

**Molekulare und funktionelle Charakterisierung von
Ecto-5'-Nukleotidase/CD73defizienten Mausmutanten
zur Klärung der Bedeutung von extrazellulär gebildetem
Adenosin bei akuten und chronischen Entzündungsprozessen**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anja Buchheiser

aus Borna

Februar 2007

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. J. Schrader

Koreferent: Prof. Dr. H. Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2007

In Memoriam

Max

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Nukleotidvermittelte Signaltransduktion	4
1.2	CD73 - ein Kontrollpunkt in der extrazellulären Adenosinbildung	6
1.3	Basale Prozesse im Entzündungsgeschehen – Modulation durch Adenosin	8
1.4	Arteriosklerose – eine chronisch- inflammatorische Erkrankung	10
1.5	Zielsetzung	14
2	Material	15
2.1	Antikörper und Seren	15
2.1.1	Primärantikörper	15
2.1.2	Sekundärantikörper	15
2.1.3	Seren	15
2.2	Chemikalien	16
2.3	EDV, Software/Internet-Programme	16
2.4	Enzyme	16
2.5	Geräte	16
2.6	Häufig benutzte Lösungen und Puffer	18
2.7	Kommerzielle Kits	18
2.8	Radioaktiv markierte Substanzen	19
2.9	Molekulargewichtstandards	19
2.10	Synthetische Primer	19
2.11	Verbrauchsmaterialien	19
3	Methoden	20
3.1	Erzeugung der Mausmutanten	20
3.2	Haltung und Zucht der Versuchstiere	20
3.2.1	Zucht und Rückkreuzung von CD73 ^{-/-} -Mäusen	20
3.2.2	Zucht von ApoE ^{-/-} /CD73 ^{-/-} -Doppelmutanten	21
3.3	Genotypisierung der Versuchstiere	21
3.3.1	Gewinnung genomischer DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien	21
3.3.2	PCR zur Genotypisierung	22
3.4	Enzymaktivitätsassays	25
3.4.1	AMPase-Aktivität in Membranproteinextrakten	25
3.4.2	Bestimmung der AMPase-und CD73-Aktivität im Plasma	27

3.4.3	AMPase-Aktivitätsmessung	28
3.5	Blutbild.....	30
3.6	Messung von cAMP und cGMP in plättchenreichem Plasma (PRP).....	30
3.6.1	Vorbereitung der Plasmaproben.....	30
3.6.2	Radioimmun-Assay (RIA)	30
3.7	Differenzielle Genexpressionsanalysen	33
3.7.1	Semiquantitative RT- <i>real time</i> PCR	33
3.8	Zellkultur.....	36
3.8.1	Kultivierung muriner Stammzelle.....	36
3.8.2	Kultivierung von <i>Human umbilical vein endothelial cells</i> (HUVEC)	38
3.8.3	Murine Aortenendothelzellkultur nach Kreisel.....	39
3.8.4	Murine Aortenendothelzellkultur modifiziert nach Kobayashi	40
3.9	Bestimmung der Blutungszeit	42
3.10	Quantifizierung arteriosklerotischer Plaques	42
3.11	Histologie	42
3.11.1	Öl Rot Färbung (Oil-Red-O-Methode)	43
3.11.2	Cholesterinfärbung nach Smith-Dietrich	43
3.11.3	Kollagenfärbung mit Picro-Siriusrot.....	44
3.11.4	Masson Trichromfärbung.....	44
3.12	AMPaseNachweis an Schnittpräparaten	45
3.13	Immunhistologie.....	46
3.13.1	Hyaluronsäure-Nachweis	46
3.13.2	Kollagen-Neoepitopnachweis	46
3.13.3	Immunhistologische Nachweise.....	47
3.14	Mikroskopie und Aufnahme der Präparate	47
3.15	Quantifizierung von Cytokinen und Chemokinen im Plasma und Serum	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Phänotyp der CD73 ^{-/-} -Mutante.....	49
4.1.1	AMPase-Aktivität in Membranproteinfraktionen aus verschiedenen Geweben	49
4.1.2	AMPase-Aktivität im Plasma.....	51
4.1.3	AMPase-Aktivität an isolierten Aorten.....	52
4.1.4	AMPase-Aktivität an isolierten Herzen	54
4.1.5	Ex vivo Versuche zur Steigerung der AMPase-Aktivität	54
4.1.6	Blutbild.....	55

4.1.7	Plättchen- cAMP/cGMP-Spiegel	55
4.1.8	Differenzielle Expression der Adenosinrezeptoren an isolierten Geweben.....	56
4.1.9	Differenzielle Expression der Adenosinrezeptoren an isolierten Zellen.....	60
4.2	Physiologische Veränderungen in der CD73 ^{-/-} -Mutante	64
4.2.1	Adenosin- und AMP-Dosis-Wirkungskurven an isoliert perfundierten Herzen	64
4.2.2	Blutungszeit.....	65
4.3	Charakterisierung der ApoE ^{-/-} /CD73 ^{-/-} Doppelmutante.....	66
4.3.1	Arterioskleroseentwicklung unter Western Diät	66
4.3.2	Cytokine und Chemokine in der Arterioskleroseentwicklung	66
4.3.3	Das quantitative Ausmaß der Arteriosklerose.....	67
4.3.4	Plauekomposition	70
4.3.5	Adhäsionsmoleküle in arteriosklerotischen Plaques	74
4.3.6	Zellen in arteriosklerotischen Plaques.....	77
4.3.7	CD73-Aktivität und Expression in der Arteriosklerose	81
4.3.8	Fortgeschrittene Arteriosklerose an 12 Monate alten Tieren	85
5	Diskussion.....	91
5.1	Der Phänotyp der CD73 ^{-/-} -Maus ist unter basalen Bedingungen unauffällig.....	91
5.2	CD73 vs. Alkalische Phosphatase (ALP) als Quelle für extrazelluläres Adenosin ...	92
5.3	Beeinflussen Statine die CD73-Aktivität in der Maus?	94
5.4	Die Rolle der CD73 bei der Thromboregulation und Entzündung	95
5.5	Veränderungen der Adenosinrezeptorexpression in der CD73 ^{-/-} -Maus	96
5.6	Die CD73-Defizienz beschleunigt die Arterioskleroseentwicklung	99
5.7	Expression der CD73 in akuter und chronischer Entzündung	102
6	Zusammenfassung	104
7	Summary	105
8	Literatur	106
9	Abkürzungen	124
10	Danksagung.....	129
11	Erklärung.....	130

1 Einleitung

1.1 Nukleotidvermittelte Signaltransduktion

Nukleotide stellen eine intrazelluläre Energiequelle dar und spielen eine wichtige Rolle bei der Nucleinsäuresynthese. Darüber hinaus haben Nukleotide eine bedeutende Funktion als extrazelluläre Signalmoleküle, wie bereits in den 70er Jahren von Burnstock beschrieben wurde^{1;2}. Während man zunächst beschädigte, lytische Zellen für die Hauptquelle von extrazellulärem ATP hielt, ist heute die ATP-Freisetzung aus verschiedenen Zellen als physiologischer Mechanismus gut charakterisiert^{3;4}. Zahlreiche neuere Studien belegen, dass verschiedene Zelltypen konstitutiv Nukleotide freisetzen und es zu einer basalen Aktivierung einiger G-Protein-gekoppelter Purinrezeptoren kommt⁵⁻⁸. Somit ist eine basale G-Proteinaktivität und infolge dessen die Synthese von *second messenger* Molekülen wie cAMP gewährleistet⁵.

Excitatorische Zelltypen wie Neuronen setzen als Reaktion auf depolarisierende Stimuli, welche zur Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels führen, vermehrt nukleotidhaltige Vesikel oder Granulae frei⁹⁻¹². Auch Blutplättchen können exozytotisch ATP und ADP freisetzen^{13;14}. Auf Reize wie mechanischen („*shear*“) Stress¹⁵⁻¹⁸, Hypoxie¹⁹⁻²¹, Membranhypervolarisation, hypotonischen oder hypertonen Stress²²⁻²⁶ und auf Entzündungen⁴ reagieren viele nicht-excitatorische Zellen mit einer Nukleotidfreisetzung. Bei diesen Zellen werden Plasmamembrantransportproteine für die Nukleotidfreisetzung verantwortlich gemacht. Dazu gehören im wesentlichen ATP-*binding cassette*- (ABC-) Transporter, Anionenkanäle und Connexine²⁷⁻³¹.

Das über Zellyse, Exocytose oder Transporter freigesetzte, bzw. durch Phosphorylierung extrazellulärer Nucleoside^{32;33} gebildete ATP und ADP ist an der Regulation der Hämostase und Thrombose beteiligt. Diese Prozesse werden über die Aktivierung und Aggregation von Plättchen gesteuert³⁴⁻³⁷. Darüber hinaus modulieren ADP und ATP verschiedene Entzündungsantworten wie die Freisetzung von Cytokinen, *Tumor necrose factor* (TNF-) α und Interleukin (IL-)1 β von Monozyten und Makrophagen und unterstützen die Leukozytenadhäsion am Endothel³⁸⁻⁴¹. Diese Effekte werden über die Aktivierung von P2-Purinrezeptoren vermittelt. Purinrezeptoren wurden ursprünglich in P1-Rezeptoren für Adenosin (AdoRA) und P2-Rezeptoren für ATP und ADP unterteilt. Die P2-Rezeptorfamilie gliedert sich weiter in die G-Protein gekoppelten P2Y-Rezeptoren und die ionotropen P2X-Rezeptoren auf. Derzeit sind 7 Subtypen der P2X- und 8 Subtypen der P2Y-Familie bekannt^{8;42-47}. Die weit verbreiteten P2X-Rezeptoren sind am besten im Nervensystem untersucht und spielen eine wichtige Rolle

bei der Schmerzverarbeitung, aber auch bei der Modulation der Neurotransmitterfreisetzung^{45;48-50}. Der Rezeptor P2X₇ findet sich auf Immunzellen und moduliert die Freisetzung verschiedener Cytokine⁵¹.

Jeder P2Y-Rezeptor bindet ein heterotrimeres G-Protein. Üblicherweise handelt es sich dabei um G_{q/11}. Der Rezeptor P2Y₁₁ kann zusätzlich G_s-gekoppelt sein. Der Rezeptor P2Y₁₂ ist hingegen G_i-gekoppelt. Viele Zellen exprimieren gleichzeitig mehrere P2Y-Rezeptor-Subtypen, wobei einige dieser Rezeptoren von Nukleotid-Diphosphaten oder Nukleotid-Triphosphaten und einige von Di- und Triphosphaten aktiviert werden können. Durch P2Y-Rezeptoraktivierung kommt es entweder zur Aktivierung der Phospholipase C und zur Freisetzung intrazellulären Calciums oder über G_s- und G_i-gekoppelte Rezeptoren zur Änderung des cAMP-Spiegels^{4;42;52;53}.

Das Ausmaß und die Dauer der ADP und ATP vermittelten Signaltransduktion sind von der Aktivität verschiedener Ecto-Enzyme abhängig. Ein schneller Abbau der Nukleotide zu Nukleosiden führt statt zur Aktivierung der P2-Rezeptoren zur Aktivierung der P1-Rezeptoren, so dass andere Signaltransduktionskaskaden ablaufen^{32;33;54}. Abbildung 1 fasst die extrazellulären ATP- und Adenosin-Quellen und die Aktivierung der Adenosin- und der P2-Rezeptoren zusammen.

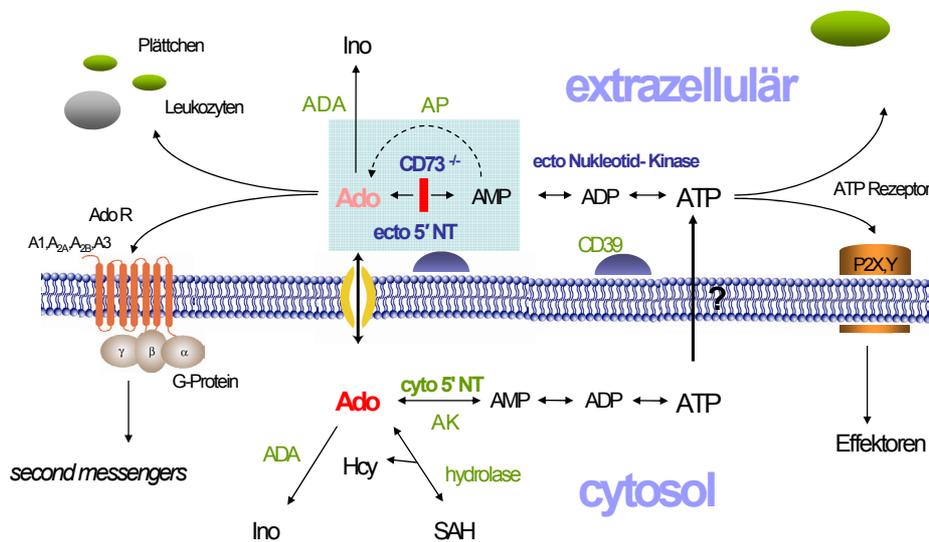


Abb. 1: Schematische Darstellung des Adenosinstoffwechsels.

Sowohl intrazellulär, als auch extrazellulär wird Adenosin gebildet. Extrazelluläres Adenosin kann über Transporter in die Zelle aufgenommen werden, kann über extrazelluläre Kinasen rephosphoryliert werden oder kann Adenosinrezeptoren aktivieren. Die Aktivität verschiedener Ecto-Enzyme entscheidet über den Nukleosid- und Nukleotidspiegel und somit über die Aktivierung von P1- oder P2-Rezeptoren.

1.2 CD73 - ein Kontrollpunkt in der extrazellulären Adenosinbildung

Zu den Nukleotid-abbauenden Ectoenzymen gehören Ectonukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen (E-NTPDase), Ectonukleotid-Pyrophosphatasen / Phosphodiesterasen (E-NPP), alkalische Phosphatasen (ALP) und Ecto-5'-Nukleotidase (5'NT, CD73)⁵⁵. Die NTPDase1 (CD39, Ecto-Apyrase, Ecto-ATP-Diphosphohydrolase) hydrolysiert im gleichen Maße ATP und ADP, wohingegen die NTPDase2 (CD391) bevorzugt ATP hydrolysiert⁵⁶. AMP wird von Alkalischen Phosphatasen (ALP) und einer Spleißvariante von NPP2 zu Adenosin hydrolysiert, vorrangig jedoch von CD73⁵⁵. Dieses Enzym katalysiert mit der extrazellulären AMP-Hydrolyse zu Adenosin den letzten Schritt im kaskadenförmigen ATP-Abbau. Um die Auswirkungen dieses CD73 vermittelten extrazellulären AMP-Abbaus (vgl. Abb.1) zu untersuchen, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine CD73 defiziente Mausmutante generiert⁵⁷.

Es handelt sich bei CD73 um ein 70 kDa großes, glycosyliertes, Glycosylphosphatidylinositol- (GPI) geankertes Membranprotein. Unabhängig von seinem Wert als Ecto-Nukleotidase dient dieses Protein als Co-Rezeptor in der T-Zellaktivierung und als Zelladhäsionsmolekül⁵⁸⁻⁶⁰. Unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen wird CD73 von verschiedenen Zelltypen exprimiert^{58;59;61;62}. In humanen Geweben wurde CD73 sowohl auf verschiedenen Endothel- und Epithelsubpopulationen, als auch auf 15 % der peripheren Blutlymphozyten nachgewiesen⁶¹. Auf den meisten B-Zellen (70%) und CD8⁺-T-Zellen (51%), aber auch auf einer CD4⁺-Subpopulation (11%) wird das Gen exprimiert⁶³. Das Molekül unterliegt einem *Turnover*, d.h. es kommt zu einem ständigen Austausch zwischen Zelloberfläche und cytoplasmatischen Membranen⁶⁴. Eine „*gshedde*“, bzw. lösliche Form des Enzyms ist bekannt^{54;65}.

Unter physiologischen Bedingungen wird Adenosin sowohl intra-, als auch extrazellulär gebildet. Intrazelluläre 5'-Nukleotidasen dephosphorylieren AMP, aber auch durch die Hydrolyse von S-Adenosyl-Homocystein wird Adenosin freigesetzt⁶⁶. Intrazellulär gebildetes Adenosin wird über spezifische bidirektionale Transporter in den extrazellulären Raum befördert. Es werden äquibrative (ENT1-4) und konzentrative (CNT1-3) Nukleosid-Transportertypen unterschieden⁶⁷⁻⁷¹. Beim äquibrativen Transport ist die Richtung vom Nukleosidkonzentrationsgradienten über der Zellmembran abhängig, wohingegen konzentrative Transporter auch entgegen des Konzentrationsgefälles Nukleoside transportieren können⁷²⁻⁷⁴. Bei extrazellulärem Adenosinüberschuss wird Adenosin über die Transporter in die Zelle transportiert und von Adenosinkinase phosphoryliert⁷⁵, oder von der

Adenosindeaminase zu Inosin abgebaut ^{76;77}. Wie bereits oben beschrieben, kann extrazelluläres Adenosin auch zu ADP und ATP phosphoryliert werden.

Die meisten der von extrazellulär vorhandenem Adenosin hervorgerufenen Effekte beruhen auf der Aktivierung von den früher als P1-Purinrezeptoren bezeichneten Adenosinrezeptoren, die ubiquitär exprimiert werden. Derzeit werden vier Adenosinrezeptor-Subtypen unterschieden: AdoRA1, AdoRA2a, AdoRA2b und AdoRA3. Adenosin ist der Hauptagonist und Namensgeber dieser Rezeptorklasse, wobei z.B. der A3-Rezeptor auch von Inosin aktiviert werden kann ⁷⁸. Adenosinrezeptoren sind, wie alle G-Protein gekoppelten Rezeptoren integrale Membranproteine. Initial wurden A1- und A2- Rezeptoren aufgrund ihrer inhibitorischen, bzw. stimulierenden Wirkung auf die Adenylylzyklase unterschieden ⁷⁹. Sowohl der A1- Rezeptor, als auch der später beschriebene A3- Rezeptor sind in der Regel G_i-gekoppelt, wohingegen der A2a- und der A2b- Rezeptor G_s-gekoppelt sind ^{80;81}. Adenosinrezeptoren können auch an weitere G Proteine gekoppelt sein. So ist z.B. bekannt, dass der A2a- Rezeptor im Striatum überwiegend an G_{olf} gekoppelt ist ⁸². A2b- und A3- Rezeptoren können auch an G_q gekoppelt sein ^{52;83-85}. Die Aktivierung der A1-, bzw. A3- Rezeptoren führt neben der Hemmung der Adenylylzyklase auch zur Aktivierung verschiedener K⁺-Kanäle über die β- und γ-Untereinheiten von G_i, zur Inaktivierung von Ca²⁺-Kanälen und zur Aktivierung der Phospholipase C. Die Aktivierung von A2a- und A2b- Rezeptoren stimuliert die Adenylylzyklase und hebt somit den cAMP-Spiegel an. Des Weiteren kommt es zur Mobilisierung intrazellulären Calciums ^{56;86}. Murine KO-Modelle für alle vier Adenosinrezeptorsubtypen stehen inzwischen zur Verfügung ⁸⁷⁻⁹⁰.

