradin hemmt die MCP-1 induzierten intrazelluläre Signalwege von ERK und MLC

3.4.1 Ivabradin hemmt die MCP-1 induzierte Phosphorylierung von ERK in humanen Monozyten

Das intrazelluläre Molekül ERK, das wichtig für die Migration der Monozyten durch die Gefäßwand ist, indem es im phosphorylierten Zustand zur Kontraktion des Monozyten beiträgt, wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse untersucht.

Dabei wurde in den Versuchen gezeigt, dass nach 5-minütiger Stimulation mit MCP-1 (50 ng/ml) und einer Vorstimulation mit dem Inhibitor Ivabradin in verschiedenen Konzentrationen (0.01 µmol/l, 0.05 µmol/l und 0.1 µmol/l) die Phosphorylierung von pERK in den Monozyten gehemmt wurde. Um die Gleichheit der Proteinladung darzustellen wurde GAPDH als Ladungskontrolle verwendet. Es zeigte sich eine maximale Hemmung von $0,44 \pm 0,26$ bei einer Ivabradin Konzentration von 0.1 µmol/l (*p<0.01 im Vergleich zu den mit MCP-1 behandelten Zellen; n=10).

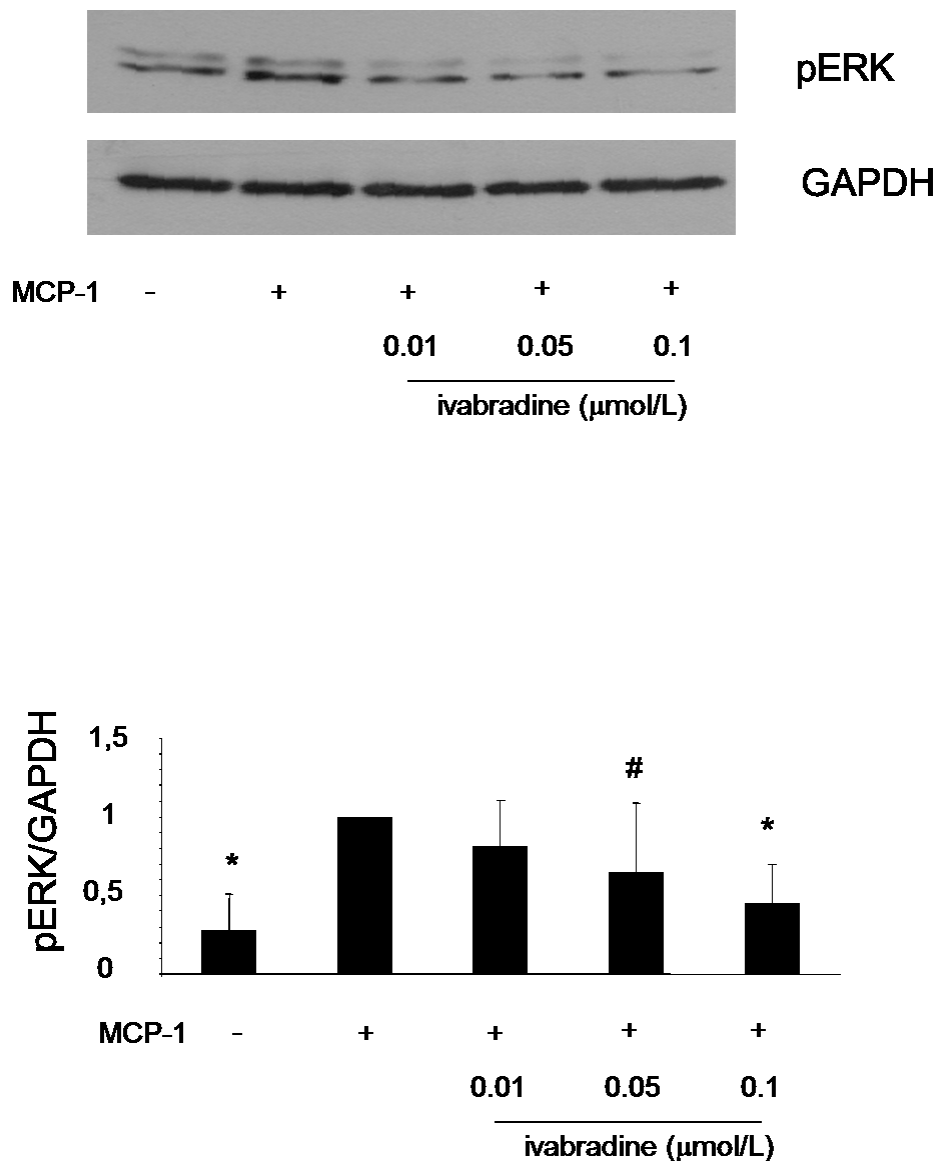


Abbildung 8: Ivabradin reduziert die MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) induzierte Phosphorylierung von ERK (extracellular-signal-regulated kinases) in Monozyten.

Ivabradin (0.01 $\mu\text{mol/l}$, 0.05 $\mu\text{mol/l}$ oder 0.1 $\mu\text{mol/l}$) inhibiert konzentrationsabhängig die Phosphorylierung von ERK zu pERK (phosphorylierte extracellular-signal-regulated kinases). Die Monozyten wurden 30 Minuten mit Ivabradin vorstimuliert. Anschließend wurde mit MCP-1 (50 ng/ml) stimuliert und die Western Blot Analyse für pERK nach 5 Minuten durchgeführt.

Oben: Western Blot Analyse für pERK, wobei GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) als Ladungskontrolle dient.

Unten: Die Säulen zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; * $p < 0.01$ und # $p < 0.05$ im Vergleich zu den mit MCP-1 stimulierten Zellen; $n=10$

3.4.2 Ivabradin hemmt die MCP-1 induzierte Phosphorylierung von MLC in humanen Monozyten

Ein weiteres wichtiges Molekül, welches die Migration der Monozyten ermöglicht ist das MLC. Das intrazelluläre Molekül ermöglicht ebenfalls im phosphorylierten Zustand eine Kontraktion der Monozyten, die diesen die Migration ermöglicht.

In den Versuchen wurde eine konzentrationsabhängige Abnahme der durch MCP-1 ausgelösten Phosphorylierung des Moleküls gezeigt, indem der Inhibitor Ivabradin in unterschiedlichen Konzentrationen (0.01µmol/l, 0.05µmol/l und 0.1µmol/l) hinzugegeben wurde. Dabei wurden die Zellen 5 min mit MCP-1 (50 ng/ml) stimuliert. Als Ladungskontrolle diente ebenfalls GAPDH. Es zeigte sich eine maximale Hemmung von $0,6 \pm 0,3$ bei einer Ivabradin Konzentration von 0.1 µmol/l (*p<0.01 im Vergleich zu den mit MCP-1 behandelten Zellen; n=6).