Oft hat Adenosin eine zu ADP und ATP entgegengesetzte Wirkung. Diese Nukleotide fördern die Plättchenaktivierung und Aggregation, wohingegen Adenosin diese Prozesse hemmt ³⁴. Adenosin hemmt die Proliferation der glatten Muskelzellen ⁹¹⁻⁹³, stimuliert die IL-1β induzierte Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase ⁹⁴ und hemmt die Leukozytenadhäsion ⁹⁵. Darüber hinaus ist Adenosin entscheidend an der Aufrechterhaltung der endothelialen Barrierefunktion beteiligt. Diese antiinflammatorischen Effekte gehen überwiegend auf die Aktivierung der Adenosin A2-Rezeptoren zurück. Dem Signalmolekül Adenosin kommt auch eine wichtige homeostatische Funktion im Herz-Kreislaufsystem zu ^{96;97}. Dazu zählen die metabolische Flussregulation und Katecholamin-antagonistische Effekte, ischämische Präkonditionierung ⁹⁸, Angiogenese ⁹⁹, sowie die antithrombogene Wirkung ¹⁰⁰. Adenosin akkumuliert während Ischämie oder Hypoxie. Es wird vermehrt gebildet, wenn es im Herzen z.B. aufgrund ungenügender Sauerstoffversorgung zum Ungleichgewicht zwischen ATP-Bildung und ATP-Verbrauch kommt. Am gut oxygenierten Herzen bilden AMP und Adenosin einen

Stoffwechselkreislauf, dessen hohe Umsatzrate die cytosolische Adenosinkonzentration eng an die AMP-Konzentration koppelt. Bei Hypoxie steigt die Adenosin-Bildung proportional zur AMP-Konzentration, wobei gleichzeitig die Rephosphorylierung von Adenosin durch die Adenosin-Kinase gehemmt wird. Die Hypoxie-induzierte Hemmung der Adenosin-Kinase ist entscheidend für die geringe AMP-Zunahme und gleichzeitig erhebliche Steigerung der Adenosin-Konzentration^{101;102}.

Adenosin vermittelte Effekte gehen auf die Aktivierung der bereits beschriebenen Adenosinrezeptoren zurück. Der spezifische Beitrag der Aktivierung einzelner Adenosinrezeptorsubtypen wird seit längerer Zeit am Tiermodell erforscht. Wie bereits erwähnt, stehen für alle 4 Rezeptortypen defiziente Mausmodelle zur Verfügung⁸⁷⁻⁹⁰.

Weiterhin wurden in einigen Studien gezielt einzelne Rezeptoren überexprimiert und spezifische Agonisten und Antagonisten eingesetzt¹⁰³⁻¹¹⁴. Diese Versuche belegen zwar die Bedeutung der Adenosinrezeptoraktivierung, klären aber nicht die Herkunft des Adenosins als endogenen Liganden. Für die Aktivierung der einzelnen Rezeptoren ist die lokale Adenosinkonzentration entscheidend. Bei der Regulation der Adenosinkonzentration spielen Nukleosidtransporter eine große Rolle, indem sie Adenosin sowohl in die Zelle, als auch aus der Zelle hinaustransportieren können, gegebenenfalls sogar entgegengesetzt zum Konzentrationsgefälle. Darüber hinaus sind, wie im oben beschriebenen Beispiel, Enzyme beteiligt, die Adenosin rephosphorylieren, Adenosin abbauen oder aber Adenosin aus AMP erzeugen. In der vorliegenden Arbeit gilt das Hauptinteresse der Rolle der CD73 im extrazellulären Adenosinstoffwechsel. Es sollte geklärt werden, in welchem Ausmaß auf diesem Stoffwechselweg Adenosin produziert wird, und inwieweit dieses Adenosin zur Aktivierung von P1-Rezeptoren beiträgt. Insbesondere sollte der Beitrag des CD73 vermittelten AMP-Abbaus in Entzündungsprozessen untersucht werden.

1.3 Basale Prozesse im Entzündungsgeschehen – Modulation durch Adenosin

Eine Entzündungsreaktion beginnt, vereinfacht schematisch dargestellt in Abbildung 2, mit der Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen im Endothel, so dass es zur Rekrutierung von Entzündungszellen kommt. In den Weibel-Pallade-Körperchen gebildetes E-Selektin wird z.B. nach Kontakt mit Histamin oder dem vom Komplement ausgeschütteten Entzündungsvermittler C5 α an die Zelloberfläche geschleust. Nach Ausschüttung von TNF- α oder Lipopolysacchariden erfolgt verzögert die P-Selektin-Expression. Vor allem die Rekrutierung von Neutrophilen ist E- und P-Selektin abhängig¹¹⁵⁻¹¹⁹. Durch die Interaktion

von Glykoproteinen auf Leukozyten mit endothelialen Selektinen kommt es zur reversiblen Anheftung am Endothel. Im nächsten Schritt interagieren Leukozytenintegrine wie Mac1 oder LFA1 mit Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1. Durch Cytokine wird die Adhäsionskapazität erhöht und die Rollbewegung endet. Nach Interaktion von Mac1 und LFA1 mit PECAM und der Freisetzung proteolytischer Enzyme verlassen die Zellen das Blutgefäß und durchstoßen die extrazelluläre Matrix¹²⁰⁻¹²². Die anschließende Wanderung durch das Gewebe wird von Cytokinen und Chemokinen gesteuert, die an Proteoglykane der extrazellulären Matrix binden¹²³⁻¹²⁶.

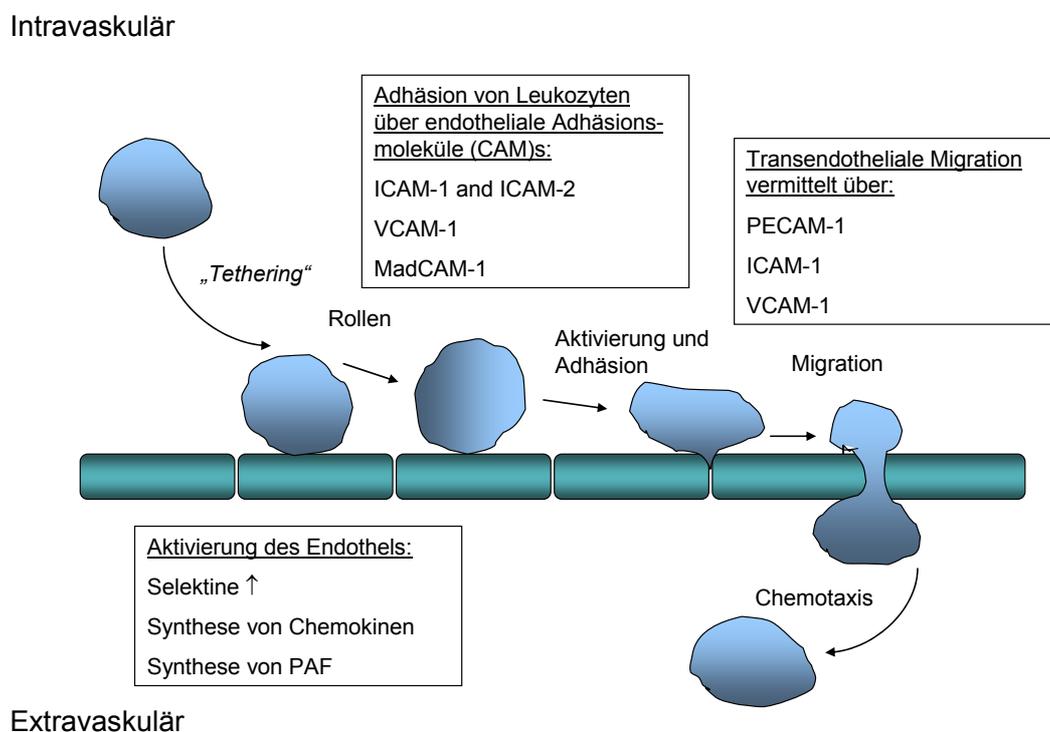


Abb.2: Schematische Darstellung einer Entzündungsreaktion modifiziert nach *Cines et al; Blood,1998*¹²⁴. Nach Rekrutierung von Entzündungszellen zum aktivierten Endothel kommt es zunächst zur reversiblen Selektin-vermittelten Anheftung und zur Rollbewegung. Adhäsion und Migration werden über Adhäsionsmoleküle vermittelt. Die Bewegung der Zellen wird von Chemokinen gesteuert.

Die wichtigsten Entzündungsmodulatoren sowohl bei akuten, als auch bei chronischen Entzündungen sind Cytokine. Es handelt sich dabei um Faktoren wie Interleukine, TNF α , Prostaglandine, NO, Leukotrine und Chemokine, die von Entzündungszellen freigesetzt werden. Chemokine (chemotaktische Cytokine) sind kleine sekretierte heparinbindende Proteine, die die Migration zirkulierender Leukozyten in entzündliche Bereiche veranlassen.

Man unterscheidet drei Chemokin-Hauptgruppen. Die größte Gruppe wird als CC-Chemokinfamilie bezeichnet, wobei diese Bezeichnung auf die ersten beiden von vier konservierten Cystein-Resten Bezug nimmt. Analog dazu unterscheidet man noch die CXC- und die CX3C-Chemokinfamilie, wobei letztgenannte nur einen bekannten Vertreter aufweist, Fraktalkin^{127;128}. Das bislang am besten charakterisierte CC-Chemokin ist *Monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1). Es aktiviert den Rezeptor CCR2 und trägt auch den Namen CCL2. Dieses Molekül spielt eine Schlüsselrolle bei der Monozytenrekrutierung zu arteriosklerotischen Läsionen, ebenso bei der Entwicklung von intimaler Hyperplasie nach Verletzungen und bei Vaskulogenese und Thrombusformation¹²⁷⁻¹³². Alle Chemokine binden an sieben- transmembrandomän G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Welcher Leukozyt auf welches Chemokin reagiert, hängt von der jeweiligen Ausstattung an Chemokinrezeptoren ab. Durch die Bindung des Chemokins an seinen spezifischen Rezeptor wird eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst, die die Phosphatidylinositol 3-(PI 3) Kinase aktiviert. Es kommt zum Anstieg von Inositoltriphosphat und intrazellulärem Calcium, sowie zur Aktivierung von Rho und der Mitogen aktivierten Protein Kinase (MAPK). Vermutlich kommt es so zum Re-Arrangement von Aktin und somit zu Formveränderungen und zur Bewegung von Entzündungszellen^{127;128;131;133}.

Zahlreiche Studien belegen die entscheidende Rolle des Adenosins und der Adenosinrezeptoren als Entzündungsmodulator¹³⁴⁻¹³⁶. Es ist bekannt, dass bei inflammatorischen Gewebeschäden z.B. unter Hypoxie oder nach Ischämie/Reperfusion vermehrt extrazellulär Adenosin gebildet und akkumuliert wird^{109;110;137;138}. Adenosin kann die Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine unterbinden, inhibiert die Plättchenaktivierung und Plättchenaggregation, induziert die Erythropoietinproduktion und moduliert die Lymphozytenfunktion¹³⁹⁻¹⁴². Einige Arbeiten liefern Hinweise darauf, dass auch CD73 an der Regulation von Entzündungsreaktionen beteiligt ist¹⁴³⁻¹⁴⁷. Es wurde gezeigt, dass es bei einer akuten Entzündung zur Aktivitäts- und Expressionssteigerung von CD73 kommt¹⁴⁸.

1.4 Arteriosklerose – eine chronisch- inflammatorische Erkrankung

Arteriosklerose, wörtlich übersetzt „Verhärtung der Arterien“ ist eine von zahlreichen Faktoren bedingte chronische Arterienerkrankung. Unter dem oft synonym gebrauchten Begriff Atherosklerose versteht man die Bildung herdförmiger Veränderungen (Plaques) in der *Intima* und *Media* des Gefäßes. In den westlichen Industrienationen sterben die meisten Menschen an den Folgen von Arteriosklerose. Dazu zählen z.B. Herzinfarkt, Thrombose, Niereninsuffizienz und Schlaganfall. Als Risikofaktoren, die die Krankheit begünstigen, gelten Hyperlipidämie,

Hypercholesterinämie, Hypertonie, Diabetes mellitus, aber auch Lebensgewohnheiten. Rauchen, Stress und fettreiche Ernährung begünstigen die Krankheitsentwicklung¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

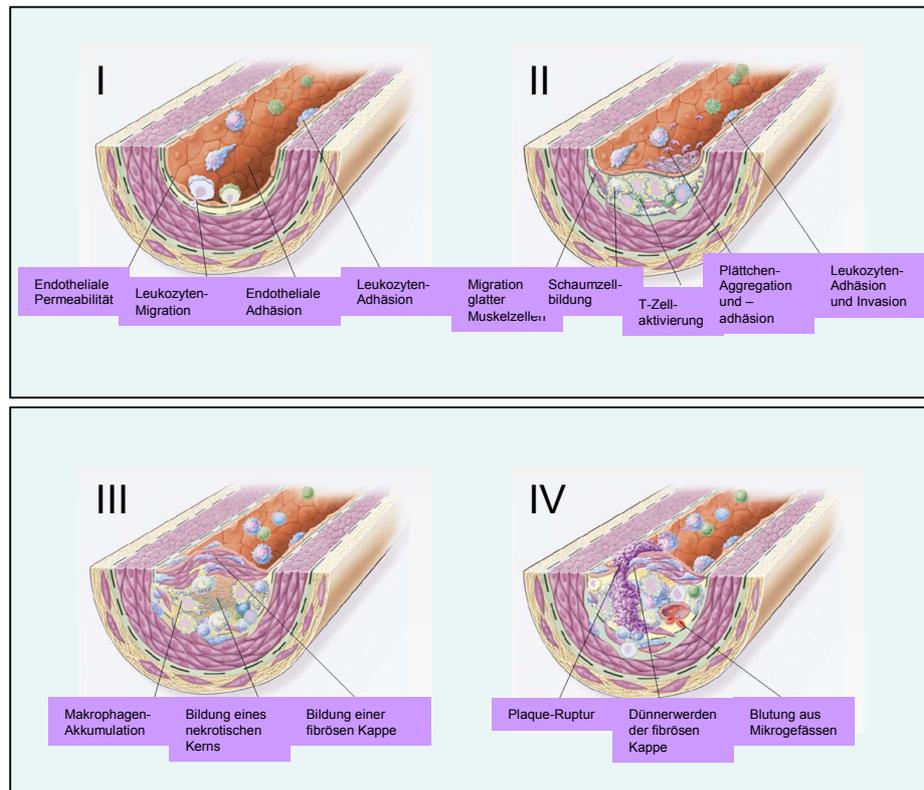


Abb3.: Schematische Darstellung der Arterioskleroseentwicklung nach Ross; *N Engl J Med*; 1999¹⁵².

Der Arterioskleroseentwicklung gehen endotheliale Veränderungen, wie die Zunahme der Permeabilität voraus. Infolge endothelialer Dysfunktion kommt es zur Leukozytenadhäsion und Migration (I). Anschließend kommt es durch Einlagerung lipidhaltiger Monozyten und Makrophagen zur Bildung fettiger Streifen („fatty streaks“). Es kommt zur Schaumzellbildung, T-Zellaktivierung und Migration glatter Muskelzellen (II). Im nächsten Schritt treten Nekrosen innerhalb der arteriosklerotischen Plaques auf. Eine fibröse Kappe wird gebildet (III), welche im weiteren Verlauf dünner wird und schließlich aufbrechen kann (Plaqueruptur). Diese instabilen Plaques treten im letzten Arteriosklerosestadium auf (IV).

Bereits 1973 formulierte Russell Ross die „response to injury hypothesis“¹⁵³, die nicht nur mechanische verletzungsbedingte Endothelschäden, sondern allgemein endotheliale Dysfunktion als Hauptursache der Arterioskleroseentstehung sieht¹⁵². Die komplexen Zusammenhänge der Arterioskleroseentstehung und -progression sind gekennzeichnet durch die Beteiligung von Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Gefäßwand, sowie von zirkulierenden Zellen wie Thrombozyten, Monozyten und T-Zellen. Neben Lipoproteinen,

Fetten und Wachstumsfaktoren spielen, wie oben beschrieben, Cytokine und Chemokine als chemotaktische Faktoren eine besondere Rolle. Mittlerweile wird in der oxidativen Modifizierung von LDL die Hauptursache für die Einleitung der arteriosklerotischen Prozesse gesehen („*lipoprotein induced atherosclerosis hypothesis*“). Die Aktivierung des Endothels wird durch die Phospholipidfreisetzung in der *Intima* initiiert. Bevorzugt an Stellen mit erhöhtem *Shear*-Stress wie z.B. an Gefäßverzweigungen werden von Endothelzellen verstärkt Adhäsionsmoleküle und andere proinflammatorische Gene exprimiert¹⁵⁴. Zirkulierende Plättchen sind die ersten Blutbestandteile am aktivierten Endothel¹⁵⁵, wobei die Plättchen-Endothelinteraktionen als vorübergehendes *Tethering & Rolling* charakterisiert werden¹⁵⁶. Allerdings werden adhärenz mit Monozyten assoziierte aktivierte Plättchen beschrieben¹⁵⁷. Als Antwort auf Hypercholesterolämie wird typischerweise VCAM-1 heraufreguliert, woraufhin Monozyten und Lymphozyten adhären. Die anhaftenden Zellen werden von Chemokinen, die in der *Intima* freigesetzt werden zur Migration durch *gap junctions* in den subendothelialen Raum angeregt, so dass arteriosklerotische Läsionen und im weiteren Verlauf Plaques gebildet werden. Ein wichtiger von Cytokinen wie MCSF gesteuerter Schritt ist dabei, dass eingewanderte Monozyten zu Makrophagen differenzieren. Dabei kommt es zur Heraufregulation von *Scavenger*- und *Toll like*- Rezeptoren, so dass apoptotische Zellfragmente und oxidierte LDL Partikel aufgenommen und zerstört werden. Auf diese Art und Weise entstehen die charakteristischen Schaumzellen¹⁵⁸. In arteriosklerotischen Läsionen sind darüber hinaus T-Zell-Infiltrate lokalisiert. Überwiegend handelt es sich dabei um CD4-positive T-Zellen, die Antigene erkennen, welche von MHC-Klasse II-Molekülen präsentiert werden. Auch natürliche Killer-T- (NK-T)- Zellen und CD8- positive Zellen, die MHC- Klasse I Antigene erkennen, sind vertreten^{159;160}.