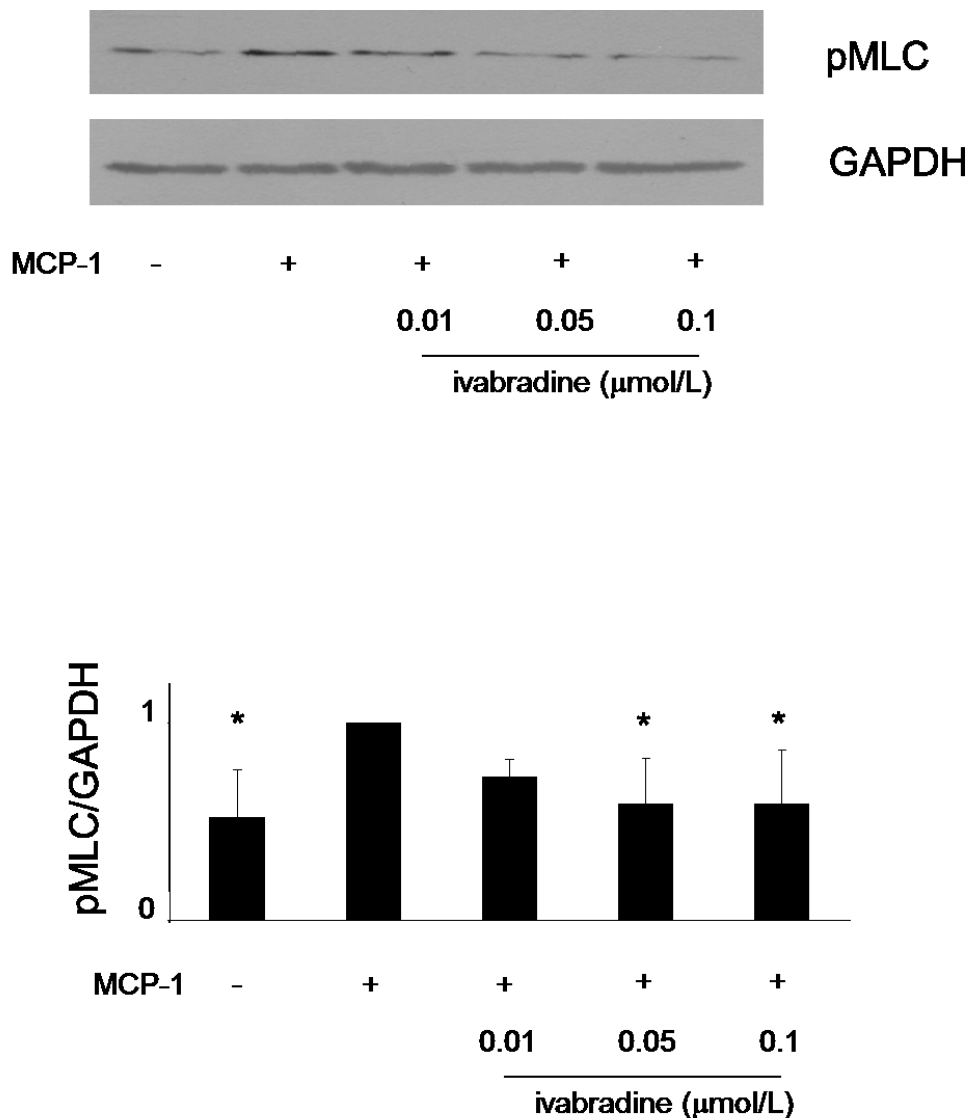


Abbildung 9: Ivabradin reduziert die MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) induzierte Phosphorylierung von MLC (Myosin-light chain) in Monozyten.

Ivabradin (0.01 $\mu\text{mol/l}$, 0.05 $\mu\text{mol/l}$ oder 0.1 $\mu\text{mol/l}$) inhibiert konzentrationsabhängig die Phosphorylierung von MLC zu pMLC (phosphorylierte Myosin-light chain). Die Monozyten wurden 30 Minuten mit Ivabradin vorstimuliert. Anschließend wurde mit MCP-1 (50 ng/ml) stimuliert und die Western Blot Analyse für pMLC nach 5 Minuten durchgeführt.

Oben: Western Blot Analyse für pMLC, wobei GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) als Ladungskontrolle dient.

Unten: Die Säulen zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; * $p < 0.01$ im Vergleich zu den mit MCP-1 stimulierten Zellen; $n=6$

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Ivabradin in vitro konzentrationsabhängig die Chemokin-induzierte Migration und Transmigration humaner Monozyten hemmt. Des Weiteren wirkt Ivabradin konzentrationsabhängig hemmend auf die MCP-1 induzierte Phosphorylierung von ERK und MLC in Monozyten.

4.1 Ivabradin

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sich durch den konzentrationsabhängigen Einsatz von Ivabradin eine Inhibition der Monozytenchemotaxis erreichen lässt. Dabei wurde in dieser Arbeit Ivabradin in den Konzentrationen von 0.01 bis 0.1 $\mu\text{mol/l}$ verwendet.

Ivabradin wurde zur Therapie der chronisch stabilen Angina pectoris mit seiner antiischämischen und antianginösen Potenz im Oktober 2005 in Europa zugelassen (Canet et al. 2011) (Schipke et al. 2006). Im Februar 2012 erhielt Ivabradin eine Zulassungserweiterung zur Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz (Servier GmbH 2012).

Für die in Deutschland für Ivabradin zugelassenen Anwendungsgebiete der koronaren Herzerkrankung und der chronischen Herzinsuffizienz werden Dosierungen von 10-15 mg pro d verwendet (Servier GmbH 2012). Die REDUCTION-Studie zeigte, dass eine Abnahme der Herzfrequenz unter Ivabradin Einnahme um zehn Schläge pro Minute mit einer Abnahme der Angina-pectoris Attacken um 80 Prozent einhergeht (Werdan 2008). Klinische Untersuchungen zeigten, dass unter Ivabradin die Zeit unter Belastung bis zur belastungsabhängigen Ischämie verlängert wird (Tardif et al. 2005). Nebenwirkungen in der Phase-II-Studie zeigten sich mit Ausnahme von visuellen Effekten in Form von Phosphenen, die aufgrund pharmakologischer Wirkung von Ivabradin erwartet wurden, nicht. Diese traten dosisabhängig bei 1,6 – 14,8 % der Patienten auf. Somit lag die allgemeine Verträglichkeit des Medikaments auf dem Niveau des Placebos (Schipke et al. 2006).

Mit dem I_f-Kanal Hemmer Ivabradin (Procoralan®) wurde in der frühen Phase der Atherosklerose-Forschung vor allem an überfütterten Hasen, Primaten und Mäusen geforscht. Zudem wurden Versuche an Knockout-Mäusen gemacht, die homozygot ApoE-

defizient sind und somit eine Hypercholesterinämie und Atherosklerose entwickeln (Hansson 2005) (Hansson et al. 2006).

Ivabradin wirkt auf I_f -Kanäle und hat somit eine Herzfrequenz senkende Wirkung. In Versuchen zeigte sich, dass durch den Effekt der Herzfrequenzsenkung indirekt auch eine Wirkung auf die Gefäßwand ausgeübt und somit die Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen reduziert wird. Diesen Effekt zeigten frühe Studien von Kaplan et al. und Beere et al., welche an Affen durchgeführt wurden. Dabei wurde den Versuchstieren sowohl über Ablation des sino-atrialen Knotens als auch über die Gabe Herzfrequenz senkender Medikamente die Herzfrequenz reduziert und deren Effekt auf die Bildung von atherosklerotischen Plaques untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Herzfrequenzsenkung einen positiven Effekt auf die Atherogenese hat (Beere et al. 1984) (Kaplan et al. 1987). Weitere Versuche legten dar, dass bei dyslipidämischen Mäusen die Reduktion der chronischen Herzfrequenz durch Ivabradin einen Schutz für die Endothelfunktion darstellt (Speranza et al. 2012). Diese Ergebnisse würden dafür sprechen, dass Ivabradin seine protektive Wirkung über die Reduktion der Herzfrequenz vermittelt. Dies legen auch die Versuche an ApoE^{-/-} Mäusen von Custodis et al. dar. Die Versuche zeigten, dass Ivabradin die Endothelfunktion beeinflusst und somit die Atherogenese reduziert. Dabei wurden die Mäuse im Versuch mit Ivabradin behandelt. Es zeigte sich, dass sich durch den Einsatz von Ivabradin die atherosklerotischen Plaques in der Aortenwurzel um über 40% und die Plaques in der Aorta ascendens um über 70% verkleinerten und damit die Atherogenese signifikant verlangsamt werden konnte (Custodis et al. 2008). In den Mäuseversuchen zeigte sich zudem, dass durch die Gabe von Ivabradin die linksventrikuläre Kontraktilität nicht beeinflusst wird und Ivabradin sich so gut für Untersuchungen im Gefäßsystem eignet. Dabei reduziert Ivabradin die Marker für vaskulären oxidativen Stress, es war sowohl eine reduzierte NADPH Oxidation sowie eine Reduktion der Marker für die Lipid Peroxidation in der Gefäßwand feststellbar. Custodis et al. fanden zudem heraus, dass bei Dosen, die keinen Einfluss auf die Herzfrequenz haben, die Effekte auch in vivo sowie ex vivo am Aortenring und in Gefäßzellen in Kultur ausblieben (Custodis et al. 2008).

Gesteigerte Herzfrequenz und verminderte Herzfrequenz-Variabilität stehen überdies in Verbindung mit koronarer Plaque-Ruptur (Custodis et al. 2008) (Schipke et al. 2006). Dieser Effekt konnte auch in einer retrospektiven Studie an KHK-Patienten dargelegt

werden. Dabei konnte man beobachten, dass eine Ruhefrequenz über 80/min mit einem erhöhten Risiko für Plaque Rupturen einher geht (Heidland und Strauer 2001). Diese Ergebnisse weisen ebenfalls darauf hin, dass Ivabradin über eine Reduktion der Herzfrequenz wirkt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ivabradin über intrazelluläre Signalwege wirkt und so die Monozytenchemotaxis hemmt. In früheren Versuchen von Walcher et al. wurde gezeigt, dass Ivabradin ebenfalls die Chemokin-induzierte Migration von CD4⁺-Lymphozyten hemmt. Dabei konnte dargelegt werden, dass Ivabradin die SDF-1 induzierte wie auch die RANTES-induzierte Migration von CD4-positiven Lymphozyten inhibiert. Zusätzlich zeigten die Versuche, dass Ivabradin die PI-3 Kinase Aktivität und die Phosphorylierung von AKT in CD4-positiven Lymphozyten reduziert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Ivabradin die Rac1- Aktivität, die Phosphorylierung von MC und die f-Actin Bildung reduziert. Die Versuche zeigten ebenfalls, dass die ICAM3 Translokation in CD4⁺-Lymphozyten durch Ivabradin gehemmt wurde. Ivabradin reduziert ebenfalls die SDF-1 induzierte transendotheliale Migration von CD4⁺-Lymphozyten (Walcher et al. 2010).

In der klinischen BEAUTIFUL-Studie wurden Patienten mit stabiler KHK und linksventrikulärer Dysfunktion und einer Herzfrequenz von über 70 Schlägen mit Ivabradin behandelt. Kardiovaskulärer Tod sowie Hospitalisierung wegen Myokardinfarkt oder Herzinsuffizienz waren als kombinierter primärer Endpunkt vorab festgelegt. Es zeigte sich im Vergleich zur Placebo Gruppe eine reduzierte Rate an koronaren Endpunkten mit reduzierter Hospitalisierung wegen Infarkt oder instabiler Angina oder Revaskularisation. Der untersuchte primäre kombinierte Endpunkt erreichte das Signifikanzniveau nicht.

Die randomisierte placebo-kontrollierte Doppelblind- und Parallelgruppenstudie SHIFT-Studie bei 6.558 Teilnehmern hatte ergeben, dass Ivabradin die Prognose der Patienten im Vergleich zu der Placebo-Gruppe verbessert. Die ausgewählten Patienten mussten vor Studienbeginn eine Ruheherzfrequenz von über 70 pro Minute haben sowie an einer symptomatischen Herzinsuffizienz leiden, die linksventrikuläre Auswurffraktion musste dabei unter 35% betragen. Ivabradin wurde bis hin zu einer Maximaldosis von 7,5 mg 2-mal täglich titriert. Dabei war der primäre Endpunkt als Kombination aus Krankenhausaufnahmen wegen verschlechterter Herzinsuffizienz und kardiovaskulär

bedingtem Tod festgelegt. Dieser primäre Endpunkt zeigte sich in der Ivabradin-Gruppe signifikant gemindert. Die kardiovaskuläre und die Gesamtsterblichkeit unterschieden sich in den Gruppen der Studie nicht signifikant (Swedberg et al. 2010). Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung in der Bedeutung einer Herzfrequenzsenkung mit Ivabradin zur Verbesserung der klinischen Ergebnisse bei chronischer Herzinsuffizienz und bestätigen die wichtige Rolle, die die Herzfrequenz in der Pathophysiologie der Erkrankung spielt (Swedberg et al. 2010).

Nun zeigte die aktuelle klinische Studie SIGNIFY bei Patienten mit stabiler KHK, aber ohne Herzinsuffizienz, mit einer Herzfrequenz über 70 Schlägen nach einer medianen Beobachtungszeit von fast 28 Monaten, dass es in Bezug auf den primären Endpunkt, der Kombination aus kardiovaskuläre bedingtem Tod oder Herzinfarkt, durch den Einsatz von Ivabradin im Vergleich zum Placebo keinen signifikanten Unterschied gibt (Fox et al. 2013) (Fox et al. 2014). Es zeigte sich jedoch, dass das Auftreten von Bradykardien sowie Vorhofflimmern in der Ivabradin-Gruppe, im Vergleich zur Placebo Gruppe, signifikant höher lag (Fox et al. 2014) (Fox et al. 2015) (Stulc und Ceska 2014). Zudem zeigte sich widererwarten, dass unter Ivabradin der Endpunkt häufiger auftrat als unter der Placebo Gruppe. In der Gesamtgruppe war der Unterschied nicht signifikant. Bei Patienten mit symptomatischer Angina pectoris im Stadium CCS-Grad 2 oder höher stieg jedoch die jährliche Inzidenz an (Fox et al. 2014).

Vergleicht man die Ergebnisse der drei großen Studien (BEAUTIFUL, SHIFT und SIGNIFY) mit randomisierter Kontroll-Placebo Gruppe, liegt nahe, dass vor allem der Zusammenhang zwischen Ivabradin und der Genese der linksventrikulären Dysfunktion, ischämisch oder nicht-ischämisch, entscheidend ist (McMurray 2015). Um jedoch die Studien genau vergleichen zu können, müsste man die Einschluss-Kriterien sowie die Endpunkte vereinheitlichen. Ein einheitlicher Endpunkt könnte das Heranziehen der Hospitalisierungsrate bei Myokardinfarkt sein. Über diesen Endpunkt wurde in der BEAUTIFUL sowie in der SIGNIFY berichtet, dieser wurde jedoch in beiden Studien nicht signifikant reduziert. Zudem gibt es keine überzeugenden Daten, dass antianginöse Medikamente die Prognose bei KHK verbessern, mit Ausnahme von β -Blockern, welche den Tod und die Re-Infarkt Rate nach Myokardinfarkt senken (McMurray 2015).

Zusammenfassend stellt sich nun die Frage, warum Ivabradin mehr Wirkung zeigt bei Patienten mit nicht-ischämischer linksventrikulärer Dysfunktion. Solche Effekte zeigten sich ebenfalls für Digoxin, β -Blocker und Amiodaron. Eine Hypothese zur Erklärung wäre durch den Ischämie-bedingten Verlust der myokardialen Substanz und teilweise irreversiblen Funktionsverlust durch Narbenbildung durch Infarzierung erklärt. Wohingegen nicht-ischämische linksventrikuläre Dysfunktion teilweise reversibel ist. Eine andere Hypothese wäre das unterschiedliche metabolische Remodelling bei ischämischer und nicht-ischämischer Genese und daraus resultierenden unterschiedlichen Ansprechen auf die Behandlung (McMurray 2015).