Die überwiegende Anzahl der oben beschriebenen Erkenntnisse wurden am Tiermodell gewonnen. Zunächst wurden Schweine und Kaninchen verwendet, die spontan unter Gabe fettreicher Diät arteriosklerotische Plaques entwickeln^{161;162}. Mäuse sind mit Ausnahme des Laborstamms C57Bl/6 stark resistent gegen Arteriosklerose. Eine 1960 von Wissler entwickelte Spezialdiät führte in Labormäusen des Stamms C57Bl/6 zur Arterioskleroseentwicklung, war aber toxisch und somit nicht für langfristige Studien geeignet. Die von Paigen durchgeführten Modifikationen dieser Diät¹⁶³ erwiesen sich ebenfalls als unphysiologisch und führten lediglich zur Bildung kleinerer Läsionen („*fatty streaks*“), die sich nicht entsprechend des humanen Krankheitsverlaufes weiterentwickeln¹⁶⁴. Die Maus erwies sich daher nicht als geeigneter Modellorganismus zur Arterioskleroseforschung. Ein Grund dafür ist das murine Lipidprofil. Im Gegensatz zum Menschen, wo 75% des Plasmacholesterins

als LDL vorliegen, macht bei Mäusen das HDL den Großteil des Cholesterins aus, welches im Menschen als antiatherogen gilt. Außerdem fehlt Mäusen das Cholesterylester-Transferprotein, das den Transfer von Cholesterolester von HDL zu VLDL und LDL durchführt¹⁶⁴. Erst die Möglichkeit der gezielten Genmanipulation durch homologe Rekombination in murinen embryonalen Stammzellen machte die Maus zum geeigneten Modellorganismus¹⁶⁵. Mit dem sogenannten *Gene Targeting* können in der Maus Gene inaktiviert werden (*Knock-out*), Gene ausgetauscht (*Knock-in*) oder punktmutiert werden (*Gain of function mutation*). Der Knockout eines antiatherogenen Genprodukts, das in den Cholesterinstoffwechsel eingreift, machte die Maus als Arteriosklerosemodell zugänglich. Von zwei unabhängigen Gruppen wurden 1992 Apolipoprotein E- (ApoE) defiziente Mäuse erzeugt^{166;167}. Es handelt sich dabei um die einzige Mausmutante, die bereits unter Gabe normaler Diät arteriosklerotische Läsionen zeigt¹⁶⁸, die sich analog zur humanen Arteriosklerose weiterentwickeln.

ApoE ist ein 34 kDa großes Glykoprotein, das überwiegend in der Leber, im Hirn, aber auch von Makrophagen synthetisiert wird. Es handelt sich mit Ausnahme des LDL um einen strukturellen Bestandteil aller Lipoproteinpartikel. ApoE dient als Ligand für den ApoB-, den ApoA- und den Chylomicronrest-Rezeptor, so dass die Aufnahme ApoE-haltiger Partikel in die Leber gewährleistet ist¹⁶⁸. Somit spielt ApoE eine zentrale Rolle im Plasmalipoprotein-Metabolismus und bei der Cholesterinhomeostase. Die antiatherogene Wirkung geht überwiegend auf diese Effekte zurück. Einige Daten liefern Hinweise darauf, dass ApoE auch antiatherogene Eigenschaften aufweist, die von der Plasmalipoproteinregulation unabhängig sind^{169;170}. Beispielsweise kann ApoE die Lymphozytenproliferation und die Proliferation von antigen und mitogen stimulierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen indirekt inhibieren¹⁷¹, kann aber auch akute Typ I Entzündungsantworten modulieren¹⁷².

Neben ApoE-defizienten Mäusen wurden inzwischen weitere arteriosklerotische Mausmodelle etabliert. Die 1993 von Ishibashi *et al.*¹⁷³ generierte LDL-Rezeptor-KO-Maus dient als Modell für familiäre Hypercholesterolämie, bildet aber nur nach Gabe fettreicher Diät arteriosklerotische Plaques aus. Die ApoE^{-/-}/LDLR^{-/-}-Doppelmutante hingegen entwickelt gegenüber ApoE^{-/-}-Mäusen auch unter normaler Diät vermehrt Arteriosklerose^{174;175}. Seither wurden zahlreiche ApoE-Doppelmutanten erzeugt, um den Einfluss bestimmter Gene auf die Arterioskleroseentwicklung zu untersuchen.

1.5 Zielsetzung

Zur gezielten Untersuchung des CD73-vermittelten AMP-Abbaus zu Adenosin wurde in unserer Arbeitsgruppe eine CD73-defiziente Mausmutante generiert⁵⁷. Gewisse Teilaspekte der Phänotypisierung sind Gegenstand dieser Arbeit. Darüber hinaus wurde basierend auf der CD73^{-/-}-Mutante von mir eine ApoE/CD73-Doppel-KO-Maus gezüchtet, um die Auswirkungen der CD73-Defizienz im chronischen Entzündungsverlauf zu untersuchen. Die Charakterisierung dieser Doppelmutante war ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

Im speziellen wurden folgende Fragen gestellt:

Wird die im CD73-KO verminderte AMPase-Aktivität durch verstärkte Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) kompensiert?

Können Statine in der Maus die Aktivität der CD73 verändern und lassen sich damit pleiotrope Effekte erklären?

Zeigt die CD73 KO-Mutante Veränderungen im Blutbild wie z.B. eine veränderte Anzahl an Blutplättchen oder eine erhöhte Leukozytenanzahl?

Unterscheidet sich der Plättchen-cAMP-Spiegel der CD73 KO-Mutante von dem des WT?

Gibt es Veränderungen in der Thromboregulation und zeigt die CD73-KO-Mutante einen proinflammatorischen Phänotyp?

Ändert sich im CD73-KO-Herzen die Fähigkeit, auf Adenosinabgabe mit Vasodilatation zu antworten und wie sieht die Antwort auf AMP-Gabe aus, wenn es nicht mehr im selben Maße wie beim WT zu Adenosin abgebaut wird?

Gibt es in bestimmten Organen des CD73-KO kompensatorische Veränderungen in der Expression der Adenosinrezeptoren?

Gibt es Expressionsveränderungen im Endothel?

Wie wirkt sich der Verlust der CD73 auf den Verlauf einer chronisch-entzündlichen Erkrankung aus?

Wie unterscheidet sich die ApoE-KO-Mutante von der ApoE/CD73-KO-Doppelmutante in Hinblick auf Plaquegröße und -zusammensetzung und gibt es Unterschiede in der Progression der Arteriosklerose?

Ist das von der CD73 generierte Adenosin an der Modulation der Arterioskleroseentwicklung beteiligt?

2 Material

2.1 Antikörper und Seren

2.1.1 Primärantikörper

Rat anti mouse CD73 monoklonal; Klon Ty/23 [#550738; BD Pharmingen, Heidelberg]

Rat anti mouse CD54 (ICAM-1) monoklonal; Klon KAT-1 [#CBL 1316; Chemicon]

Rat anti mouse CD31 (PECAM-1) monoklonal; Klon MEC13.3 [#50274; BD Pharmingen, Heidelberg]

Rat anti mouse CD105 (Endoglin) monoklonal; Klon MJ7/18 [#550546; BD Pharmingen, Heidelberg]

Rat anti mouse CD102 (ICAM-2) monoklonal; Klon 3C4 (mIC2/4) [#550544; BD Pharmingen, Heidelberg]

Rat anti mouse CD106 (VCAM-1) monoklonal; Klon 429 [#550547; BD Pharmingen, Heidelberg]

Rat anti mouse CD4 monoklonal; Klon GK1.5 [#553726; BD Pharmingen, Heidelberg]

Rat anti mouse CD11b (Integrin alpha M; MAC-1) monoklonal; Klon M1/70 [#T-2102; Dianova]

Rat anti mouse CD62E (E-Selektin) monoklonal; Klon 96403 [#MAB575; R&D Systems]

Rabbit anti human CD62P (P-Selektin) polyklonal [#553716; BD Pharmingen, Heidelberg]

Rabbit anti human Actin smooth muscle specific polyklonal [#SP6341P; Acris,]

Rabbit anti mouse CD3 polyklonal

Polyklonaler anti Kollagen Neoepitop Antikörper (COL 2 3/4C) [Arbeitsgruppe J.Fischer, Institut für Pharmakologie der Universität Düsseldorf]

2.1.2 Sekundärantikörper

Goat anti rat Rhodamine Red TM-X konjugiert (#Jackson Immunoresearch)

Goat anti rat Fluorescein (FITC) konjugiert (#Jackson Immunoresearch)

Goat anti rabbit Fluorescein (FITC) konjugiert (#Jackson Immunoresearch)

2.1.3 Seren

Normal goat serum (Linaris)

2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien (Reinheitsgrad p.A.) wurden von den Firmen Sigma/Aldrich/Fluka (Seeze/Steinheim/Unterhaching), Merck (Darmstadt), Calbiochem (Schwallbach), ROCHE (Grenzach-Wyhlen), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Hoechst (Frankfurt am Main), Linde (Höllriegelskreuth) bezogen.

Die Herkunft spezieller Chemikalien wird im Methodenteil ausgewiesen.

2.3 EDV, Software/Internet-Programme

Hardware: PC

Software: Microsoft Word, Excel; PowerPoint; Primer-Express; Origin 7.0; Photoshop 7.0; AnalySIS B (Olympus); Zeiss Image Browser; Scion Soft Image; Quantity One (BioRad)

Internet

PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Alignment by t. Downss: <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

Expasy: <http://www.expasy.ch/sprot>

2.4 Enzyme

Proteinase K [Sigma]

DNase [Qiagen]

RNase [Qiagen]

Taq-Polymerase [Qiagen]; Platinum-Taq-Polymerase [Invitrogen]

Reverse Transkriptase Superscript II [Invitrogen]

Restriktionsendonukleasen [Fermentas; Invitrogen]

2.5 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammer	BioRad
Energieversorgungsgeräte	Pharmacia
Geldokumentierstation	BioRad
Kryotom	Leica CM 1850
Kühlschränke	AEG
Langendorff-Anlage	Werkstatt der Physiologie Universität Düsseldorf

Magnetrührer	IKA Labortechnik
Mikrowelle	AEG
PCR-Maschine	Eppendorf
pH-Meter	Knick
Pipetten	Eppendorf
Plate Reader	Packard BioScience
Beta-Counter	Wallac
Real time PCR Maschine	Applied Biosystems
Schüttler	EB, Hechingen
Schüttelwasserbad	EB, Hechingen
Thermomixer	Eppendorf
Photometer	Perkin Elmer
Mikroskope:	
Licht- und Fluoreszenzmikroskop	Olympus
Konfokalmikroskop	Zeiss
Stereomikroskop	Olympus
Kameras	Nikon, Olympus
Sterile Werkbank	Heraeus
Zentrifugen	Eppendorf
	Heraeus
	Beckmann
Ultra Turrax	IKA
Waagen	Santorius

2.6 Häufig benutzte Lösungen und Puffer

dH₂O_{DEPC}	Aqua bidest mit 0,1% Diethylpyrocarbonat; 2fach autoklaviert
PBS	237 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,2
PBST	PBS; 0,01% Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl; pH 8,0; 1 mM EDTA
TAE-Puffer	0,04 M Tris-Acetat (4,8 g Tris; 1,1 ml Essigsäure); 0,001 M EDTA; 0,5 µg Ethidiumbromid/ml
TB	10 mM Tris/HCl pH 7,6
Phosphatpuffer Stocklösung 0,2 M ; pH 7.4	28,5 g Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O in 800 ml Aqua bidest. 8,3 g Na H ₂ PO ₄ *H ₂ O in 300 ml Aqua bidest. Beide Lösungen zusammengegeben und auf pH 7.4 titriert

2.7 Kommerzielle Kits

Isolierung von Nukleinsäuren:

RNeasy, RNeasy fibrous tissue; RNeasy micro; QIAshredder; DNeasy [QIAGEN]

Durchführung von real-time PCRs:

SybrGreen Core Reagent [Applied Biosystems]

Proteingehaltsbestimmung:

BCA-Assay [Pierce]

Cytokin- und Chemokinbestimmung im Plasma:

ELISA-Kits: mouse TNF-alpha; mouse MCP-1; mouse IL-1 beta; mouse IL-10; mouse IL-6
[Endogen]

2.8 Radioaktiv markierte Substanzen

$8\text{-}^{14}\text{C}$ markiertes Adenosin 5'-monophosphat, Diammonium-Salz [Moravek Biochemicals]

^3H cAMP, ^3H cGMP [No. MT 616 und No. MT 517; Hartmann]

2.9 Molekulargewichtstandards

1kb Leiter [Fermentas]

500 bp Leiter [Fermentas]

2.10 Synthetische Primer

OligodT-Primer [# Invitrogen]

Alle sequenzspezifischen Primer wurden von den Firmen MWG, Invitrogen und Metabion bezogen.

2.11 Verbrauchsmaterialien

6-(12-,24,-)Loch-Platten Für Zellkultur	Greiner
96-Loch-PCR-Platten	Eppendorf
96-Loch-real time PCR-Platten	Applied Biosystems
DC-Platten	Macherey & Nagel
Einweg-Küvetten	Brand
Gewebekulturschalen 10 cm, 15 cm	Greiner
Minutiennadeln	FST
Objektträger und Deckgläser	Marienfeld
Pipettenspitzen 10 μl , 20 μl , 200 μl ; 1000 μl	Biozym
Plastikpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner
Plastikröhrchen 10 ml	Greiner
Plastikröhrchen 15 ml, 50 ml	Falcon
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Spritzen, Kanülen	Braun
Sterilfilter Millex-HA 0,2 μm ; 0,4 μm	Millipore
Sterilfilterflaschen	Nunc
Whatman Filter	Schleicher & Schüll

3 Methoden

3.1 Erzeugung der Mausmutanten

Zur Generierung CD73 defizienter Mäuse wurden in unserem Institut die grundlegenden Arbeiten von Frau P. Koszalka durchgeführt.

Auf die einzelnen Klonierungsschritte zur Erzeugung des *Targeting*-Vektors soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden. Im resultierenden *Targeting*-Konstrukt werden das Exon II der CD73 und das Neomycinresistenzgen (NeoR) von *loxP*-Elementen flankiert. Dieser Bereich wiederum wird von 10 kb und 4 kb-Fragmenten der CD73 umgeben, um anschließend eine homologe Rekombination zu ermöglichen. Zusätzlich wurde distal das Thymidinkinase-Gen eingefügt. Der mit dem Restriktionsenzym *SwaI* linearisierte Vektor wurde durch Elektroporation in embryonale Mausstammzellen der Linie R1 aus dem Mausstamm SV129 eingebracht. G418- und Gancyclovir-resistente Klone wurden auf korrekte homologe Rekombination hin überprüft (PCR und Southern blot-Analyse). Positive Klone wurden mit dem Plasmid pDSRed1-*Cre* transient transformiert, so dass es in diesen Zellen zur Aktivierung des *Cre-loxP*-Systems kam. Anschließend konnte in 60 % der Klone das mutierte CD73-Allel nachgewiesen werden. Auch Klone mit *lox-P*-flankierten Exon II konnten detektiert werden. Zur Erzeugung von konstitutiven CD73-KO Tieren wurden verschiedene Klone mit deletierten Exon II und zur Erzeugung von konditionalen CD73-KO-Tieren wurden Klone mit flankiertem Exon II in Blastozysten aus NMRI-Spendertieren injiziert. Die Blastozysten wurden in pseudopregnante NMRI-Weibchen eingepflanzt. Auf diese Art und Weise konnten chimäre Mäuse erzeugt werden, die wiederum mit NMRI-Mäusen verpaart wurden. Bei erfolgreicher Keimbahntransformation gingen aus diesen Verpaarungen heterozygote CD73^{-/-}-Mutanten hervor⁵⁷.

3.2 Haltung und Zucht der Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden in der Tierversuchsanlage Düsseldorf gehalten. Die Tiere erhielten normale Diät (Sniff, Deutschland) und Wasser ad libitum.

3.2.1 Zucht und Rückkreuzung von CD73^{-/-}-Mäusen

Zunächst wurden die oben beschriebenen heterozygoten CD73^{-/-}-Mutanten untereinander verpaart. Die daraus hervorgegangenen homozygoten Knockout- bzw. Wildtyp-Mäuse wurden als Versuchstiere verwendet. Da diese Population einen genetischen Mischhintergrund aus NMRI und SV129 aufweist, wurden Rückkreuzungen durchgeführt. Dazu wurden heterozygote CD73-KO-Mutanten mit Wildtypmäusen der Stämme NMRI, bzw. C57/Bl6 gekreuzt. Deren

Aufreinigung wurde die mit Isopropanol gefällte DNA mit 70%igen Ethanol gewaschen, in 500 µl TE-Puffer resuspendiert und zur PCR-Analyse eingesetzt.

Alternativ wurde zur Gewinnung genomischer DNA DNeasy (Qiagen) nach Herstellerangaben benutzt.

3.3.2 PCR zur Genotypisierung

Die *Polymerase Chain Reaktion* (PCR) ist eine Standardmethode zur Amplifikation und zum Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte.

Zur Genotypisierung wurden Primerpaare gewählt, die für Wildtyp- und Knockout-Allel unterschiedliche Produkte liefern. Oft werden dazu Kombinationen von drei Primern benutzt. In diesem Fall bindet der *forward*-Primer vor dem deletierten Bereich, ein *reverse*-Primer im deletierten Bereich und der zweite *reverse*-Primer hinter dem deletierten Bereich. Sind beide Allele vorhanden, besteht jedoch die Gefahr, dass ein Produkt bevorzugt gebildet wird. So kann ein heterozygotes Tier fälschlich als homozygot charakterisiert werden. Das Problem kann durch zwei getrennte PCRs umgangen werden. Dabei werden Wildtyp- und Knockout-Allel unabhängig voneinander nachgewiesen.

PCR-Ansatz

Genomische DNA	2-5 µl
dNTPs (2,5 mM)	5 µl
10xPuffer	5 µl
<i>Forward</i> Primer	2,5 µl
<i>Reverse</i> Primer	2,5 µl
dH ₂ O	X µl
<i>Taq</i> -Polymerase	2 µl
Total-Volumen	50 µl

Programm:

5 min 94 °C (Denaturierung);

40 Zyklen: 45`` 94 °C (Denaturierung) 30`` 55-58 °C (Primerannealing), 45-60`` 72 °C (Elongation); 5 min 72 °C

Die zu wählende Annealingtemperatur hängt vom Schmelzpunkt der verwendeten Primer ab.

Die Elongationszeit hängt von der verwendeten *Taq*-Polymerase und der zu erwartenden Produktgröße ab.