Es müssten weitere Studien folgen, die den Einsatz und die Wirkung von Ivabradin in der klinischen Anwendung untersuchen.

4.2 Wirkung von MCP-1

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Stimulation mit MCP-1 eine Induktion der Migration und Transmigration von humanen Monozyten erreicht wird.

Glatte Muskelzellen sind der Hauptbestandteil der Blutgefäße und sind stark an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt, vor allem über die Ausschüttung von Chemokinen (Wang et al. 1991). Die größte Untergruppe der Chemokin-Familie ist die Cystein-Cystein Familie. Zu dieser Familie gehört das Monozyten Chemotaktisches Protein-1. Das MCP-1 ist ein monomeres Polypeptid mit einem Molekulargewicht zwischen 9000 bis 15000 Da und gehört zur Untergruppe der C-C Chemokin β Subfamilie. Mediatoren dieser Familie bestehen aus 4 konservierten Cysteinresten und haben eine ähnliche drei-dimensionale Struktur. MCP-1 wird auch Cystein-Cystein Chemokin Ligand 2 (CCL2) genannt (Aiello et al. 1999) (Reape und Groot 1999) (Satioglu et al. 2011) (Wang et al. 1991). MCP-1 wird von Monozyten, Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen in atherosklerotischen Plaques exprimiert und hat seine stärkste chemotaktische Wirkung auf Monozyten (Aiello et al. 1999) (Nelken et al. 1991). MCP-1 bindet an den Chemokin Rezeptor-2 (CCR2), welcher sich in hoher Konzentration vor allem auf peripheren Blutmonozyten, auf Makrophagen und auf T-Lymphozyten befindet (Dawson et al. 1999). Es zeigte sich in mehreren Versuchen, dass sich MCP-1 in humanen Atheromen und in Atheromen in Tieren nachweisen lässt und für die Monozyten Rekrutierung in die Arterienwand und für die Entstehung von Läsionen verantwortlich ist (Gerszten et al. 1999) (Reape und Groot 1999) (Ylä-Herttuala et al. 1991).

Versuche von Olzinski et al. zeigten die Wichtigkeit Chemokin-induzierter Migration und die der Chemokin-Rezeptor Expression. Die Mausversuche an ApoE^{-/-} Mäusen, bei denen eine Diät-induzierten Atherosklerose hervorgerufen wurde, zeigten, dass durch eine medikamentöse Hemmung des CCR2- Rezeptors die Makrophagen Infiltration in die atherosklerotischen Plaques in der Aortenwurzel reduziert werden kann (Olzinski et al. 2010). So zeigten Gerszten et al., dass Mäuse, welchen der Rezeptor für MCP-1 fehlt, weniger anfällig für Atherosklerose sind. Des Weiteren befanden sich bei diesen Mäusen weniger Monozyten in den Gefäßläsionen (Gerszten et al. 1999). In weiteren Tierversuchen wurde gezeigt, dass die Expression von MCP-1 im direkten Zusammenhang mit der Atherosklerose-Entstehung und Monozyten-Infiltration in die Gefäßläsion steht. Es konnte dargelegt werden, dass eine Anti-Monozyten MCP-1 Gentherapie ein

Fortschreiten und die Destabilisierung des atherosklerotischen Plaque in ApoE- Knockout Mäusen verringerte (Koenig und Khuseyinova 2007).

Das proinflammatorische Chemokin MCP-1 spielte auch eine Schlüsselrolle bei der Progression atherosklerotischer Läsionen (Aiello et al. 1999) (Custodis et al. 2008). Mäuseversuche mit ApoE^{-/-} Mäusen zeigten bei Aiello et al., dass eine MCP-1 Expression durch Leukozyten vor allem durch Makrophagen, unabhängig von Plasma Lipid, Plasma Lipidprotein Profil und vom Körpergewicht der Versuchstiere, eine Zunahme der Progression der Atherosklerose, durch vermehrte Makrophagen Anhäufung und durch Akkumulieren von oxidierten Lipiden, hervorruft (Aiello et al. 1999).

Gu et al. machten Versuche an LDL-defizienten Mäusen. Diese hatten ebenfalls einen genetischen Mangel an MCP-1 und zeigten im Vergleich zu den Mäusen mit MCP-1 Wildtyp Allelen unter gleichem Serum-Cholesterol eine 83% niedrigere Lipidablagerung in der Aorta. Es konnte ebenfalls dargelegt werden, dass die Makrophagen Anzahl in der Aorta der Tiere niedriger war als bei den Vergleichstieren (Gu et al. 1998). Es zeigten sich ähnliche Ergebnisse bei Versuchen an Mäusen von Dawson et al., bei denen MCP-1/CCL2 Rezeptor (CCR2)-defiziente Mäuse mit ApoE^{-/-} Mäusen gekreuzt wurden. Dabei zeigten die doppel-Knockout Mäuse eine dreifach niedrigere Ausprägung der atherosklerotischen Läsionen in der Aorta als die ApoE^{-/-} Kontrollmäuse. Des Weiteren waren die Läsionen der zweifach mutierten Mäuse geringer fortgeschritten und bestanden vor allem aus Schaumzellablagerungen und fatty streaks, welche sich hauptsächlich auf der Aortenklappe oder in der angrenzenden Umgebung der Klappe befanden (Dawson et al. 1999). Dieser Effekt lässt sich nicht nur an durch Lipid ausgelöste Atherosklerose nachvollziehen, sondern im Folgenden auch an durch Transplantation ausgelöster Atherosklerose. Dies zeigten die Mausversuche von Öhman et al. Bei ApoE^{-/-} Mäusen wurde durch die Transplantation von inflammatorischen Viszeralfett Atherosklerose initiiert. Im Vergleich dazu war dies bei ApoE^{-/-} und MCP-1^{-/-} Mäusen durch Transplantation nicht auslösbar. Des Weiteren zeigte sich bei den ApoE^{-/-} Mäusen nach Transplantation ein Anstieg des Plasma MCP-1 Spiegel, dies war bei den ApoE^{-/-} und MCP-1^{-/-} Mäusen nicht der Fall (Öhman et al. 2010).

Custodis et al. konnten mithilfe einer PCR Analyse der mRNA in der Aorta ApoE^{-/-} Mäuse zeigen, dass sich nach einer Behandlung von Mäusen mit Ivabradin die MCP-1

Expression um $26\pm 7\%$ reduziert (Custodis et al. 2008). Dies könnte darauf hindeuten, dass eine Inhibition der Migration und Transmigration über die reduzierte Ausschüttung von MCP-1 wirkt. Doch in der hier vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass es durch die Gabe von Ivabradin ebenfalls zu einer Reduktion der Phosphorylierung auf Ebene der intrazellulären Signalkaskade kommt.

Im Mausmodell ist die Rolle des MCP-1/CCL-2 in der Entstehung der Atherosklerose schon recht klar. Wenig weiß man jedoch über die Rolle des MCP-1 in vivo bei Menschen. Satiroglu et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen dem Anstieg des MCP-1 Levels und dem Ausmaß der atherosklerotischen peripheren Verschlusskrankheit. Dabei wurden 80 Patienten rekrutiert, wobei 41 Patienten keine pAVK und 39 Patienten verschiedene Stadien der Erkrankung zeigten. Es wurde festgestellt, dass bei den Patienten ohne pAVK das MCP-1 Level signifikant niedriger war als bei den Patienten mit pAVK. Dabei wurde zusätzlich festgestellt, dass sich mit steigendem Schweregrad der Erkrankung auch der MCP-1 Spiegel erhöht. So könnte man MCP-1 auch als Diagnosewert für die pAVK und deren Ausmaß heranziehen (Satiroglu et al. 2011). Piemonti et al. untersuchten den MCP-1/CCL2 Spiegel von 363 Patienten mittleren Alters (61 ± 12 Jahre, BMI 30.1 ± 6.6 kg/m², 15% mit Typ2 Diabetes mellitus und 12% mit beeinträchtigte Glucose Toleranz). Dabei zeigte sich, dass der MCP-1 Spiegel von Typ 2 Diabetikern erhöht war und dass eine signifikante Korrelation zwischen dem MCP-1 Spiegel und den biochemischen Risikomarkern für Atherosklerose besteht. Nach 15 Jahren, waren 82 Patienten an kardiovaskulären Erkrankungen gestorben. Es konnte eine Verbindung zwischen dem MCP-1 Level und dem Risiko an kardiovaskulären Erkrankung zu versterben aufgezeigt werden (Piemonti et al. 2009). Aufgrund der Patientenstudie könnte man MCP-1 eine direkte Rolle in der Entstehung der Atherosklerose beim Menschen zuweisen. Auch bei Patienten mit erhöhtem Alter (Inadera et al. 1999), Hypertonie (Parissis et al. 2000), Hypercholesterinämie (Garlichs et al. 2001) und Niereninsuffizienz (Papayianni et al. 2002) konnten erhöhte MCP-1/CCL2 Level festgestellt werden. Somit konnte man erhöhte MCP-1 Spiegel nicht nur bei Individuen vorfinden, die an Folgeerkrankungen der Atherosklerose leiden, sondern auch bei Individuen die unter Risikofaktoren leiden (Piemonti et al. 2009). Dabei konnte bei Analysen von Personen aus der Framingham Heart Study Offspring Kohorte (50% Frauen, Mittleres Alter 62 Jahre) festgestellt werden, dass genetische Varianten des MCP-1/CCL2 Gens mit erhöhten Serumkonzentrationen

von Chemokinen einhergehen und die untersuchten Personen eine höhere Prävalenz für Myokardinfarkte aufwiesen (McDermott et al. 2005). MCP-1 kann somit als ein Diagnoseparameter als auch als ein Prognoseparameter für Patienten mit atherosklerotischen Erkrankungen angesehen werden (Piemonti et al. 2009) (Satioglu et al. 2011).

Schlussfolgernd kann man MCP-1 als den stärksten Initiator für die Monozytenaktivierung und deren Migration ansehen. Somit stellt MCP-1 den wichtigsten Auslöser für die Atherosklerose dar (Dawson et al. 1999), ist aber auch entscheidend an der Progression der Erkrankung beteiligt. Durch die oben aufgeführten Studien, konnte die wichtige Rolle des MCP-1 in der Entstehung und in der Progression der Atherosklerose aufgezeigt werden. Monozytenablagerungen sind gerade für die Destabilisierung der Plaques verantwortlich und folglich Auslöser für atherosklerotischer Folgeerkrankungen wie Apoplex und Myokardinfarkt. Der Ansatzpunkt mit Ivabradin gezielt die Monozytenablagerung zu reduzieren, führt zu einer Stabilisierung der Plaques und somit zu einem geringeren Risiko für Folgeerkrankungen der Atherosklerose. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen, dass die MCP-1 Wirkung, ein Auslöser der Entstehung von Atherosklerose, durch die Wirkung von Ivabradin nicht nur aufgehoben werden kann, sondern dass Ivabradin protektive Effekte zeigt. Da MCP-1 nicht nur bei den Folgeerkrankungen, wie pAVK und dem Myokardinfarkt erhöht ist, sondern schon bei Patienten mit Risikofaktoren, wie hohem Alter, Hypertonie, Hypercholesterinämie und Niereninsuffizienz, wäre schon in der frühen Phase vor klinischer Manifestation ein klinisch relevanter Ansatzpunkt für den Einsatz von Ivabradin gegeben. Somit könnte das Entstehen und Fortschreiten der Atherosklerose schon in der Frühphase unterbunden werden.

4.3 Intrazelluläre Signalkaskade

Das chemotaktische Verhalten von Monozyten wird über unterschiedliche intrazelluläre Signalwege vermittelt. Die zwei Moleküle ERK und MLC, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, spielen dabei eine wichtige Rolle. Inwiefern diese Moleküle bei der Chemotaxis der Monozyten zusammenspielen, soll im Folgenden geklärt werden.

ERK1/2 sind die Hauptsignalmoleküle der MAPK Familie (Guo et al. 2013). ERK ist eine Proteinkinase die in der Lage ist Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2) und Myelin basic protein (MBP) zu phosphorylieren. Dabei wird ERK über eine Vielzahl extrazellulärer Signale aktiviert. ERK wird erst durch eine Tyrosin-Phosphorylierung vollständig aktiviert und setzt so eine Signalkaskade in Gang. Es konnte gezeigt werden, dass ERK 1 und ERK 2 ubiquitär im gesamten Gewebe von Ratten vorhanden sind (Cobb et al. 1991). ERK konnte in vielen Zelllinien unterschiedlicher Spezies wie Mensch, Maus, Hund, Huhn, Ratten und Frosch nachgewiesen werden (Boulton und Cobb 1991).

Die zwei Proteine, die für die Kontraktilität einer Zelle zuständig sind, sind Aktin und Myosin. Dabei bestehen die Myosin Filamente aus zwei identischen Schwereketten und aus zwei Leichtketten. Die Leichtketten, die durch Phosphorylierung regulierbar sind werden als MLC-2 bezeichnet. Diese werden durch die Myosin-Leichtketten Kinase phosphoryliert und können so eine Kontraktion auslösen. Die Isotypen MLC-1 und MLC-3 sind nicht phosphorylierbar (Higashihara et al. 2008). Nicht muskuläre Zellen bestehen aus Myosin II, das wiederum aus zwei leichten und zwei schweren Ketten besteht (Klemke et al. 1997). Dabei wird die Phosphorylierung über die Myosin-Leichtketten Kinase ausgelöst, diese wird wiederum durch eine Erhöhung intrazellulärer freier Ca^{2+} Ionen ausgelöst. Die Balance zwischen Myosin Leichtketten-Kinase und Myosin Leichtketten-Phosphatase reguliert die Phosphorylierung der Myosin Leichtketten (Guo et al. 2013) (Klemke et al. 1997).