Genotypisierungsprimer

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Produkt
CD73	CD73_for1	CD73_rev1	720 bp
knock-out Allel	5` ttcgggctgctcaaaataag 3`	5` cctcagtgtgagtcctca 3`	
CD73	CD73_for2	CD73_rev2	716 bp
knock-out Allel	5`cgggctgctcaaaataagag 3`	5` tgtaaccccgataagcttgg 3`	
CD73	CD73_for3	CD73_rev3	382 bp
wildtyp Allel	5`cccctttggaggtaaggaga 3`	5`aggaaaggggttccttga 3`	
CD73	CD73_for4	CD73_rev4	353 bp
wildtyp Allel	5` acggtgtggaaggactgatt 3`	5` cgatgcccttcagaggataa 3`	
CD73	CD73_for7	CD73_rev7	240 bp
conditional „gefloxed“	5` agagatgtccttgctattgc 3`	5` tggaagtctccaactaaaa 3`	(WT) 280 bp (KO)
ApoE	ApoE_for1	ApoE_rev1	155 bp
knock-out – und wildtyp Allel	5` gcctagccgaggagagaag 3`	5` tgtgactgggagctctgcagc 3`	(WT) ApoE_rev2 245 bp (KO) 5` gccgccccgactgcatct 3`
ApoE	ApoE_for3	ApoE_rev3	557
knock-out – und wildtyp Allel	5` ctctacacaggatgcctagc 3`	5` atagtgctcctcatcagtc 3`	(WT) 1300 bp (KO)

3.3.2.1 CD73-Genotypisierung

Die Primerpaare CD73_for1- CD73_rev1 und/oder CD73_for2- CD73_rev2 wurden benutzt, um das “KO-Allel” nachzuweisen. Das zu erwartende Produkt von ca. 700 bp tritt nicht im reinen Wildtyp auf.

Die Primerpaare CD73_for3- CD73_rev3 und/oder CD73_for4- CD73_rev4 wurden benutzt, um das “WT-Allel” nachzuweisen. Das zu erwartende Produkt von ca. 350, bzw.380 bp tritt nicht im reinen Knockout auf.

Im Heterozygoten erhält man sowohl mit PCR 1.1/2.2, als auch mit PCR 3.3/4.4 ein Produkt.

Das von *loxP*-Elementen flankierte CD73- Allel wurde mit der Primerkombination CD73_for7 und CD73_rev7 nachgewiesen.

3.3.2.2 ApoE-Genotypisierung

Die Kombination der Primer ApoE_for1, ApoE_rev1 und ApoE_rev2 ermöglicht die Genotypisierung in einem Schritt. Das Wildtypallel wird mit einem 155 bp großen Produkt nachgewiesen, das Knock-out Allel mit einem 245 bp Produkt. Alternativ können die Primer ApoE_for3 und ApoE_rev3 benutzt werden. Der *Forward-Primer* ApoE_for3 liegt vor dem deletierten Bereich, der Primer ApoE_rev3 liegt dahinter. Da die ApoE-KO Maus durch Insertion des Neomycinresistenzgens (Neo) erzeugt wurde, entsteht ein 1300 bp Produkt, wenn Neo vorhanden ist und ein 557 bp Produkt, wenn es sich um das Wildtypallel handelt.

3.4 Enzymaktivitätsassays

3.4.1 AMPase-Aktivität in Membranproteinextrakten

(Messung von freiem Phosphat nach Lanzetta¹⁷⁶)

Homogenisationspuffer	10 mM Hepes; 150 mM NaCl; 1 mM EGTA; 0,1mM MgCl ₂ ; pH 7,4
ConA-Puffer	20 mM Tris/HCl; pH 7,4; 110mM NaCl; 1 mM MgCl ₂ ; 1mM CaCl ₂ 1 mM MnCl ₂
Solubilisierungspuffer	ConA-Puffer; 2% SB14 (N-Tetradecyl-N,N-dimethyl-ammonio-3-propanesulfonate) (Sigma)
Laufpuffer	ConA-Puffer; 0,1% Triton X-100; Proteinaseinhibitor-Mix (Roche)
Elutionsmittel	500 mM Methyl- α -D-mannopyranosid (Sigma)

3.4.1.1 Äquilibrierung der ConA-Sepharose

Die ConA-Sepharose (Sigma) wurde resuspendiert und in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt (1ml/Röhrchen). Die Röhrchen wurden mit Laufpuffer aufgefüllt, geschüttelt und 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Insgesamt wurde diese Prozedur viermal wiederholt.

3.4.1.2 Gewinnung von Membranproteinfaktionen aus murinem Frischgewebe

Frisch entnommenes Gewebe wurde in Homogenisationspuffer (0,1 mg / 1 ml) aufgenommen und 1 min mit dem Ultra-Turrax bei 13500 rpm homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat 10 min bei 300 g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wiederum wurde bei 4 °C 1 h bei 100000 g zentrifugiert.

Nach diesem Schritt wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei -20 °C eingefroren.

Im zweiten Teil der Präparation wurde das gefrorene Pellet in 5 ml Solubilisierungspuffer resuspendiert. Dies geschah durch Ultraschallbehandlung (Sonifier) oder im Potter. Die resultierende Suspension wurde 30 min bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend bei 4 °C 45 min bei 30000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde 1 h bei 20 °C mit äquilibrierter ConA-Sepharose inkubiert. Es schlossen sich 4 Waschschrte mit Laufpuffer an.

Zur Elution wurde 500 mM Methyl- α -D-mannopyranosid (Sigma) benutzt. Nachdem das Elutionsmittel bei 4 °C 30 min mit der ConA-Sepharose reagierte, wurde 2 min bei 600 g zentrifugiert und der gewonnene Überstand wurde bei -20 °C eingefroren. Ein Aliquot wurde zur Proteinbestimmung (BCA-Assay; Pierce) eingesetzt.

3.4.1.3 Phosphatbestimmung

Lanzetta-Stammlösung I	0,045 % Malachitgrün in Aqua bidest.
Lanzetta-Stammlösung II	4,2% Ammoniummolybdat in 4N HCl
Lanzetta-Stammlösung III	1 % Triton X-100 in Aqua bidest.
Lanzetta-Gebrauchslösung	3 Teile Lanzetta-Stammlösung I und 1 Teil Lanzetta-Stammlösung II werden 1 h gerührt. Pro 50 ml wird 1 ml Lanzetta-Stammlösung III zugegeben. Die fertige Lösung wird 2mal filtriert und lichtgeschützt aufbewahrt.
Proteinaseinhibitor-Mix	1 Tablette Complete Mini (Roche) gelöst in 1 ml Aqua bidest.
Citratlösung	34% Natriumcitrat (w/v)

Mit K_2HPO_4 wurde eine Eichreihe von 0,1-1 nmol Phosphat hergestellt.

Für jeden Reaktionsansatz wurden 100 μ l Standard aus der Eichreihe oder 100 μ l Probe mit 800 μ l frisch hergestellter Lanzetta-Gebrauchslösung versetzt. Nach 1-15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l Citrat-Lösung gestoppt.

Nach 30 min wurde die Extinktion bei 645 nm photometrisch gemessen.

3.4.2 Bestimmung der AMPase- und CD73-Aktivität im Plasma (DC mit radioaktiv markiertem Substrat ⁶⁵)

Reaktionsansatz:

Gesamtvolumen	60 µl
Plasma	10 µl
AMP-Endkonzentration	300 µmol/l
Counts	3*10 ⁵ dpm

AMP-Stocklösung für 300 µmol AMP-Endkonzentration im Versuchsansatz

Spezifische Aktivität des ¹⁴C-markierten AMP:

50 mCi/mmol; 0,1 mCi/ml ($\approx 2,22 \cdot 10^8$ dpm/ml)

1. Radioaktiver Anteil
2,7 nmol (1,35 µl) ¹⁴C-markiertes AMP pro Reaktionsansatz
2. Nicht-radioaktiver Anteil
15,3 nmol (4,65 µl) AMP in RPMI-Medium pro Reaktionsansatz

Um neben der Gesamt-AMPase Aktivität der Plasmaprobe auch die CD73-Aktivität zu bestimmen, wurde von jeder Probe zusätzlich ein Reaktionsansatz mit 5 mM Levamisol, einem spezifischen Inhibitor der Alkalischen Phosphatase versetzt.

Die Reaktion fand 1 h bei 37°C statt.

Aliquots des Reaktionsansatzes (je 20 µl) und ein standardisiertes Gemisch aus Nukleotiden und Nucleosiden wurden auf DC-Platten aufgetragen (Aulgram SIL G/UV₂₅₄; Macherey/Nagel). Die dünnschichtchromatographische Trennung erfolgte in einer Glas-DC-Kammer. Zur Trennung von Nucleosiden wurde Isobutanol/Ethylacetat/Methanol/Ammoniak (7:4:3:4) als Laufmittel benutzt. Zur Trennung von Nucleotiden wurde Isobutanol/Isoamylalkohol/2-ethoxyethanol/Ammoniak/H₂O (9:6:18:9:15) eingesetzt.

Nach erfolgter Trennung wurden die Spots unter UV-Licht sichtbar gemacht und markiert. Anschließend wurden die Spots isoliert und in Szintillationspuffer (Perkin Elmer Ultima Flo M) aufgelöst. Die Quantifizierung der markierten Substrate und ihrer Derivate erfolgte durch Szintillationszählung. Aus der abgebauten AMP-Menge, bzw. aus der Menge der gebildeten Abbauprodukte wurde die Enzymaktivität errechnet.

3.4.3 AMPase-Aktivitätsmessung an kultivierten Zellen, frischen Blutgefäßen und Langendorff-Effluaten (HPLC)

3.4.3.1 Versuchsansätze zur Enzymaktivitätsbestimmung an Zellen und Blutgefäßen

Frisch präparierte Aorten wurden in PBS überführt und von Fett und Bindegewebe befreit. Danach wurde das Gefäß mit einer Federschere longitudinal eröffnet und mit dem Endothel nach oben in mit Agarose ausgegossenen *Chamber-slides* fixiert. Zum Fixieren wurden Minutiennadeln benutzt. Das Präparat wurde mit PBS gewaschen. Danach wurde das PBS gegen 37 °C warmes RPMI-Medium ausgetauscht. Danach wurde eine definierte Menge 1,*N*⁶-etheno-AMP (eAMP) in RPMI-Medium zugegeben und das Präparat bei 37 °C inkubiert.

Auch kultivierte Zellen wurden mit einer definierten Menge eAMP im Kulturmedium inkubiert. Nach definierter Inkubationszeit (5; 7,5; 10 min) wurden die Überstände sofort bei -20 °C eingefroren und später mit HPLC (vgl.3.4.3.3) analysiert.

Um den Einfluss bestimmter Substanzen auf die Enzymaktivitäten zu untersuchen, wurden Zellen oder Aortenpräparate mit diesen Substanzen inkubiert.

3.4.3.2 Langendorff-Perfusion isolierter Herzen

Krebs-Henseleit-Puffer	10 mM Glukose; 100 µU Insulin; 116 mM NaCl; 4,63 mM KCl; 1,1 mM MgSO ₄ ; 1,18 mM KH ₂ PO ₄ ; 24,9 mM NaHCO ₃ ; 2,52 mM CaCl ₂ ; 0,5 mM EDTA+Na
------------------------	--

Das Versuchstier wurde mit 250 IE Heparin antikoaguliert und durch i.p. Injektion von Urethan (1,5 g/kg) narkotisiert. Das Herz wurde entnommen, direkt in eisgekühlten Krebs-Henseleit-Puffer überführt und von Lungen- und Fettgewebe befreit. Die Aorta wurde freipräpariert und kanüliert. Zur Perfusion wurde modifizierter Krebs- Henseleit-Puffer benutzt, der mit Carbogen oxygeniert (95 % O₂, 5 % CO₂) und auf 37° C temperiert wurde.

Der Perfusionsdruck wurde über eine Wassersäule bei 100 mmHg konstant gehalten. Der Koronarfluss wurde mittels einer *Transonic 1N*- Flußsonde gemessen. Effluata wurden aufgefangen und analysiert.

Zur Quantifizierung der AMP-Hydrolyse wurde 1,*N*⁶-etheno-AMP (eAMP) in einer Endkonzentration von 50 µmol/l infundiert. Die Effluata wurden mit HPLC untersucht.

An isoliert perfundierten Herzen wurden darüber hinaus funktionelle Analysen durchgeführt. Zur Erstellung einer Adenosin-Dosis-Wirkungskurve wurde Adenosin in verschiedenen Konzentrationen (1-200 µmol/l) intrakoronar appliziert. Analog dazu wurden 5 nM bis 2 µmol/l AMP gegeben, um eine AMP-Dosis-Wirkungskurve zu erstellen. Bei konstantem Fluss wurden Druckänderungen verfolgt.

3.4.3.3 HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) zur Messung von Nukleotiden und Nukleosiden

Zur simultanen Darstellung von Nukleosiden und Nukleotiden wurde an der HPLC-Anlage (Waters) eine Xterra MS C8 Säule 5 µm; 4,6 x 50 mm (Waters 186000483) benutzt.

HPLC-Puffer A (Laufmittel)	5 mM TBAS in 30 mM KH ₂ PO ₄ -Puffer; pH 5,8
HPLC-Puffer B (Elutionsmittel)	Puffer A mit 33,3% Acetonitril

An der Anlage wurde folgendes Flussprofil eingestellt:

min	ml/min	Puffer A [%]	Puffer B [%]
0	0,7	90	10
15	0,7	70	30
17	0,7	90	10
37	0,7	90	10

Zur Darstellung der Proben wurde ein Fluoreszenz-Detektor [UV/VIS:254 nm] eingesetzt mit einer Excitationswellenlänge von 410 nm und einer Emissionswellenlänge von 280 nm.

Die Nukleoside und Nukleotide wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Retentionszeiten getrennt und durch Coelution mit bekannten Standards identifiziert und mit Hilfe von Standardeichgeraden quantifiziert.

3.5 Blutbild

In heparinisiertem Vollblut wurden folgende Parameter bestimmt:

Anzahl der Weißen Blutzellen (gesamt), Anzahl der Neutrophilen Granulozyten, Anzahl der Lymphozyten, Monozyten, Eosinophilen und Basophilen,

Anzahl der roten Blutzellen, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RWB, Anzahl der Plättchen, PDW, MPV, P-LCR und Anzahl der Retikulozyten.

Die Messungen wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums durchgeführt.

3.6 Messung von cAMP und cGMP in plättchenreichem Plasma (PRP)

3.6.1 Vorbereitung der Plasmaproben

Frisch aus der *Vena cava* entnommenes Citratblut wurde mit dem unspezifischen Phosphodiesterase Inhibitor Isobutylmethylxanthine (IBMX) 0,5 mmol/l resuspendiert. Durch Zentrifugation (10 min, 290 g) wurde aus dem Vollblut plättchenreiches Plasma (PRP) gewonnen. Nach Bestimmung der Plättchenkonzentration wurden 300 µl PRP mit HClO₄ (Endkonzentration 5 %) versetzt. Danach wurden 5 % des Gesamtvolumens HCl (1 N) zugegeben. Um die Probe zu neutralisieren, wurde 1 ml Probe 250 µl eisgekühlte K₂CO₃-Lösung (2 M) zugegeben. Um eine vollständige Neutralisation zu gewährleisten, wurden die Proben mindestens 2 h bei 4 °C gehalten und anschließend unter Kühlung bei 5500 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden noch einmal mehrere Stunden gekühlt und gegebenenfalls erneut zentrifugiert, um Protein- und Kaliumcarbonatrückstände vollständig zu entfernen.

3.6.2 Radioimmun-Assay (RIA)

Tris-HCl-Puffer	50 mM Tris/HCl; pH 7,5 [+ 12 mM EDTA]
Markiertes Antigen	³ H cAMP bzw. ³ H cGMP wird mit Tris-HCl-Puffer + EDTA auf eine Endkonzentration von 2 ng/ml verdünnt.
Leerwertlösung	200 nM cAMP bzw. cGMP in Tris-HCl-Puffer

Antiserum	100 mg lyophilisiertes Antiserum werden in 900 µl Aqua bidest. gelöst. Diese Stammlösung wird auf eine Endkonzentration von 1:100 (cAMP) bzw. von 1:500 (cGMP) verdünnt.
Ammoniumsulfatlösung	58,5 g Ammoniumsulfat werden in 150 ml Aqua bidest. gelöst.

Zur Bestimmung der cAMP- bzw. cGMP-Konzentration im Plasma wurden folgende Reaktionen angesetzt:

Gesamtradioaktivität (Absolutwert)	50 µl Plasma 100 µl Tris-HCl-Puffer 50 µl markiertes Antigen
Leerwert (Background)	100 µl Leerwertlösung 50 µl markiertes Antigen 50 µl Antiserum-Verdünnung
Nullwert (100%-Wert; Max.Bindung)	100 µl Tris-HCl-Puffer 50 µl markiertes Antigen 50 µl Antiserum-Verdünnung
Verschiedene Standardkonzentrationen	100 µl Standard-Lösung 50 µl markiertes Antigen 50 µl Antiserum-Verdünnung
Unbekannte zu messende Proben	100 µl unbekannte Probe (Plasma oder Plasma verdünnt in Tris-HCl-Puffer) 50 µl markiertes Antigen 50 µl Antiserum-Verdünnung

Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur Trennung des gebundenen vom freien Antigen wurden alle Proben mit 1 ml eiskalter Ammoniumsulfatlösung versetzt, 1 min geschüttelt, 10 min im Eisbad gekühlt und 3 min bei 12000 rpm abzentrifugiert. Durch Messung des Überstandes bestimmt man die Radioaktivität des freien Antigens. Dazu wurden 1 ml Überstand mit Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus [Roth]) versetzt und im Counter gemessen.

Zur Bestimmung der Radioaktivität des Antigen-Antikörperkomplexes wurde die Radioaktivität im Pellet gemessen. Der Überstand wurde dazu bis auf 50 µl abgesaugt, das Pellet wurde mit 1 ml eiskalter Ammoniumsulfatlösung versetzt, 1 min geschüttelt, 10 min im Eisbad gekühlt und 3 min bei 12000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt. Danach wurden 1,1 ml Aqua bidest. zugegeben und die Proben wurden bis zur vollständigen Auflösung des Pellets geschüttelt.

Von der erhaltenen Lösung wurde 1 ml abgenommen, mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Counter gemessen.

3.6.2.1 Berechnung der Probenkonzentration

Berechnung der maximalen Bindung

Jeweils 1 ml Gesamtradioaktivität-, Leerwert- und Nullwertprobe wurden mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und gemessen.

$$\frac{\text{Nullwert-Leerwert}}{\text{Gesamtradioaktivität}} = Q$$

Der Quotient Q sollte zwischen 0,3 und 0,45 liegen.

Ist der Quotient größer, muss das Antiserum stärker, ist er kleiner, muss das Antiserum weniger verdünnt werden.

Berechnung der Geradensteigung

$$\frac{\text{Nullwert-Leerwert}}{\text{Standard-Leerwert-1}} = F$$

pM Standardkonzentration

Berechnung der Probenkonzentration

Nullwert-Leerwert

$$\frac{\text{Messwert-Leerwert-1}}{F} = \text{pM/Probe}$$

3.7 Differenzielle Genexpressionsanalysen

3.7.1 Semiquantitative RT-*real time* PCR

Die *real-time* RT-PCR ermöglicht es im Gegensatz zur Standard PCR, die eine Endpunktbestimmung darstellt, die PCR Reaktion zu allen Zeitpunkten zu verfolgen.

Zunächst wurde mRNA revers transkribiert. Die mRNA diente dabei der reversen Transkriptase (RT) als Matrize zur Erzeugung einzelsträngiger cDNA (copy-DNA). Zum gezielten Umschreiben der mRNA wurden Oligo-(dT)-Primer verwendet, die komplementär zu dem 3'PolyA-Ende der mRNA sind. Die erhaltene cDNA wurde für Genexpressionsanalysen mittels PCR eingesetzt.

Für die semiquantitative Expressionsanalyse wurde die Expression des untersuchten Gens bezogen auf die Expression eines konstitutiv exprimierten Haushaltsgens ermittelt. Die relative Expression des Gens in den verschiedenen Proben wurde verglichen.

3.7.1.1 Gewinnung der RNA

Zur Isolierung der RNA aus Herz, Leber, Niere, Lunge und Gehirn wurden generell kommerzielle Kits gemäß Herstellerangaben benutzt (RNeasy micro, RNeasy fibrous tissue; QIAGEN). Zur Gewinnung von RNA aus Gefäßen, bzw. aus frischen Endothelzellen wurden die Protokolle wie im Folgenden beschrieben, abgewandelt. Zur Überprüfung der RNA-Qualität und Quantität wurden Aliquots im Bioanalyser untersucht.

RNA-Gewinnung aus Aorten

Aus der getöteten Maus wurde die Aorta entnommen, in eisgekühltes PBS überführt und sauber freipräpariert. Das Präparat wurde in *RNAlater* (Qiagen) überführt und zu einem späteren Zeitpunkt aufgearbeitet.

Das konservierte Gefäß wurde dazu in eine Petrischale überführt, mit einem Skalpell zerkleinert und in 300 µl RLT-Puffer (Qiagen) aufgenommen. Die Gewebestücke wurden mit

dem Puffer in einen Glashomogenisator überführt und weiter zerkleinert. Das erhaltene Homogenat wurde 10 min bei 55°C mit ProteinaseK inkubiert und den Herstellerangaben entsprechend weiter mit dem RNeasy-Micro-Kit (Qiagen) aufgearbeitet.

RNA-Gewinnung aus frischen Aortenendothelzellen („*En Face*“-Präparat)

Die entnommene und sauber frei präparierte Aorta wurde longitudinal eröffnet und mit dem Endothel auf einen sauberen Objektträger gelegt. Mit einem zweiten Objektträger wurde das Präparat kurz angedrückt. Anschließend wurde der Objektträger mit dem Präparat 5-7 s auf einen mit Trockeneis gekühlten Kupferblock gelegt, um anzufrieren. Nachdem das Gewebe wieder leicht angetaut war, wurde vorsichtig das Präparat entfernt.

Auf der Oberfläche des Objektträgers befinden sich nun die Endothelzellen.

Diese wurden in 300 µl RLT-Buffer (Qiagen) aufgenommen. Die anschließende RNA-Präparation erfolgte mit dem RNeasy-Micro kit (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben.

3.7.1.2 Reverse Transkription

In einen RT-Ansatz wurden 2 bis zu maximal 5 µg total-RNA gegeben. Nach Zugabe von 1 µl OligodT-Primern (500 µg/ml; Invitrogen) und 1 µl dNTPs (10 mM; Invitrogen) wurde der Ansatz (Gesamtvolumen 12 µl) 5 min bei 65 °C inkubiert.

Auf Eis wurden folgende Komponenten zugegeben: 4 µl *5x First strand buffer*; 2 µl DTT (0,1 M); 1 µl RNase-Inhibitor (Invitrogen). Nach 2minütiger Inkubation bei 42 °C wurde 1 µl Reverse Transkriptase (SuperScriptII; Invitrogen) in den Ansatz pipettiert. Es schloss sich eine 50minütige Inkubation bei 42 °C und eine 15minütige Inkubation bei 70 °C an.

3.7.1.3 Real time PCR

PCR-Ansatz

cDNA (2-5 ng)	X µl
dNTPs (2,5 mM)	2,5 µl
Mg ₂ Cl (10 mM)	3 µl
10 x SYBR-GreenPuffer	2,5 µl
<i>Forward</i> Primer	1 µl
<i>Reverse</i> Primer	1µl
dH ₂ O	X µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,2 µl
Total-Volumen	25 µl

Programm:

10 min 95 °C (Denaturierung und Aktivierung der Polymerase); 40 Zyklen: 30`` 95 °C (Denaturierung), 30`` 60 °C (Primerannealing), 30`` 72 °C (Elongation); 5 min 72 °C

Primer:

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Produkt
AdoRA1	AdoRA1_for 5` gatcggtagctccg agtcaa 3`	AdoRA1_rev 5` ttgctatccaggctt gttc 3`	167 bp
AdoRA2a	AdoRA2a_for 5` gtctcacgcagagttccat 3`	AdoRA2a_rev 5` aatgacagcaccagcaaat 3`	138 bp
AdoRA2b	AdoRA2b_for 5` tgctcacacagagctccate 3`	AdoRA2b_rev 5` gtgtcccagtgaccaaacct 3`	102 bp
AdoRA3	AdoRA3_for 5` atggctattcttgggccttt 3`	AdoRA3_rev 5` atccaaactgaccac ggaac 3`	145 bp
β-Aktin	betaAktin_for 5` aatcctgtggcatccatgaaac 3`	betaAktin_rev 5` atagaggtctttacggatgtaa 3`	74 bp

3.8 Zellkultur

3.8.1 Kultivierung muriner Stammzellen

Der Erzeugung der konditionalen und konstitutiven CD73^{-/-}-Mutante ging die genetische Manipulation muriner Stammzellen voraus. Embryonale Stammzellen der Linie R1 (Ursprung: (129x1/SvJx129/Sv) F1- Kitl⁺) wurden auf embryonalen Fibroblasten kultiviert. Die Fibroblasten dienten als „Feederzellen“.

<i>Feederzell-Medium</i> (FC-Medium)	DMEM + Glukose+Glutamin (Gibco) mit 10 % FCS, 200 mM L-Glutamin (Gibco), 10 mM nicht essentiellen Aminosäuren (Gibco), 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin
<i>Stammzellmedium</i> (ES-Medium)	DMEM + Glukose+Glutamin (Gibco) mit 15 % FCS, 100 mM Natriumpyruvat (Gibco), 10 ⁻² mM β-Mercaptoethanol, 200 mM L-Glutamin (Gibco), 10 mM nicht essentiellen Aminosäuren (Gibco), 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	FCS wird bei -20 °C gelagert. Langsam aufgetautes FCS wird 45 min bei 56 °C hitzeinaktiviert und steril filtriert, bevor es in der Zellkultur eingesetzt wird.

3.8.1.1 Anlegen einer primären embryonalen Fibroblastenkultur (Feederzell-Kultur)

Trächtige Mäuse (d 15-17) einer neomycinresistenten Linie wurden getötet. Die Föten wurden unter sterilen Bedingungen entnommen. Zunächst wurden mit einer Schere die Köpfe und die inneren Organe entfernt. Das verbleibende Gewebe wurde mit PBS gewaschen, um Blutreste zu entfernen. Mit feinen Scheren wurde das Gewebe in einem geringen Volumen PBS weiter zu Gewebefrei zerkleinert und dann durch ein Sieb (1 mm Maschenbreite) in einen sterilen Erlenmeyerkolben (500 ml) überführt. Nach Zugabe steriler Glasperlen (Ø 3 mm) und 50 ml 0,05 % Trypsin/EDTA (Sigma) wurde die Zellsuspension 30 min unter Schütteln bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach 30 min wurden weitere 50 ml 0,05 % Trypsin / EDTA zugesetzt. Es folgten weitere 30 min Inkubation. Anschließend wurde die entstandene

Zellsuspension von den Glasperlen abgegossen und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit PBS gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro Kulturschale (\varnothing 15 cm) kultiviert. Nach 24 h wurde das EF-Medium gewechselt. Waren die Zellen konfluent, wurden sie passagiert, bzw. bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

3.3.1.2 Murine Stammzellkultur (ES-Zellkultur)

Für die Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen müssen konfluente Feederzellen zur Verfügung stehen. Dazu wurden embryonale Fibroblasten (s.o.) kultiviert. Damit die ES-Zellkultur nicht von Fibroblasten überwachsen werden kann, muss die Proliferation der Feederzellen mit Mitomycin C unterbunden werden. Dazu wurde Mitomycin C-Lösung ($5\text{ }\mu\text{g} / \text{ml}$ EF-Medium) auf die Zellen gegeben. Nach 2 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde das EF-Medium gewechselt. Vor dem Einbringen von ES-Zellen in die Kultur sollte das EF-Medium durch ES-Medium ersetzt werden. Sobald ES-Zellen kultiviert werden, muss dem ES-Medium $1\text{ }\mu\text{l} / \text{ml}$ des *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) (Stock: $10^6\text{ U} / \text{ml}$ (X)) zugesetzt werden, um die Differenzierung der Stammzellen zu unterbinden. Das Medium muss täglich erneuert werden, wobei stets LIF frisch zuzusetzen ist.

3.8.2 Kultivierung von *Human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC)

Nabel-Medium	12,27 g NaCl, 0,45 g KCl, 2,97 g Glukose, 4,02 g HEPES, aqua dest. ad 1,5 l
HBSS	0,4 g KCl, 0,06 g KH ₂ PO ₄ , 8,0 g NaCl, 0,35 g NaHCO ₃ , 0,048 g Na ₂ HPO ₄ aqua bidest. ad 800 ml; autoklavieren; 1 g D-Glukose aqua bidest. ad 200 ml; autoklavieren und zu der anderen Lösung dazu geben
Kollagenase-Lösung	Kollagenase Typ CLS II, 219 U/ml (Biochrom) 0,1 % in HBSS
Medium 199 P/S/A	M 199 (Gibco 31153-026), 5 ml Penicillin-Streptomycin (Invitrogen 15140-122), 1,5 ml Amphotericin (Sigma A2942)
Endothelzell-Medium	Endothelzellmedium und Supplement (PromoCell C22210+C39210), 5 ml Penicillin-Streptomycin, 1,5 ml Amphotericin

Nabelschnüre wurden bis zur Gewinnung der Zellen in Nabelmedium in sterilen Flaschen bei 4 °C aufbewahrt. Zur Isolierung von Endothelzellen wurde die Vene mit einer Knopfkanüle intubiert, mit Nahtmaterial fixiert und zweimal mit HBSS durchgespült. Dann wurde das untere Ende der Nabelschnur mit einer Kocherklemme verschlossen. Die Vene wurde mit Kollagenase-Lösung prall gefüllt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Zum Ausspülen der Nabelschnur wurden 10 ml Medium 199 P/S/A mit 20 % FCS und anschließend 20 ml Medium 199 P/S/A benutzt. Diese Zellsuspension wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Medium 199 P/S/A mit 20 % FCS aufgenommen und gründlich resuspendiert. Dieses Gemisch wurde in mit 1 % Gelatine beschichtete Kulturflaschen überführt. Zum Adsorbieren wurden die Zellen 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 199 P/S/A mit 20 % FCS gewaschen. Weiter kultiviert wurden die Zellen in Endothelzellmedium.

3.8.4 Murine Aortenendothelzellkultur modifiziert nach Kobayashi ¹⁷⁸

Bei dieser Methode werden Endothelzellen aus Mauseorten nach einer enzymatischen Behandlung ausgespült. Gleichzeitig können glatte Muskelzellen gewonnen werden.

Kollagenase Typ II-Lösung	2 mg /ml Kollagenase Typ II (Sigma) in DMEM
<i>Mouse EC-Medium</i> (Medium G)	DMEM mit 20 % FCS, 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 2 mM L-Glutamin, 1x nicht essentielle Aminosäuren; 1x Natriumpyruvat; 25 mM HEPES (pH 7,0-7,6); 100 µg/ml Heparin; 100 µg/ml Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS; Sigma)

Anlegen der Primärkultur

Wie unter 3.8.3.1 beschrieben, wurden am Vortag Kulturschalen vorbereitet.

Bis zu 6 frisch entnommene Aorten wurden in PBS + 1000 U/ml Heparin überführt und von Fett und Bindegewebe befreit. Anschließend wurden die Aorten mit kurzen 24-gauge Kanülen unter mikroskopischer Kontrolle kanüliert und in einer Halterung mit einer Miniaturgefäßklemme oder alternativ mit einer Ligatur befestigt. Abbildung 4 zeigt die in der Feinmechanik-Werkstatt des Physiologischen Instituts der Heinrich Heine Universität angefertigte Vorrichtung. Umgeben von einer Plexiglaskammer mit doppeltem, luftdurchlässigem Boden befindet sich eine Vorrichtung, um kanülierte Gefäße aufzuhängen. Auf die fixierten Kanülen können befüllte 1ml-Spritzen aufgesetzt werden. Unter den kanülierten Gefäßen wird eine Zellkulturschale (ø10 cm) eingesetzt, um Effluat aufzusammeln.



Abb.4: Vorrichtung zur Isolierung muriner Aortenendothelzellen gebaut in der Feinmechanischen Werkstatt der Physiologie der HHU-Düsseldorf.

1: Feuchte Kammer, 2: Feuchtigkeitsreservoir , 3: Auffangschale für Zellen und Waschlösungen, 4: Halterung für Kanülen, 5: Spritzen zum Befüllen und Spülen der Blutgefäße, 6: Kanülen zur Befestigung der Aorten.

Nach dem Befestigen wurden die Aorten mit serumfreien DMEM gespült. Danach wurden die Spritzen mit DMEM gegen mit Kollagenase-Typ II Lösung gefüllte Spritzen ausgetauscht. Die Gefäße wurden mit dieser Lösung befüllt und dann mit Gefäßklemmen verschlossen. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden die Aorten mit 5 ml DMEM + 20 % FCS ausgespült. Die Inkubation erfolgte innerhalb der Plexigaskammer im Brutschrank. Der Boden der Kammer wurde mit sterilem Wasser gefüllt, so dass sich die Vorrichtung in einer feuchten Kammer befindet und die Präparate nicht antrocknen können. Die Inkubation mit Kollagenase Typ II und das anschließende Ausspülen von Zellen wurde zweimal für je 15 min wiederholt. Die ausgespülten Zellen wurden in der untergestellten Kulturschale gesammelt und von da in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml DMEM + 20 % FCS aufgenommen und nach vorsichtigem Resuspendieren wurden die Zellen in Kollagen beschichtete Kulturschalen überführt. Nach 2 h bei 37 °C wurde das

Medium entfernt und die Zellen wurden mit warmem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in Medium G kultiviert. Konfluente Zellen wurden mit Trypsin behandelt und passagiert.

3.9 Bestimmung der Blutungszeit ¹⁷⁹

Dem betäubten Tier wurden 0,5 cm der Schwanzspitze abgeschnitten. Der Schwanz wurde sofort in 37 °C warme physiologische Kochsalzlösung getaucht. Die Zeit bis zum Stoppen der Blutung wurde gemessen.

3.10 Quantifizierung arteriosklerotischer Plaques

Frisch entnommene Aorten wurden in PBS überführt. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden Bindegewebe und Fettreste vorsichtig entfernt. Anschließend wurden die Präparate Öl Rot gefärbt (Vgl. Histologische Färbungen) und gegebenenfalls fotografiert. Die gefärbten Aorten und Aortenbögen wurden mit einer Federschere longitudinal eröffnet und mit Minutiennadeln auf Agarosegelpads befestigt. Von diesen Präparaten wurden unter einem Stereomikroskop mit einer Digitalkamera Aufnahmen angefertigt. Die Quantifizierung der arteriosklerotischen Läsionen erfolgte mit Photoshop 7.0. Die Fläche der Läsionen wurde dabei auf die Gesamtaortenoberfläche bezogen und in Prozent angegeben.

Zusätzlich wurde eine Plaquequantifizierung an Querschnitten durch den Aortenursprung vorgenommen ¹⁸⁰. Dazu wurden 5 Schnitte pro Tier Öl Rot oder nach Smith Dietrich gefärbt und fotografiert.

Die Quantifizierung der Plaquearea erfolgte mit AnalySIS B (Olympus). Die durchschnittliche Plaquearea pro Tier pro Schnitt wurde in μm^2 angegeben.

3.11 Histologie

Frisch entnommene Gewebe wurden in OCT *Tissue Freezing Medium* (Jung) eingebettet und in auf -40 °C vorgekühltem Isopentan eingefroren.

Anschließend wurden Kryoschnitte mit einer Dicke von 5-8 μm angefertigt und auf Glasobjektträger (Histobond; Marienfeld) aufgezogen. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurden sie für histologische oder immunhistologische Färbungen eingefroren.

Nach dem Auftauen wurden die Schnitte je nach beabsichtigter Färbung mit Zamboni-Fixativ, Bouin-Fixativ, Paraformaldehyd, Formalin, Ethanol oder Aceton fixiert.

3.11.1 Öl Rot Färbung (*Oil-Red-O-Methode*)¹⁸¹

<i>Oil-Red-O</i> -Lösung	0,5 g <i>Oil-Red-O</i> (Chroma-Ges.) in 100 ml 99%igem Isopropanol lösen [Stammlösung] 24 h vor Gebrauch Stammlösung mit Isopropanol auf 60 % verdünnen direkt vor Gebrauch durch Whatmanfilter Nr.42 filtrieren
--------------------------	---

Formalinfixierte Präparate wurden in aqua dest.gewaschen und für 5-10 min in 60%iges Isopropanol überführt. In verdünnter, frisch filtrierter *Oil Red O*-Lösung wurden die Präparate gefärbt (Kryoschnitte 10 min, ganze Gefäße 30 min) und zum Differenzieren wieder in 60%iges Isopropanol überführt. Nach dem Auswaschen von Farbresten wurden an Schnittpräparaten nach Bedarf Zellkerne mit Hämalaun gefärbt.

Nach dieser Färbung werden Lipide rot und Zellkerne blau dargestellt.