Die Interaktion zwischen dem Monozyten und dem Endothel über den Integrin-Rezeptor aktiviert eine ERK-Signalkaskade, die zu einer Phosphorylierung des ERK Protein (MAP Kinase) und somit zu einer Phosphorylierung der myosin light chain (MLC) führt (Haidari et al. 2011). Die Phosphorylierung der MLC führt zu einer Veränderung im Aktin-Myosin Zytoskelett und ermöglicht es so dem Monozyten zwischen den Endothelzellen

hindurch zu migrieren, indem eine Kontraktion ausgelöst wird. Dabei wird MLC über eine Rho-Kinase moduliert, indem diese die Phosphatase, welche die Dephosphorylierung von MLC steuert, durch Phosphorylierung selbst inaktiviert (Vincente-Manzanares et al. 2005). ERK-Inhibition führt zu einer Verminderung der Myosin-Leichtketten Phosphorylierung in glatten Muskelzellen. Die extracellulär signalregulated kinase (ERK1/2) wirkt dabei möglicherweise direkt über die Phosphorylierung von Myosin Leichtketten. Dabei zeigten die Versuche, dass eine Hemmung von ERK1/2 zu einer geringeren Phosphorylierung der MLC (20kDA) führt. Die Versuche konnten nicht zeigen, ob ERK1/2 direkt auf die Phosphorylierung von MLC durch MLCK wirkt oder ob MLC ein Substrat in der Signalkaskade von ERK ist und so über zwischengeschaltete Kinasen beeinflusst wird (D'Angelo und Adam 2002). Dies konnten die Versuche von Klemke et al. darlegen. Es zeigte sich, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der ERK und der MLCK Aktivität besteht. Deren Aktivierung führt zu einer gesteigerten Integrin-vermittelten Zellmigration. Durch die direkte Hemmung der ERK konnte eine Hemmung der Migration von (FG-)Tumorzellen erreicht werden. Die Phosphorylierung von MLC durch Ca^{2+} /Calmodulin-abhängiges Enzym die MLCK ist wichtig für die Zellmigration. Dies führt wiederum zu einer Myosin Formation, die eine Verbindung mit dem Aktin Filament ermöglicht und so die Aktin-aktivierte ATPase Aktivität des Myosins II stimuliert. Dabei zeigten die Versuche, dass eine Hemmung der MAP Kinasen (ERK 1 und ERK 2) zu einer verminderten Migration führen (Klemke et al. 1997).

Die Signalkaskade, die zu der Phosphorylierung der Signalmoleküle führt, wird durch die Bindung des Monozyten an die Endothelzelle ausgelöst. Dabei kommt es zu Tyrosin Phosphorylierung von VE-Cadherin. Die VE-Cadherine stellen die Zellverbindung zwischen den Endothelzellen dar und müssen bei der transendothelialen Migration von den Monozyten überwunden werden. Damit die Monozyten durch das Endothel migrieren können, muss eine Tyrosin-Phosphorylierung der VE-Cadherine in den Endothelzellen stattfinden, welche die Zellverbindung schwächt (Haidari et al. 2011).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen dem Integrin auf einer THP-1 Zelle (human acute monocytic leukemia cells) und dem Adhäsionsmolekül auf der Endothelzelle (HUVECs = human umbilical vein endothelial cells und HAECs = human aortic endothelial cells) zu einer Induktion in der ERK Signalkaskade und somit zu einer MLC Phosphorylierung führt. Dies führt zu einer Erhöhung der transendothelialen

Migration der THP-1 Zellen. Dabei findet die durch MLC ausgelöste Kontraktion in den Endothelzellen statt (Haidari et al. 2011).

Sun et al. fanden heraus, dass in Versuchen an ApoE^{-/-} Mäusen, welche zusätzlich nicht muskuläre Myosin Leichtketten-Kinase defizient waren, die Größe der Läsionen in verschiedenen Regionen der Aorta um 53%, der Lipidgehalt in den Plaques um 44% und die Makrophagen Ablagerung um 40% zurückging. Dabei zeigte sich zusätzlich, dass Monozyten, in denen die nmMLCK fehlt, die MCP-1 induziert Migration reduziert werden konnte. Dabei wirkt die nmMLCK sowohl über einen Signalweg, bei dem die phosphorylierten Myosin Leichtketten gebunden sind als auch über einen ungebundenen Weg. Die Myosin Leichtketten-Kinase ist dabei für die Phosphorylierung der Myosin Leichtketten verantwortlich, die wiederum in Interaktion mit Aktin für die Kontraktilität der Zellen verantwortlich ist. Die Phosphorylierung findet bei Ser19/Thr18 statt und führt so zu einer Strukturänderung in der Tertiärstruktur und ermöglicht die Aktomysin Kontraktion. Es konnte aufgezeigt werden, dass nmmlck^{-/-} vor allem bei Monozyten und weniger bei Epithelzellen die transendotheliale Migration verhindert (Sun et al. 2011).

Somit konnte die Bedeutung der Phosphorylierung von ERK und der Phosphorylierung von MLC für die Progression der Atherosklerose gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Bedeutung von Ivabradin, welches über eine Hemmung der MCP-1 induzierten intrazellulären Signalkaskade, die Entstehung und Progress der Atherosklerose hemmt. Es konnte bis jetzt jedoch nicht gezeigt werden, wie Ivabradin die Atherogenese genau beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen dar, dass durch Ivabradin die MCP-1 induzierte Migration von Monozyten und ebenso die transendotheliale Migration von Monozyten in Ko-Kultur gehemmt werden. Zusätzlich konnte aufgezeigt werden, dass durch Ivabradin die intrazellulären Signalwege, die zu einer Migration der Monozyten führen, gehemmt werden, indem die Phosphorylierung von ERK und MLC reduziert wird.

5 Zusammenfassung

Die Migration der Monozyten in die Gefäßwand stellt einen entscheidenden Schritt der Atherogenese dar. Daten zeigten, dass der selektive I_f -Kanal (funny Ionenkanal) Blocker Ivabradin die Bildung von atherosklerotischen Plaques in Apolipoprotein E-Knockout Mäusen verringert. Der Mechanismus, inwiefern Ivabradin die Plaque-Bildung moduliert, ist jedoch nicht genau untersucht. Diese Arbeit untersucht die Chemokin-induzierte Migration und transendotheliale Migration humaner Monozyten durch Ivabradin.

Die Stimulation der Monozyten mit MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) führte zu einem $1,9 \pm 0,1$ fachen Anstieg der Zellmigration ($p < 0.01$; $n=4$). Die Vorstimulation der Zellen mit Ivabradin reduzierte den Effekt konzentrationsabhängig bis zu einem Maximum der 1.0 ± 0.2 fachen Induktion bei einer Konzentration von $0.1 \mu\text{mol/L}$ Ivabradin ($p < 0.01$ im Vergleich zu den mit MCP-1 stimulierten Zellen; $n=4$). Diese Effekte von Ivabradin auf die Monozyten Migration wurden durch die Hemmung der Phosphorylierung der MAP-Kinase (mitogen-activated protein-Kinase) in humanen Monozyten von 0.44 ± 0.26 und durch die Hemmung der Phosphorylierung auf Zytoskelettebene von 0.6 ± 0.3 bei einer Ivabradin Konzentration von $0.1 \mu\text{mol/l}$ belegt (* $p < 0.01$ im Vergleich zu den mit MCP-1 behandelten Zellen; $n=6$). Eine Vorstimulation mit Ivabradin inhibiert außerdem die transendotheliale Monozyten Migration um das 0.61 ± 0.09 fache ($p < 0.05$ im Vergleich zu den mit MCP-1 stimulierten Zellen; $n=3$).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ivabradin die Chemokin-induzierte Migration von humanen Monozyten hemmt. Weitere Studien und Versuche sollten folgen, um die vorliegenden Ergebnisse in vivo zu bestätigen. Ivabradin könnte in Zukunft als wichtiges Therapeutikum zur Reduktion der Entstehung und der Progression in der Atherogenese und zur Stabilität der Plaques beitragen.