3.11.2 Cholesterinfärbung nach Smith-Dietrich¹⁸¹

Zamboni-Fixativ	0,1 M Phosphatpuffer 4% (w/v) Paraformaldehyd 15% (w/v) Pikrinsäure
Hämatoxylin nach Kultschitzky	10 ml alte in abs. Alkohol gelöste Hämatoxylinlösung mit 90 ml 2%iger Essigsäure mischen.
Boraxferricyankaliumlösung nach Weigert	0,25 g Kaliumferricyanid, 0,25g Natrium- tetraborat in 100 ml Aqua dest. lösen und lichtgeschützt lagern.

Die Fixierung der Schnitte erfolgte für 10 min in Zamboni-Fixativ. Es schloss sich eine 24-48stündige Chromierung der Präparate bei 37 °C an. Dazu wurden die Präparate in 5%ige Kaliumdichromatlösung gestellt. Danach wurden die Schnitte mit Aqua dest.gewaschen und in essigsauerm Hämatoxylin nach Kultschitzky 4-5 h gefärbt. Diese Hämatoxylin-Lösung sollte mindestens 6 Monate alt sein. Anschließend wurden die Schnitte mit Aqua dest. gewaschen

und über Nacht in Boraxferricyankaliumlösung nach Weigert differenziert. Vor dem Eindecken mit *Aqua mount* wurden die Präparate gründlich mit Aqua dest. ausgewaschen.

Phosphatide, Cerebroside, Cholesterinsäuregemische und Fettsäuren erscheinen in dieser Färbung blau-blauschwarz. Eisen, Hämoglobin und hämatogene Pigmente werden ebenfalls mit angefärbt.

3.11.3 Kollagenfärbung mit Picro-Siriusrot¹⁸¹

Picro-Siriusrot	0,1 % Sirius Rot in gesättigter Pikrinsäure
Coelestineblau-Lösung	2,5g Ammoniumeisen-III-sulfat über Nacht in 50 ml Aqua dest. lösen, 0,25 g Coelestineblau zugeben, 30 min kochen lassen und filtrieren. 7 ml Glycerin dazugeben.

Die Fixierung der Schnitte erfolgte 10 min in 70%igen Ethanol. Dann wurden die Präparate 7 min in Coelestineblau gefärbt und kurz in 1% HCl differenziert. Zum Bläuen wurden die Schnitte in Leitungswasser gegeben und anschließend 15 min in Picro-Siriusrot gefärbt. Abschließend wurden die Schnitte 3mal je 2 min in absoluten Alkohol und 3mal 5 min in *Tissue Clear* getaucht. Die Präparate wurden mit *Tissue Mount* eingedeckt.

In dieser Färbung wird Kollagen rot dargestellt und die Zellkerne blau. Unter polarisiertem Licht betrachtet erscheint dicht gepacktes Kollagen Typ I rot und neu gebildetes und dünn gepacktes Kollagen Typ II grün.

3.11.4 Masson Trichromfärbung¹⁸¹

Bouinsches Fixativ	Ges. Pikrinsäure: 37%iges Formalin: konz. Essigsäure [15:5:1]
Trichromgemisch	0,6 g Chromotrop 2R; 0,6 g Phosphorwolframsäure; 0,3 g Anilinblau (wasserlöslich); 100 ml Aqua dest. ; 1 ml konz. Essigsäure
Hämatoxylinlösung	Eisenhämatoxylin A nach Weigert und Hämatoxylin B nach Weigert 1:1

Die Präparate wurden mit Fixativ nach Bouin 10 min fixiert. In Hämatoxylinlösung nach Weigert wurden anschließend 2-4 min die Zellkerne angefärbt. Zur Differenzierung wurden die Schnitte 2-5 min in 1%ige Salzsäure in Ethanol überführt und anschließend gut gewässert. Danach wurden die Schnitte 5 min in das Trichromgemisch gestellt und zügig durch eine aufsteigende Alkoholreihe (2 x 70 %, 2 x 96 %, 2 x abs. EtOH und 2 x Xylol) geführt. Die Präparate wurden mit *Eukitt* eingedeckt.

Zellkerne erscheinen schwarz, das Cytoplasma rot und das Bindegewebe intensiv blau. Erythrozyten erscheinen leuchtend rot.

3.12 AMPase Nachweis an Schnittpräparaten ¹⁸²

Tris-maleat-sucrose Puffer	0,25 M Sucrose, 50 mM Tris-maleat pH 7,4; 2 mM CaCl ₂
Tris-maleat-sucrose gepufferte Substratlösung	2 mM Pb(NO ₃) ₂ ; 5 mM MnCl ₂ ; 2 mM CaCl ₂ ; 50 mM tris-maleat pH 7,4; 0,25 M Sucrose; 3% Dextran T250

Die aufgetauten Kryoschnitte wurden 15 min in 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Es schloss sich eine 30minütige Inkubation in Tris-maleat-sucrose Puffer an. Die Enzymreaktion erfolgte 60 min bei Raumtemperatur. Dazu wurde das Substrat (1 mM AMP) in Tris maleat sucrose gepufferte Substrat Lösung gegeben. Um die Gesamt-AMPaseaktivität von der spezifischen CD73-Aktivität zu unterscheiden, wurden jeweils auch Präparate mit 5 mM Levamisol, dem spezifischen Inhibitor der Alkalischen Phosphatase inkubiert.

Nach der Enzymreaktion wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gewaschen und in einer wässrigen (NH₄)₂S 1 % v/v inkubiert. Infolge der Nukleotidase-Aktivität kommt es zur Bildung eines Bleiorthophosphatniederschlags, der nun braun erscheint.

Zuletzt wurden die Präparate noch in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert und mit *Permount* eingedeckt.

3.13 Immunhistologie

3.13.1 Hyaluronsäure-Nachweis¹⁸³

DAB- (3,3'-Diaminobenzidine-)- Lösung 50 µl DAB Chromogen zu 1 ml DAB Substrat geben

Die Kryoschnitte wurden 15 min in absoluten Ethanol fixiert und durch eine absteigende Alkoholreihe geführt. Nach 10minütiger Inkubation in PBS erfolgte für 1 h eine Blockierung mit TBS+ 10% FBS+ 1% BSA bei Raumtemperatur. Als Primärantikörper wurden 0,4 µl Hyaluronsäure-Bindeprotein (HABP) in PBS+1% BSA über Nacht bei 4 °C auf die Schnitte gegeben. Es schlossen sich drei 5minütige Waschschrte in PBS an. Es folgte eine 1stündige Inkubation mit einer Streptavidinverdünnung (1:200). Danach schlossen sich wieder drei 5minütige Waschschrte in PBS an.

Zur Detektion wurden die Schnitte 10 min bei 37 °C in TB, 10 min bei 37 °C in DAB, 1 min bei Raumtemperatur in TB und 1min in Aqua dest. inkubiert.

Zur Kernfärbung wurden die Schnitte 1 min bei Raumtemperatur in Hämalaunlösung gegeben, 2-3mal kurz in 1%ige HCl getaucht und 10 min mit kaltem Wasser gespült. Bevor die Präparate mit *Aquatex* eingedeckt wurden, wurden sie noch einmal in destiliertes Wasser überführt.

3.13.2 Kollagen-Neoepitopnachweis

Citratpuffer

Stock A: 0,1 M Citric Acid.

Stock B: 0,1 M Na-Citrat

Gebrauchslösung: 9 ml Stock A+ 41 ml

Stock B; pH 6,0

Die Kryoschnitte wurden 15 min in absoluten Ethanol fixiert und durch eine absteigende Alkoholreihe geführt. Es schloss sich ein 90minütiger Chondroitinase-Verdau bei 37 °C an. Danach wurden die Schnitte 3 mal 5 min in PBS gewaschen und 10-20 min in Citratpuffer gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte wieder 3mal gewaschen.

Die Blockierung erfolgte 1 h bei Raumtemperatur in TBS+10 % FBS + 1 % BSA. Der Primärantikörper COL 2 3/4C *Short Polyklonal Rabbit Antibody* (C12C) wurde in PBS + 1 % BSA verdünnt (1:100). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Nach drei 5minütigen Waschschritten in PBS wurde der Sekundärantikörper, in diesem Fall *Anti-Rabbit-IgG* 1:400 verdünnt in PBS, auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte 1 h bei Raumtemperatur. Danach schlossen sich wieder drei 5minütige Waschschrritte in PBS an. Detektion und Kernfärbung erfolgten wie unter 3.10.2.1 beschrieben.

3.13.3 Immunhistologische Nachweise

Die aufgetauten Schnitte oder auf *chamber slides* gewachsenen Zellen wurden 10-15 min mit *Zamboni*-Fixativ fixiert. Anschließend wurden die Präparate zweimal je 5-10 min in PBS und einmal 5-10 min in PBS mit 0,1 % Saponin gewaschen. Die Blockierung erfolgte 90 min in 5 % *normal goat serum* (Linaris) in PBS mit 0,1% Saponin. Der Primärantikörper wurde in 2% *normal goat serum* [Linaris,X] in PBS mit 0,1% Saponin nach Herstellerangaben 1:50- 1:400 verdünnt [CD4 1:200, CD11b 1:50, CD62E 1:100, CD62P 1:100, smActin 1:400, ICAM 1:100, VCAM 1:100, CD73 1:100; CD31 1:50]. Die Inkubation erfolgte 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nach drei 10minütigen Waschschrritten in PBS mit 0,1 % Saponin wurde der nach Herstellerangaben verdünnte Sekundärantikörper auf die Schnitte gegeben. Nach 2stündiger lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Präparate erneut gewaschen und mit *ProLong Gold antifade reagent with DAPI* [Invitrogen; Eugene Oregon,USA] eingedeckt.

3.14 Mikroskopie und Aufnahme der Präparate

Mikroskopische und Fluoreszenzmikroskopische Betrachtungen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX50) unter Verwendung der Objektive Plan Apo 1,25x/0.04; UPlan Fl 10x/0.30 Ph1; UPlan 20x/0.5 Ph1 und der Filter U-MNIBA3 470-495 nm, U-MNU2 360-370 nm und UMNG2 530-550 nm durchgeführt. Aufnahmen der Präparate wurden mit dem Programm AnalySIS B gemacht.

Zum Identifizieren einzelner fluoreszenzmarkierter Zellen wurde die Konfokale-Laserscanmikroskopie angewandt. Benutzt wurde das System Zeiss LSM 510 unter Verwendung der Laser Enterprise UV 364 nm, Argon 488 nm und HeNe 543 nm und der Objektive Plan-Neofluor 25x/0.8 Imm corr DIC und Plan-Neofluor 40x/1.3 Oil DIC. Zur Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe wurden die Bandpassfilter 435-485 nm (DAPI), 505-530 nm (FITC) und 560-615 nm (Rhodamin) eingesetzt. Bei mehrfach markierten Präparaten wurde

im Multitracking Mode gearbeitet. Aufnahme und Bearbeitung der Bilder erfolgte mit dem Zeiss Image Browser.

3.15 Quantifizierung von Cytokinen und Chemokinen im Plasma und Serum

Frisch gewonnenes Serum oder heparinisiertes Plasma wurde aliquotiert bei -80 °C gelagert und zur Cytokinbestimmung verwendet. Der Gehalt von IL-1 β , IL-10, IL-6, TNF- α und MCP-1 wurde mit kommerziellen ELISA-Kits (Endogen) entsprechend der Herstellerangaben gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Phänotyp der CD73^{-/-}-Mutante

CD73^{-/-}-Mäuse sind fertil, zeigen keine Einschränkungen in ihrer Entwicklung oder Reproduktionskapazität. Verpaart man heterozygote Tiere, erhält man Wildtyp (WT), Heterozygote (CD73^{+/-}) und Knockout (KO, CD73^{-/-}) in der nach Mendel erwarteten Frequenz von 1:2:1.

Der Erfolg der KO-Strategie wurde an den von P. Koszalka generierten konditional, bzw. konstitutiv CD73 defizienten Mausmutanten überprüft. Mit Southern blot Analysen wurde die erfolgte homologe Rekombination bestätigt und mit RT-PCR konnte gezeigt werden, dass durch die Deletion des Exon II ein entsprechend verkürztes mRNA-Transkript entsteht. Western blots mit gereinigten Membranproteinfraktionen aus Herz und Leber zeigten, dass kein Protein mehr gebildet wird. Zusätzlich wurde an histologischen Schnitten und an gereinigten Membranproteinfraktionen nachgewiesen, dass in der Mutante keine CD73-bedingte AMPase Aktivität mehr auftritt⁵⁷.

4.1.1 AMPase-Aktivität in Membranproteinfraktionen aus verschiedenen Geweben

Wie unter 3.4.1 beschrieben, wurden frisch entnommene Organe aus je 6 männlichen WT- und CD73-KO-Mäusen aufgearbeitet. Aliquots mit bekanntem Proteingehalt der so erhaltenen ConA-angereicherten Membranproteine wurden in den Lanzetta-Assay eingesetzt. Die in einer bestimmten Zeit gebildete Menge freien Phosphates wurde photometrisch ermittelt. Um neben der Gesamt-AMPaseAktivität auch die CD73-Aktivität zu ermitteln, wurden Aliquots von jeder Proteinpräparation mit 5 mM Levamisol, einem spezifischen Inhibitor der Alkalischen Phosphatase (ALP) vorinkubiert. Die ermittelten Enzymaktivitäten wurden anschließend in nmolP_i/μg/min angegeben.

Abbildung 5 zeigt die mittleren AMPase- und CD73-Aktivitäten für alle untersuchten Proben.

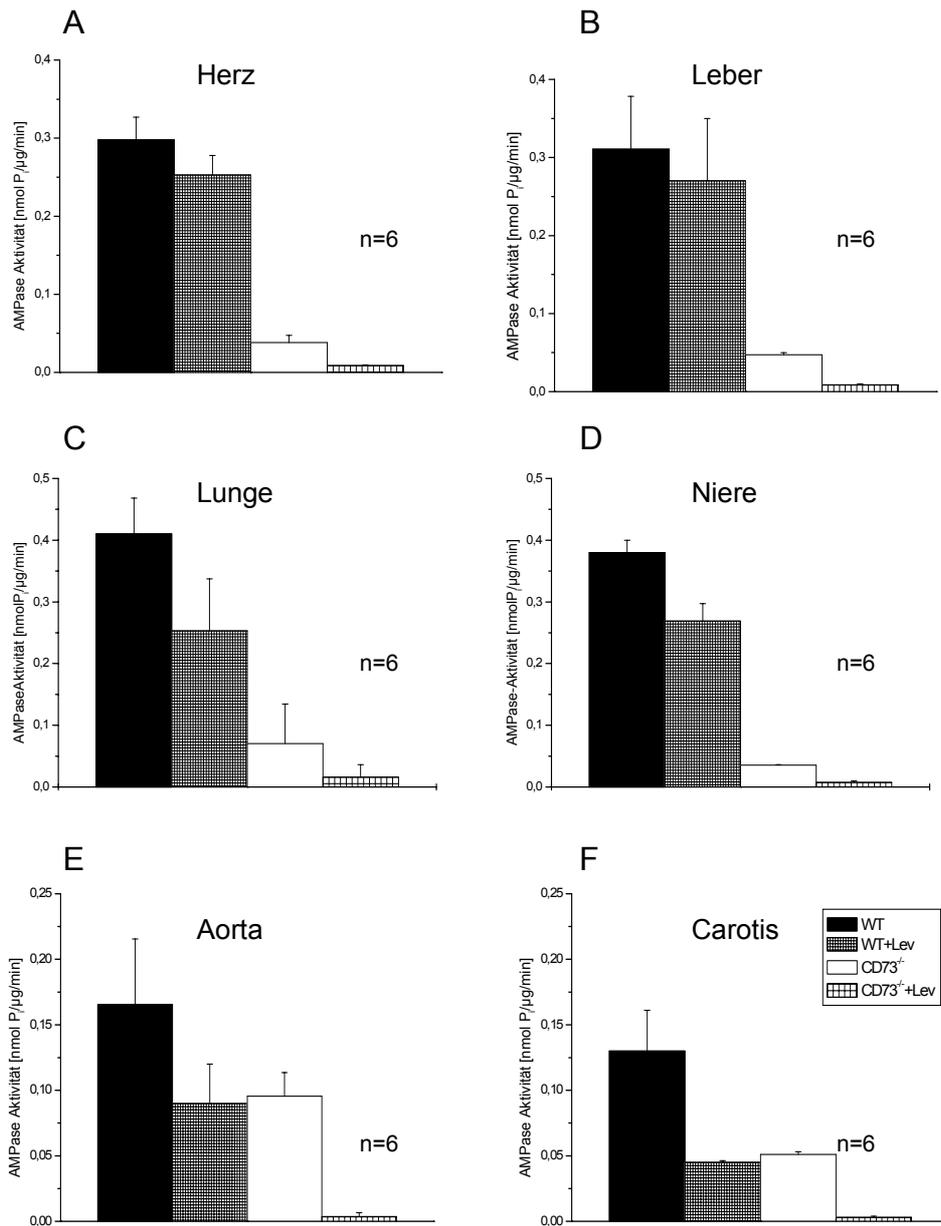


Abb.5: Gesamt-AMPase Aktivität (WT; CD73^{-/-}) und CD73-Aktivität (WT+Lev; CD73^{-/-}+Lev) in angereicherten Membranproteinfractionen aus (A) Herz, (B) Leber, (C) Lunge, (D) Niere, (E) Aorta und (F) Carotis. Pro Gruppe wurden 6 männliche Tiere im Alter von 8-12 Wochen eingesetzt.

Ohne Zugabe von Levamisol setzt sich die GesamtAMPase-Aktivität bei den Wildtyp-Tieren aus CD73- und ALP-Aktivität zusammen, wohingegen bei den CD73-KO-Tieren die Gesamtaktivität der ALP-Aktivität entsprechen sollte. Tatsächlich können im KO nach Levamisolzugabe und somit Hemmung der ALP keine nennenswerten Enzymaktivitäten mehr gemessen werden.

Die im KO gemessene ALP-Aktivität und die im Wildtyp gemessene CD73-Aktivität ergeben zusammen in etwa die im Wildtyp bestimmte Gesamtaktivität.

Während in gereinigten ConA angereicherten Proben aus Herz, Leber, Lunge und Niere Gesamt-AMPase-Aktivitäten von 0,3-4 nmol P_i/μg/min und CD73-Aktivitäten von ca. 0,25 nmol P_i/μg/min bestimmt wurden, liegen die entsprechenden Werte in Carotis und Aorta mit 0,13-16 nmol P_i/μg/min und 0,05-8 nmol P_i/μg/min deutlich niedriger.

4.1.2 AMPase-Aktivität im Plasma

In heparinisiertem Plasma von 8-12 Wochen alten CD73-KO- und WT-Mäusen wurde die AMPase-Aktivität bestimmt. Um zwischen CD73- und ALP-Aktivität unterscheiden zu können, wurden von jedem Tier zusätzlich Plasmaproben mit 5 mM Levamisol, einem spezifischen Inhibitor der ALP behandelt. Die Plasmaproben wurden mit ¹⁴C radioaktiv markiertem AMP bei 37°C inkubiert und anschließend dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (Vgl. 3.4.2).

Abbildung 6 A zeigt beispielhaft chromatographisch getrennte, unter UV-Licht sichtbar gemachte Nukleoside und Nukleotide.

Trennt man ein definiertes Aliquot des Versuchsansatzes auf, isoliert die entstandenen Hypoxantin-, Inosin-, Adenosin- und AMP-Spots und misst im Counter die Aktivität, so kann man aus der gemessenen Aktivität der AMP-Abbauprodukte oder der Aktivität der verbliebenen AMP-Menge die Stoffkonzentration, und somit die Enzymaktivität errechnen.

Für WT-Tiere wurde eine durchschnittliche Gesamt-AMPase-Aktivität von 341 ± 16 nmol/ml/h ermittelt. Davon gehen 109 nmol/ml/h auf die Aktivität der ALP und 232 nmol/ml/h auf die CD73-Aktivität zurück. In CD73-KO-Tieren beträgt die Gesamt-AMPase-Aktivität 116 ± 5 nmol/ml/h (Abb. 6 B). Hemmt man die ALP durch Zugabe von Levamisol, ist in CD73-KO-Tieren keine Aktivität mehr messbar. Somit entspricht die gemessene Gesamtaktivität der ALP-Aktivität. Die ALP-Aktivität der WT-Tiere unterscheidet sich nicht von der ALP-Aktivität der CD73-KO-Tiere.

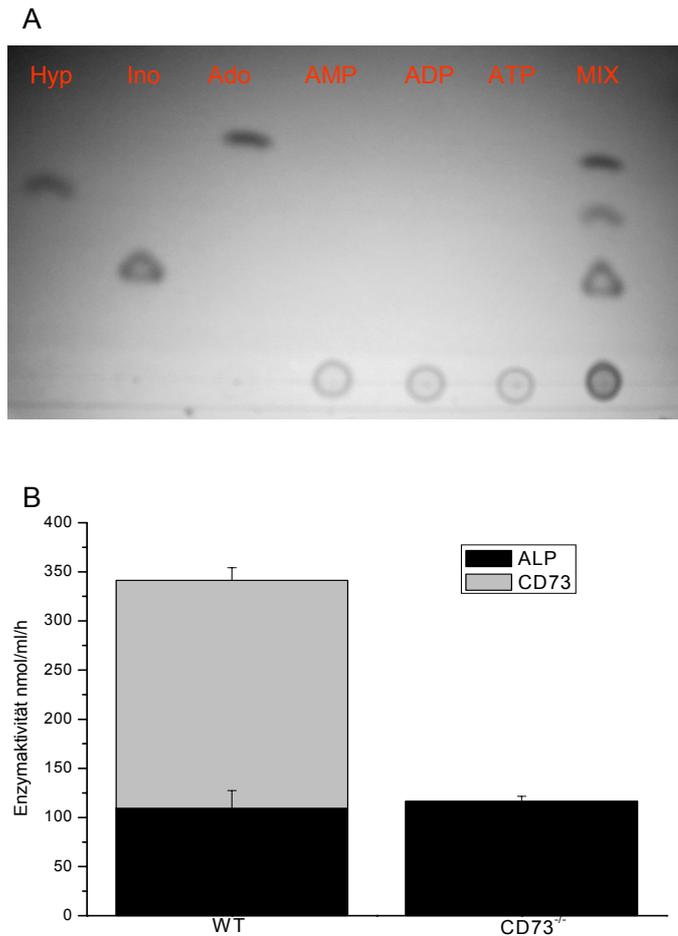


Abb.6: Bestimmung der ALP- und CD73-Enzymaktivität im Plasma von 8-12 Wochen alten WT- und CD73^{-/-}-Mäusen. (A) Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Nucleosiden zur Identifizierung der AMP-Abbauprodukte. (B) ALP- und CD73 – Aktivität im Plasma von WT und CD73^{-/-} im Alter von 8-12 Wochen (n=10).

4.1.3 AMPase-Aktivität an isolierten Aorten

Frisch präparierte Aorten wurden von Fett und Bindegewebe befreit und longitudinal eröffnet. Mit Minutiennadeln wurden die Präparate in mit Agarosegel beschichteten *Chamber slides* fixiert und mit PBS gewaschen. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Präparate mit einer Schieblehre ausgemessen, so dass von jeder Aortenoberfläche der Flächeninhalt berechnet werden konnte. Nach einer Äquilibrationsphase in RPMI-Medium bei 37 °C wurde des Medium gegen RPMI Medium mit 50 µmol/l eAMP ausgetauscht. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Überstände entfernt und sofort bei -20 °C eingefroren. Mit Hilfe der HPLC wurde der Abbau des eAMP, bzw. die Bildung von eAdenosin verfolgt.

Abbildung 7 A zeigt einen Ausschnitt aus einem HPLC-Chromatogramm. Aufgrund unterschiedlicher Retentionszeiten lassen sich Adenosin, eAdenosin, AMP und eAMP voneinander trennen. Abbildung 7 B zeigt die Bildung von eAdenosin. Es wurden je 4 WT,

bzw. CD73-KO-Präparate eingesetzt. Die gebildete eAdenosinmenge wurde auf die Aortenoberfläche bezogen. Während im CD73-KO nur sehr geringe eAdenosinmengen nachgewiesen werden, steigt im WT die eAdenosinkonzentration zunächst sprunghaft an und erreicht bereits nach 10 min die Hälfte der nach 60 min gebildeten eAdenosinmenge von ca. 11 pmol / mm². Da nach ca. 15 min bereits die Plateauphase erreicht wird, wurden in weiteren Versuchen eAdenosin und eAMP zu den Zeitpunkten t=0; 3; 5; 7,5 und 10 min gemessen.

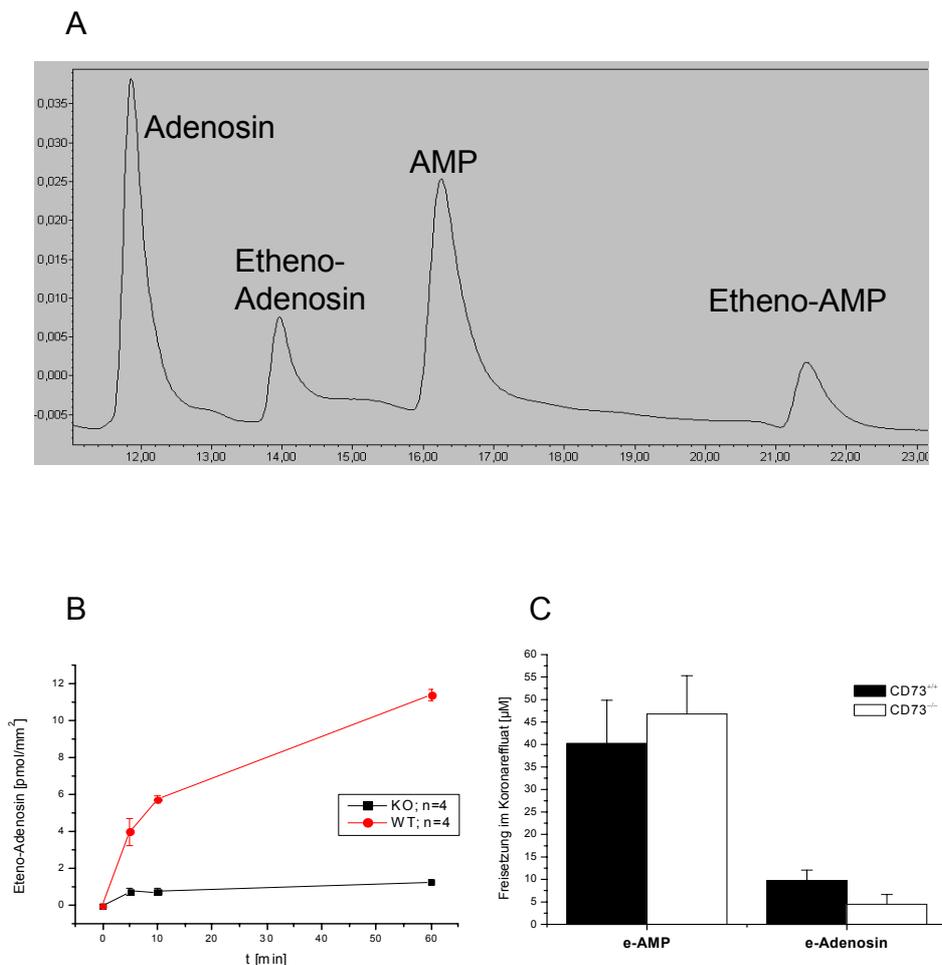


Abb.7: Bestimmung der AMPase-Enzymaktivität am frischen Aortenpräparat und an isoliert perfundierten Herzen von WT- und CD73^{-/-}-Mäusen. (A) HPLC-Chromatogramm eines Standardgemisches. eAdenosin und eAMP können klar von Adenosin und AMP getrennt werden. (B) eAdenosinbildung in pmol/mm² Endotheloberfläche von WT- und CD73^{-/-}-Aorten im Zeitverlauf (C) eAMP-Abbau und eAdenosinbildung in Effluaten nach Langendorff-Perfusion isolierter Herzen.

4.1.4 AMPase-Aktivität an isolierten Herzen

Isolierte Herzen von WT- und CD73^{-/-}-Mäusen wurden im Langendorff-Modus bei einem konstanten Druck von 100 mm Hg perfundiert. Nach intrakoronarer Infusion von 50 µmol/l eAMP wurde das Effluat mit HPLC untersucht. Der Abbau von eAMP zu eAdenosin wurde verfolgt (Abb. 7 C). Nach einmaliger Passage wird im WT-Herz 24 % des eAMP zu eAdenosin abgebaut, hingegen werden im KO ca. 9 % eAMP verstoffwechselt. Diese Restaktivität im KO geht vermutlich auf die ALP zurück.

4.1.5 Ex vivo Versuche zur Steigerung der AMPase-Aktivität

An kultivierten Ratten- Endothelzellen (SVAREC) wurde nach Inkubation mit Statinen eine Steigerung der CD73-Aktivität beschrieben¹⁸⁴.

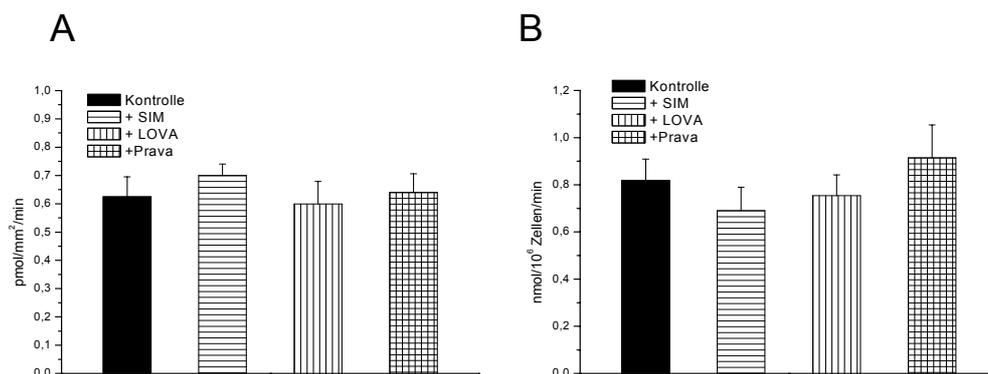


Abb.8: CD73-Aktivität nach Statingabe. (A) Isolierte Aorten wurden mit Statinen behandelt und (B) HUVEC-Zellen wurden mit Statinen inkubiert. Anschließend wurde die CD73-Aktivität bestimmt.

Um zur CD73-Aktivitätssteigerung gegebenenfalls später Statine im Tierexperiment einzusetzen, wurden zunächst *ex vivo* Versuche durchgeführt, um die beschriebenen Effekte im Mausmodell zu überprüfen. Wie unter 4.1.3.1 beschrieben, wurden 20 WT-Aorten präpariert. Vor der Zugabe von eAMP wurden je 5 WT-Aorten 16 h mit 1 mM Simvastatin, bzw. 1 mM Lovastatin oder 1 mM Pravastatin in RPMI-Medium inkubiert, die verbleibenden WT- und CD73^{-/-}-Aorten entsprechend nur mit RPMI-Medium. Weder die zu definierten Zeitpunkten gebildete eAdenosinmenge, noch die abgebaute eAMP-Menge unterscheidet sich zwischen Statin behandelten und unbehandelten Aorten (Abb. 8 A).

Ein weiterer Versuch wurde analog zu dem von Ledoux beschriebenen Ansatz mit kultivierten humanen Endothelzellen (HUVEC) durchgeführt. Als Maß für die Enzymaktivität wurde wie unter 4.1.3.1 beschrieben eAdenosinbildung, bzw. eAMP-Abbau mit HPLC gemessen.

Weder durch Inkubation mit Simvastatin, Pravastatin oder Lovastatin konnten Änderungen in der CD73- oder Gesamt-AMPase Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 8 B).

Aufgrund dieser Daten wurde auf den Einsatz von Statinen in *in vivo* Versuchen verzichtet.

4.1.6 Blutbild

Jeweils 10 WT- bzw. CD73-KO-Tiere im Alter von 8-12 Wochen wurden betäubt. Aus der *Vena cava* wurde Vollblut entnommen, wobei Natriumcitrat (1:7) als Antikoagulanz benutzt wurde. Im Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf wurden maschinell folgende Parameter gemessen:

Parameter	WT	SD±	CD73 ^{-/-}	SD±
RBC [x 10 ⁶ /μl]	9,05	0,71	8,47	0,74
RDW [fl]	13,7	0,99	12,42	0,51
RET [%]	3,04	1,2	2,61	1,7
WBC [x 10 ³ /μl]	3,24	2,09	4,05	1,79
Lymp [%]	86,08	4,9	85	6,7
Neut [%]	13,08	5,26	14,63	6,87
PLT [x 10 ³ /μl]	413	47,45	449	95,1
P-LCR [%]	4,275	1,02	2,717	0,86
HCT [%]	48,65	3,36	47,12	5,6
HGB [g/dl]	14,88	1,32	14,05	1,41
MCH [pg]	16,3	0,33	15,55	0,5
MCHC [g/dl]	30,06	1,2	29,88	0,67
MCV [fl]	54,24	1,24	55,4	2,17
MPV [fl]	6,42	0,19	6,3	0,2

Tabelle 1: Blutbild von WT- und CD73^{-/-}-Mäusen

Die CD73^{-/-}-Mutante zeigt ein unauffälliges Blutbild, das sich nicht vom Blutbild der WT-Tiere unterscheidet.

Weder bei der Anzahl der Blutzellen (Rote Blutzellen [RBC], Weiße Blutzellen [WBC]), noch in der prozentualen Zusammensetzung (Retikulozyten [RET], Lymphozyten [Lymp], Neutophile [Neut]) oder in den Erythrozytenindices können signifikante Unterschiede festgestellt werden.

4.1.7 Plättchen- cAMP/cGMP-Spiegel

In plättchenreichen Plasmaproben wurden mit einem Radio-Immun-Assay (RIA) cGMP- und cAMP-Spiegel gemessen. Von je 9 WT-, bzw. CD73-KO-Tieren im Alter von 8-12 Wochen wurde nach Betäubung mit Ketavet (80 mg / kg Körpergewicht; Ketaminhydrochlorid; Pharmacia & Upjohn; Erlangen) und Rompun (10 mg / kg Körpergewicht; Xylazinhydro-

chlorid; Bayer Vital; Leverkusen) aus der *Vena cava* Blut entnommen. Als Antikoagulant wurde Citrat benutzt (1:7) und anschließend wurde dem Vollblut der Phosphodiesterase Inhibitor Isobutylmethylxanthine (IBMX) in einer Endkonzentration von 0,5 mmol/l zugesetzt. Durch 10minütige Zentrifugation bei 290 g wurde plättchenreiches Plasma (PRP) gewonnen und vorsichtig abpipettiert. Aliquots des PRP wurden benutzt, um die Plättchenkonzentration zu bestimmen. Von jedem Tier wurden anschließend 300 µl PRP zur cGMP- und cAMP-Bestimmung eingesetzt (vgl.3.6).

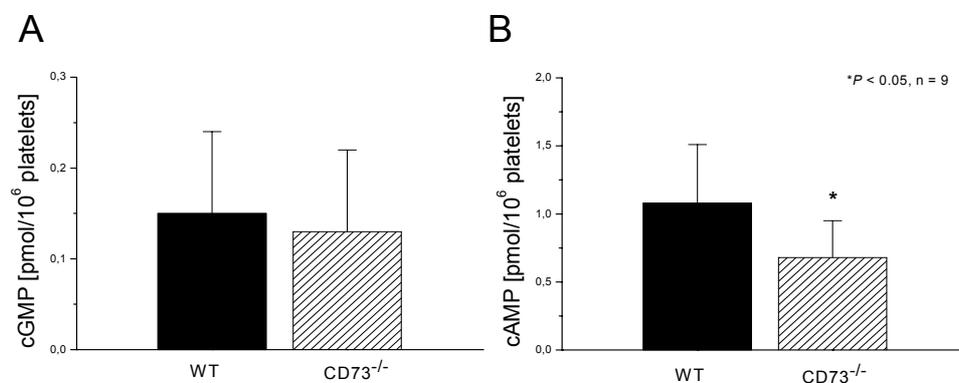


Abb.9: cGMP- und cAMP-Gehalt der Plättchen. In plättchenreichem Plasma aus 8-12 Wochen alten WT und CD73^{-/-}-Mäusen (je n=9) wurde (A) der cGMP- und (B) der cAMP-Spiegel mit einem Radio-Immuno-Assay (RIA) bestimmt.

Abbildung 9 stellt die gemessenen cGMP und cAMP-Spiegel in WT- und CD73-KO-Tieren gegenüber. Für WT wurde eine durchschnittliche cGMP-Konzentration von 0,15 pmol / 10⁶ Plättchen gemessen. Für CD73^{-/-} wurde mit 0,13 pmol / 10⁶ Plättchen ein vergleichbarer Wert bestimmt. Mit einem durchschnittlichen cAMP-Spiegel von 1,08 pmol / 10⁶ Plättchen weist der WT aber gegenüber der CD73-KO-Mutante mit 0,68 pmol / 10⁶ Plättchen signifikant mehr cAMP auf.