1. **Aiello, R.; Bourassa, P.; Lindsey, S.; Weng, W.; Natoli, E.; Rollins, B.; Milos, P.** „Monocyte Chemoattractant Protein-1 Accelerates Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice.“ *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19, 1999: 1518-1525.
2. **Ashida, N.; Arai, H.; Yamasaki, M.; Kita, T.** „Differential Signaling for MCP-1-Dependent.“ *Annals of the New York Academy of Sciences* 947, 2001: 387-389.
3. **Baretton, C.; Kirkpatrick, C.; Bültmann, B.** „Gefäße.“ *Pathologie 4. Auflage: Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München*, S. 496-519 (2008).
4. **Beere, P.; Glagov, S.; Zarins, C.** „Retarding effect of lowered heart rate on coronary atherosclerosis.“ *Science* 226, 1984: 180-182.
5. **Boulton, T.; Cobb, M.** „Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies.“ *Cell Regulation* 2, 1991: 357-371.
6. **Canet, E.; Lerebours, G.; Vilaine, J.** „Innovation in coronary artery disease an heart failure: clinical benefits of pure heart rate reduction with ivabradine.“ *Annals of the New York of Sciences* 1222, 2011: 90-99.
7. **Cobb, M.; Robbins, D.; Boulton, T.** „ERKs, extracellular signal-regulated MAP-2 kinases.“ *Current opinion in cell biology* 3, 1991: 1025-1032.
8. **Custodis, F.; Baumhäkel, M.; Schlimmer, N.; List, F.; Gensch, C.; Böhm, M.; Laufs, U.** „Heart Rate Reduction by Ivabradine Reduces Oxidative Stress, Improves Endothelial Function, and Prevents Atherosclerosis in Apolipoprotein E - Deficient Mice.“ *Circulation* 117, 2008: 2377-2387.
9. **Cybulsky, M.; Iiyama, K.; Li, H.; Zhu, S.; Chem, M.; Iiyama, M.; Davis, V.; Gutierrez-Ramos, J.; Connelly, P.; Milstone, D.** „A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis.“ *The Journal of Clinical Investigation* 107, 2001: 1255-1262.
10. **D'Angelo, G.; Adam, L.** „Inhibition of ERK attenuates force development by lowering myosin light chain phosphorylation.“ *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 282, 2002: 602-610.
11. **Dawson, T.; Kuziel, W.; Osahar, T.; Maeda, N.** „Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.“ *Atherosclerosis* 143, 1999: 205-211.
12. **De Almeida, M.; Silva, A.; Barral, A.; Barral Netto, M.** „A simple method for human peripheral blood monocyte isolation.“ *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95, 2000: 221-223.
13. **Dollery, C.; Libby, P.** „Atherosclerosis and proteinase activation.“ *Cardiovascular Research* 69, 2006: 625-635.

14. **Fox, K.; Ford, I.; Steg, P.; Tardif, J.; Tendera, M.; Ferrari, R.** „Rationale, design, and baseline chStudy assessInG the morbidity-mortality beNefits of the If inhibitor ivabradine in patients with coronarY artery disease (SIGNIFY trial).“ *American Heart Journal* 166, 2013: 654-661.
15. **Fox, K.** „Ivabradine in Stable Coronary Artery Disease without Clinical Heart Failure.“ *The New England Journal of Medicine* 371, 2014: 1091-1099.
16. **Fox, K.** „Bradycardia and atrial fibrillation in patients with stable coronary artery disease treated with ivabradine: an analysis from the SIGNIFY study.“ *European Heart Journal* 36, 2015: 3291-3296.
17. **Frostegård, J.; Ulfgren, A.; Nyberg, P.; Hedin, U.; Swedenborg, J.; Andersson, U.; Hansson, G.** „Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines.“ *Atherosclerosis* 145, 1999: 33-43.
18. **Galis, Z.; Sukhova, G.; Lark, M.; Libby, P.** „Increased Expression of Matrix Metalloproteinases and Matrix Degrading Activity in Vulnerable Regions of Human Atherosclerotic Plaques.“ *Journal of Clinical Investigation* 94, 1994: 2493-2503.
19. **Garlichs, C.; John, S.; Schmeisser, A.; Eskafi, S.; Stumpf, C.; Karl, M.; Goppelt-Struebe, M.; Schmieder, R.; Daniel, W.** „Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia.“ *Circulation* 104, 2001: 2395-2400.
20. **Gerszten, R.; Garcia-Zepeda, E.; Lim, Y.; Yoshida, M.; Ding, H.; Gimbrone, M. Jr.; Luster, A.; Luscinskas, F.; Rosenzweig, A.** „MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions.“ *Nature* 398, 1999: 718-723.
21. **Gu, L.; Okada, Y.; Clinton, S.; Gerard, C.; Sukhova, G.; Libby, P.; Rollins, B.** „Absence of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Reduces Atherosclerosis in Low Density Lipoprotein Receptor–Deficient Mice.“ *Molecular Cell* 2, 1998: 275-281.
22. **Guo, X.; Deng, Y.; Shang, J.; Liu, K.; Xu, Y.; Liu, H.** „ERK signaling mediates enhanced angiotensin II-induced rat aortic constriction following chronic intermittent hypoxia.“ *Chinese Medical Journal* 126, 2013: 3251-3258.
23. **Haidari, M.; Zhang, W.; Chen, Z.; Ganjehei, L.; Warier, N.; Vanderslice, P.; Dixon, R.** „Myosin light chain phosphorylation facilitates monocyte transendothelial migration by dissociating endothelial adherens junctions.“ *Cardiovascular Research* 92, 2011: 456-465.
24. **Hansson, G.** „Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease.“ *The New England Journal of Medicine* 352, 2005: 1685-1695.
25. **Hansson, G.; Robertson, A.; Söderberg-Nauclér, C.** „Inflammation and Atherosclerosis.“ *Annual Review of Pathology* 1, 2006: 297-329.

26. **Hansson, G.** „Inflammatory mechanisms in atherosclerosis.“ *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7, 2009: 328-331.
27. **Heidland, U.; Strauer, B.** „Left ventricular muscle mass and elevated heart rate are associated with coronary plaque disruption.“ *Circulation* 104, 2001: 1477-1482.
28. **Higashihara, M.; Watanabe, M.; Usuda, S.; Miyazaki, K.** „Smooth muscle type isoform of 20 kDa myosin light chain is expressed in monocyte/macrophage cell lineage.“ *Journal of Smooth Muscle Research* 44, 2008: 29-40.
29. **Inadera, H.; Egashira, K.; Takemoto, M.; Ouchi, Y.; Matsushima, K.** „Increase of circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in aging.“ *Journal of Interferon & Cytokine Research* 19, 1999: 1179-1182.
30. **Kaplan, J.; Manuck, S.; Adams, M.; Weingand, K.; Clarkson, T.** „Inhibition of coronary atherosclerosis by propranolol in behaviorally predisposed mokeys fed an atherogenic diet.“ *Circulation* 76, 1987: 1364-1372.
31. **Klemke, R.; Cai, S.; Giannini, A.; Gallagher, P.; Lanerolle, P.; Cheres, D.** „Regulation of Cell Motility by Mitogen-activated Protein Kinase.“ *The Journal of Cell Biology* 137, 1997: 481-492.
32. **Klingenberg, R.; Hansson, G.** „Treating inflammation in atherosclerotic cardiovascular disease: emerging therapies.“ *European Heart Journal* 30, 2009: 2838-2844.
33. **Koenig, W.; Khuseynova, N.** „Biomarkers of Atherosclerotic Plaque Instability and Rupture.“ *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27, 2007: 15-26.
34. **Libby, P.** „Inflammation in atherosclerosis.“ *Nature* 420, 2002: 868-874.
35. **Libby, P.; Theroux, P.** „Pathophysiology of Coronary Artery Disease.“ *Circulation* 111, 2005: 3481-3488.
36. **Libby, P.** „Inflammation and cardiovascular disease mechanisms.“ *American Journal of Clinical Nutrition* 83, 2006: 456-460.
37. **Martinet, Y.; Martinet, N.; Vignaud, J.; Plenat, F.** „Blood monocyte chemotaxis.“ *Journal of Immunological Methods* 174, 1994: 209-214.
38. **McDermott, D.; Yang, Q.; Kathiresan, S.; Cupples, L.; Massaro, J.; Keaney, J. Jr.; Larson, M.; Vasan, R.; Hirschhorn, J.; O'Donnell, C.; Murphy, P.; Benjamin, E.** „CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study.“ *Circulation* 112, 2005: 1113-1120.
39. **McMurray, J.** „It is BEAUTIFUL we should be concerned about, not SIGNIFY: is ivabradine less effective in ischaemic compared with non-ischaemic LVSD?“ *European Heart Journal* 36, 2015: 2047-2049.

40. **Moore, K.; Tabas, I.** „Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis.“ *Cell* 145, 2011: 341-355.
41. **Müller, C.; Imhof, B.; Holländer, G.** „Immunreaktion.“ *Pathologier 4. Auflage*, Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München, S. 74-116.(2008).
42. **Nelken, N.; Coughlin, S.; Gordon, D.; Wilcox, J.** „Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Human Atheromatous Plaques.“ *Journal of Clinical Investigation* 88, Oktober 1991: 1121-1127.
43. **Öhman, M.; Wright, A.; Wickenheiser, K.; Luo, W.; Russo, H.; Eitzman, D.** „Mcp-1 Deficiency Protects Against Visceral Fat-induced Atherosclerosis.“ *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, 2010: 1151-1158.
44. **Olzinski, A.; Turner, G.; Bernard, R.; Karr, H.; Cornejo, C.; Aravindhan, K.; Hoang, B.; Ringenber, M.; Qin, P.; Goodman, K.; Willette, R.; Macphee, C.; Jucker, B.; Sehon, C.; Gough, P.** „Pharmacological Inhibition of C-C Chemokine Receptor 2 Decreases Macrophage Infiltration in the Aortic Root of the Human C-C Chemokine Receptor 2/Apolipoprotein E-/- Mouse: Magnetic Resonance Imaging Assessment.“ *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, 2010: 253-259.
45. **Papayianni, A.; Alexopoulos, E.; Giamalis, P.; Gionanlis, L.; Belechri, A.; Koukoudis, P.; Memmos, D.** „Circulating levels of ICAM-1, VCAM-1 and MCP-1 are increased in haemodialysis patients: association with inflammation, dyslipidemia and vascular events.“ *Nephrology Dialysis Transplantation* 17, 2002: 435-441.
46. **Parissis, J.; Venetsanou, K.; Kalantzi, M.; Mentzikof, D.; Karas, S.** „Serum profile of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and C-C chemokines in hypertensive patients with or without significant hyperlipidemia.“ *American Journal of Cardiology* 85, 2000: 777-779.
47. **Piemonti, L.; Calori, G.; Lattuada, G.; Mercalli, A.; Ragogna, F.; Garancini, M.; Ruotolo, G.; Luzzi, L.; Perseghin, G.** „Association Between Plasma Monocyte Chemoattractant Protein-1 Concentration and Cardiovascular Disease Mortality in Middle-Aged Diabetic and Nondiabetic Individuals.“ *Diabetes Care* 32, 2009: 2105-2110.
48. **Reape, T.; Groot, P.** „Chemokines and atherosclerosis.“ *Atherosclerosis* 147, 1999: 213-225.
49. **Renz-Polster, H.; Krautzig, S.; Hauch-Wunderle, V.** „Gefäße.“ *Basislehrbuch Innere Medizin*, Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München, S. 198-264 (2008)
50. **Ross R.** „Atherosclerosis - An inflammatory disease.“ *The New England Journal of Medicine* 340, 1999: 115-126.
51. **Ryu, J.; Hong, K.; Maeng, J.; Kim, J.; Ko, J.; Park, J.; Lee, K.; Hong, M.; Park, S.; Kim, Y.; Han, K.** „Overexpression of Uncoupling Protein 2 in THP1 Monocytes Inhibits β 2 Integrin-Mediated Firm Adhesion and Transendothelial Migration.“ *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24, 2004: 864-870.

52. **Satiroglu, O.; Uydu, H.; Demir, A.; Bostan, M.; Atak, M.; Bozkurt, E.** „Association between Plasma Monocyte Chemoattractant Protein-1 Levels and the Extent of Atherosclerotic Peripheral Artery Disease.“ *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 224, 2011: 301-306.
53. **Schipke, J.; Büter, I.; Hohlfeld, T.; Schmitz-Spanke, S.; Gams, E.** „Selektive If-Kanal Hemmung: eine Alternative in der Behandlung der koronaren Herzkrankheit?“ *Herz* 31, 2006: 55-74.
54. **Servier** Deutschland GmbH. „Fachinformationen - Procoralan®.“ 2012.
55. **Sica, A.; Wang, J.; Colotta, F.; Dejana, E.; Mantovani, A.; Oppenheim, J.; Larsen, C.; Zachariae, C.; Matsushima, K.** „Monocyte Chemotactic and Activating Factor Gene Expression Induced in Endothelial Cells by IL-1 and Tumor Necrosis Factor.“ *The Journal of Immunology* 144, 1990: 3034-3038.
56. **Smith, J.; Trogan, E.; Ginsberg, M.I.; Grigaux, C.; Tian, J.; Miyata, M.** „Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 1995: 8264-8268.
57. **Speranza, L.; Franceschelli, S.; Riccioni, G.** „The Biological Effects of Ivabradine in Cardiovascular Disease.“ *Molecules* 17, 2012: 4924-4935.
58. **Stulc, T.; Ceska, R.** „Ivabradine in Stable Coronary Artery Disease.“ *The New England Journal of Medicine* 10, 2014: 2435.
59. **Sun, C.; Wu, M.; Yuan, S.** „Nonmuscle myosin light-chain kinase deficiency attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via reduced endothelial barrier dysfunction and monocyte migration.“ *Circulation* 124, 2011: 48-57.
60. **Swedberg, K.; Komajda, M.; Böhm, M.; Borer, J.; Ford, I.; Dubost-Brama, A.; Lerebours, G.; Tavazzi, L.** „Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study.“ *The Lancet* 376, 2010: 875-885.
61. **Tardif, J.; Ford, I.; Tendera, M.; Bourassa, M.; Fox, K.** „Efficacy of ivabradine, a new selective If inhibitor, compared with atenolol in patients with chronic stable angina.“ *European Heart Journal* 26, 2005: 2529-2536.
62. **Vincente-Manzanares, M.; Webb, D.; Horwitz, A.** „Cell migration at a glance.“ *Journal of Cell Science* 118, 2005: 4917-4919.
63. **Walcher, T.; Bernhardt, P.; Vasic, D.; Bach, H.; Durst, R.; Rottbauer, W.; Walcher, D.I.** „Ivabradine Reduces Chemokine-Induced CD4-Positive Lymphocyte Migration.“ *Mediators of Inflammation*, 2010: 1-8.
64. **Wang, J.; Sica, A.; Peri, G.; Walter, S.; Padura, I.; Libby, P.; Ceska, M.; Lindley, I.; Colotta, F.; Mantovani, A.** „Expression of monocyte chemotactic protein and interleukin-8 by cytokine-activated human vascular smooth muscle cells.“ *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 11, 1991: 1166-1174.

65. **Werdan, K.** „Reduction of ischemic Events by reduction of heart rate in the treatment of stable Angina with Ivabradine.“ *ESC congress: s.n., Abstract P1348*, 2008.

66. **Ylä-Herttuala, S.; Lipton, B.; Rosenfeld, M.; Särkioja, T.; Yoshimura, T.; Leonard, E.; Witztum, J.; Steinberg, D.** „Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 1991: 5252-5256.

67. **Yu, H.; Zeng, Y.; Hu, J.; Li, C.** „Fluid shear stress induces the secretion of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells.“ *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 26, 2002: 199-207.