4.1.8 Differenzielle Expression der Adenosinrezeptoren an isolierten Geweben

Extrazellulär gebildetes Adenosin wirkt über seine Interaktion mit verschiedenen Adenosinrezeptoren als Signalmolekül. Vier Adenosinrezeptor-Subtypen sind bekannt. Um der Frage nachzugehen, inwieweit sich das durch den CD73-KO reduzierte Adenosinangebot auf die Expression der Adenosinrezeptoren auswirkt, wurden differenzielle Genexpressionsstudien durchgeführt.

Zunächst wurden für jeden Adenosinrezeptor-Subtyp spezifische Primer entworfen. Über weite Sequenzbereiche sind sich die Sequenzen der vier Subtypen sehr ähnlich. Nach einem Alignment der Sequenzen der vier Subtypen wurden die Primer so gewählt, dass je nur ein Subtyp erkannt wird. Bevor diese Primer zur RT-*real time* PCR eingesetzt wurden sind, erfolgten Test-PCRs, um die optimalen Versuchsbedingungen für jedes Primerpaar auszutesten.

Anschließend wurde aus verschiedenen Organen von WT- und CD73^{-/-}-Mäusen RNA isoliert, revers transkribiert und in die *real time* PCR eingesetzt.

Neben den vier Adenosinrezeptoren wurde β -Aktin, das als Haushaltsgen konstitutiv exprimiert wird, als Referenzgen amplifiziert. Um die Expression der einzelnen Rezeptoren in den verschiedenen Proben zu vergleichen, wurde aus dem Amplifikationsplot jeweils auf die RNA-Ausgangskonzentration des Gens zurückgerechnet. Die Ausgangskonzentration des Gens wurde auf die Ausgangskonzentration des Haushaltsgens bezogen. Die relative Expression wird in $[x_{0\text{Gen}}/x_{0\text{Aktin}}]$ angegeben.

Zunächst fällt auf, dass die einzelnen Adenosinrezeptoren in den verschiedenen Geweben von WT-Mäusen unterschiedlich stark exprimiert werden. Zuerst wurden Proben aus Herz, Leber, Lunge, Niere und Aorta verglichen (Abb.10).

AdoRA1 wird am stärksten im Herzgewebe und in der Aorta exprimiert, kann aber auch in Leber, Lunge und Niere nachgewiesen werden. AdoRA2a wird ebenfalls stark im Herz exprimiert, wenn auch etwas schwächer als AdoRA1. In Leber, Niere und Aorta wurden für AdoRA2a vergleichbare relative Expressionen ermittelt. In der Lunge konnte AdoRA2a nur schwach detektiert werden. Der Rezeptor A2b scheint im Vergleich zu A1 und A2a eine untergeordnete Rolle zu spielen, konnte aber in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. Am stärksten wird dieses Gen im Herzgewebe exprimiert. Auch der A3 Adenosinrezeptor konnte schwach in allen Proben nachgewiesen werden. Dieser Rezeptorsubtyp wird am stärksten in der Lunge exprimiert.

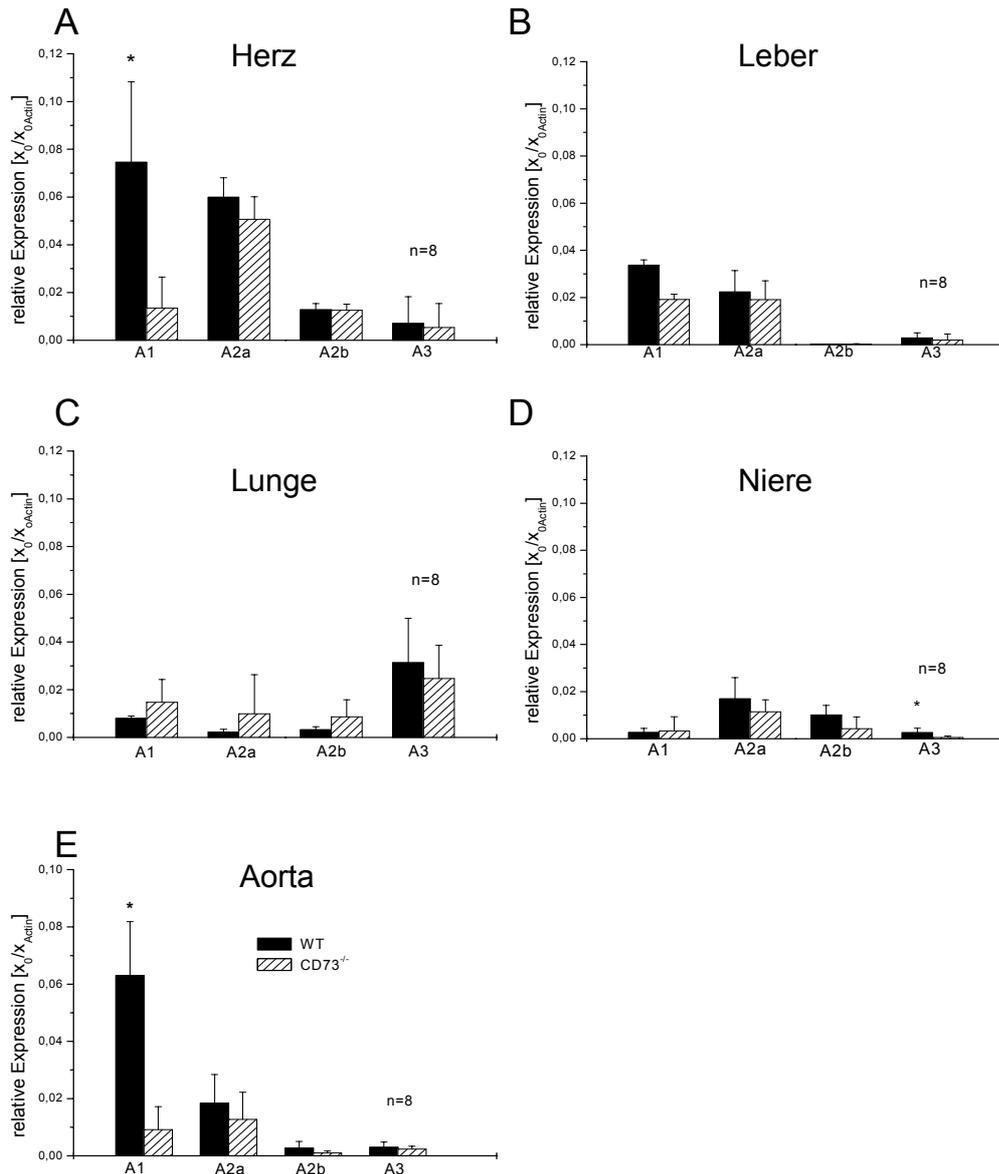


Abb.10: Semiquantitative RT-*real time* PCR zur Expression der Adenosinrezeptoren AdoRA1, AdoRA2a, AdoRA2b und AdoRA3. Es wurde Gesamt-RNA aus (A) Herz, (B) Leber, (C) Lunge, (D) Niere und (E) Aorta untersucht.

Nicht nur zwischen einzelnen Organen, sondern auch innerhalb eines Organs gibt es große Unterschiede in der Verteilung der verschiedenen Adenosinrezeptoren.

Wie in Abbildung 11 zusammengestellt, wurden verschiedene Hirnareale untersucht. Dazu wurden von frisch entnommenen Gehirnen mit einem Mikrotom Schnitte angefertigt, aus denen wiederum unter mikroskopischer Kontrolle bestimmte Bereiche ausgewählt wurden. Aus Cortex, Hippocampus, Hypothalamus und Striatum wurde anschließend RNA isoliert, revers transkribiert und in die *real time* PCR eingesetzt. Der A1-Rezeptor wird im Vergleich

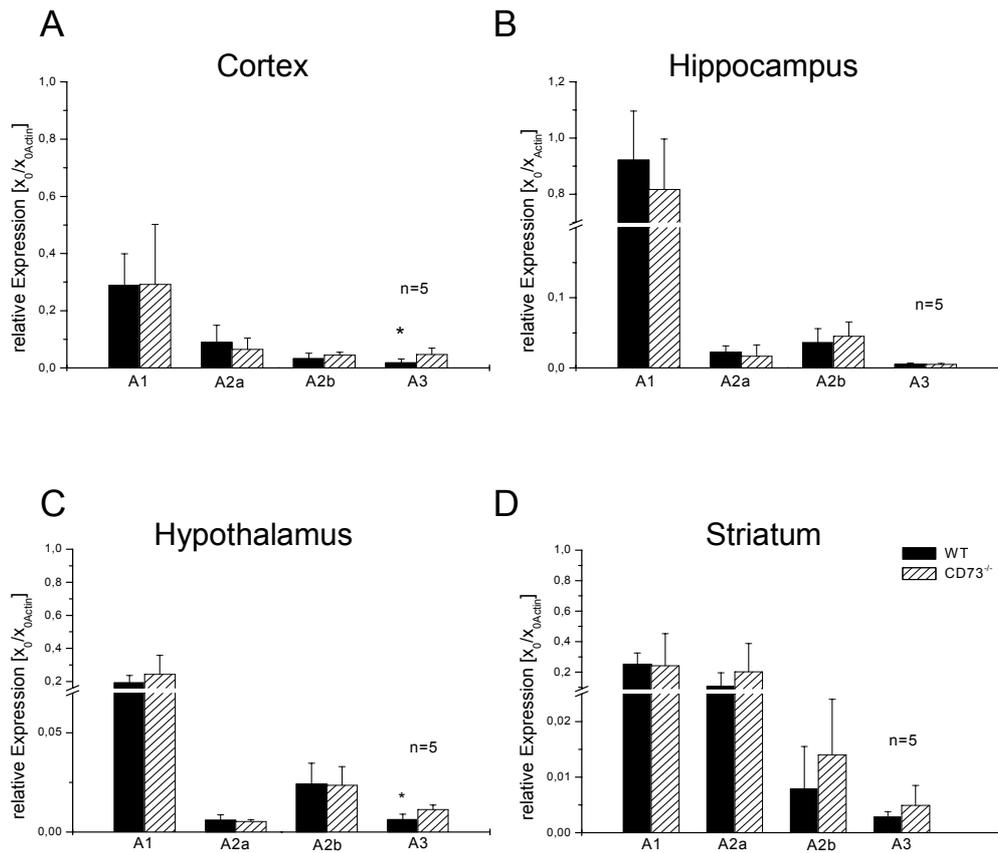


Abb.11: Semiquantitative RT-*real time* PCR zur Expression der Adenosinrezeptoren im Gehirn. Es wurde Gesamt-RNA aus (A) Cortex, (B) Hippocampus, (C) Hypothalamus und (D) Striatum untersucht.

zu den anderen Subtypen im Gehirn, vor allem im Hippocampus, am stärksten exprimiert. Im Striatum sind A1 und A2a-Rezeptor gleich stark vertreten. In anderen Hirnarealen spielen die A2-Rezeptoren eine untergeordnete Rolle. Der A3-Rezeptor ist in allen Proben vertreten.

Vergleicht man WT und CD73-KO, so gibt es im Gehirn nur in Bezug auf den A3-Rezeptor Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Im Cortex und im Hypothalamus wird dieser Rezeptor im CD73-KO signifikant stärker exprimiert als in vergleichbaren WT-Tieren (Abb.11 A, C). Auch im Striatum setzt sich dieser Trend fort (Abb. 11 D).

Ganz unterschiedlich fällt der Vergleich zwischen CD73-KO und WT bei den anderen untersuchten Proben aus (Abb.10). In der Leber und in der Lunge wurden zwischen beiden Gruppen keine Unterschiede detektiert, wobei im Lungengewebe A1, A2a und A2b tendenziell stärker als im KO exprimiert sind. In der Niere liegt die Expression des A3-Rezeptors im KO im Gegensatz zum WT unter der Nachweisgrenze (Abb.10 D). Im Herzgewebe konnte eine drastische Reduktion der A1-Rezeptorexpression im KO nachgewiesen werden (Abb.10 A).

Den gleichen Befund lieferten Aortenproben (Abb.10 E). Zusätzlich wurden frisch isolierte Aortenendothelzellen untersucht (Abb.10 F). Das Expressionsmuster entspricht dem der Gesamtaorta.

4.1.9 Differenzielle Expression der Adenosinrezeptoren an isolierten Endothelzellen

4.1.9.1 Versuche zur Etablierung einer murinen Aortenendothelzellkultur

Kultivierte Zellen werden oft benutzt, um Versuche am lebenden Tier zu umgehen. Zellen können leicht in Kultur gehalten und vermehrt werden. Sie sind leicht zu manipulieren und zumindest bedingt als Modell geeignet, um Enzymaktivitätsmessungen oder Expressionsstudien durchzuführen. Um die Zellpopulation zu charakterisieren, die für die oben beschriebenen Veränderungen in der Adenosinrezeptorexpression in der Aorta der CD73 KO-Maus verantwortlich ist, sollten aus murinen Aorten Endothelzellen isoliert werden.

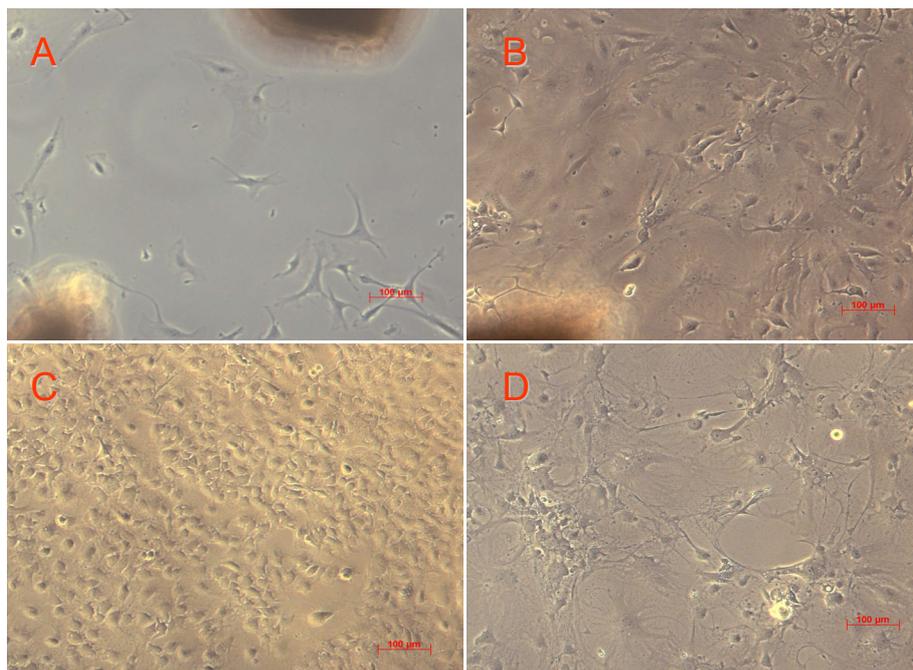


Abb.12: Lichtmikroskopische Aufnahmen der murinen Aortenendothel-Primärzellkultur nach Kreisel. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme nach 5 Tagen, (B) nach 10 Tagen, (C-D) nach 14 Tagen. Trotz identischer Kulturbedingungen zeigen die Zellen nach ca.14 Tagen eine uneinheitliche Morphologie. In (C) und (D) sind unterschiedliche Bereiche der gleichen Kulturschale dargestellt.

Zunächst wurden Kultivierungsversuche nach einem von Kreisel ¹⁷⁷ etablierten Protokoll vorgenommen (3.8.3). Aus isolierten Aorten wurden Segmente mit der Endothelseite auf Kollagenpolster gebettet. Wie zuvor beschrieben, wachsen nach ca. 5-6 Tagen aus den Aortensegmenten Zellen aus (Abb.12 A), die sich in den nächsten Tagen durch Teilung vermehren (Abb. 12 B-D). Obwohl die meisten Zellen morphologische Ähnlichkeiten mit bekannten Endothelzellen wie der murinen BEND-Linie oder *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) aufweisen, konnten nur in den ersten Kultivierungstagen Dil-Ac-LDL positive Zellen nachgewiesen werden. Vergleicht man die Abbildungen 12 C und 12 D wird außerdem deutlich, dass nach 14 Tagen in Kultur einige Zellen ihre Morphologie ändern.

Ein immunhistochemischer Nachweis von gängigen Endothelzellmarkern wie Endoglin (CD105) oder PECAM (CD31) konnte nicht erbracht werden.

Es wurden zahlreiche Versuche unternommen, um die Kulturbedingungen zu optimieren. So wurden die Aortensegmente statt nach 6-9 Tagen nach 2; 3 oder 4 Tagen entfernt. Dies führte zu einer geringeren Zellausbeute. Statt mit Kollagen wurden die Kulturschalen mit Matrigel (BD Bioscience 354234) oder mit 1% Gelatine beschichtet. Auf diesen Beschichtungen wuchsen die Zellen langsamer, so dass schließlich wieder Kollagen benutzt wurde. Auch alternative Endothelzellmedien wie PromoCell- Medium #22210 ermöglichten keine sauberen Endothelzellkulturen.

Es folgten Kultivierungsversuche nach dem 2005 veröffentlichten Protokoll von Kobayashi ¹⁷⁸ (3.8.4). Im Gegensatz zu dem Protokoll nach Kreisel werden hier nicht Aortensegmente kultiviert, aus denen neben Endothelzellen auch glatte Muskelzellen oder Fibroblasten auswachsen können. Stattdessen werden die im Inneren des Gefäßes liegenden Endothelzellen mit Kollagen angedaut und aus dem Gefäß ausgespült. Nach diesem Prinzip werden auch erfolgreich HUVEC gewonnen, wobei im Vergleich zur Mauseorta aus einer menschlichen Nabelschnur ein Vielfaches an Zellen isoliert werden kann.

Durch die simultane Aufarbeitung von 4-6 Aorten ist es gelungen, nach 12-14 Tagen bis zu 10^6 Zellen zu erhalten. Allerdings schwankten die Ausbeuten von Präparation zu Präparation. In Abbildung 13 sind nach Kobayashi kultivierte Zellen aus Mauseorten und kultivierte BEND-Zellen gegenübergestellt. Wie in den Teilabbildungen A und B deutlich wird, zeigen die kultivierten Zellen aus Mauseorten einen ähnlichen Phänotyp wie die BEND-Zellen. In den Abbildungen 13 C und D sind Dil-Ac-LDL gefärbte Zellen gegenübergestellt. Markiertes acetyliertes LDL wird von Endothelzellen aufgenommen und daher oft als Endothelzellmarker benutzt. Die frische Aortenzellkultur weist weniger Dil-Ac-LDL-positive Zellen auf als die

etablierte BEND-Linie. Auch der immunhistochemische Nachweis von PECAM (CD31) fällt bei den frisch isolierten Zellen schwächer aus als bei der BEND-Linie (vgl. Abb. 13 E-F), ist aber durchaus positiv. Es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Endothelzellen.

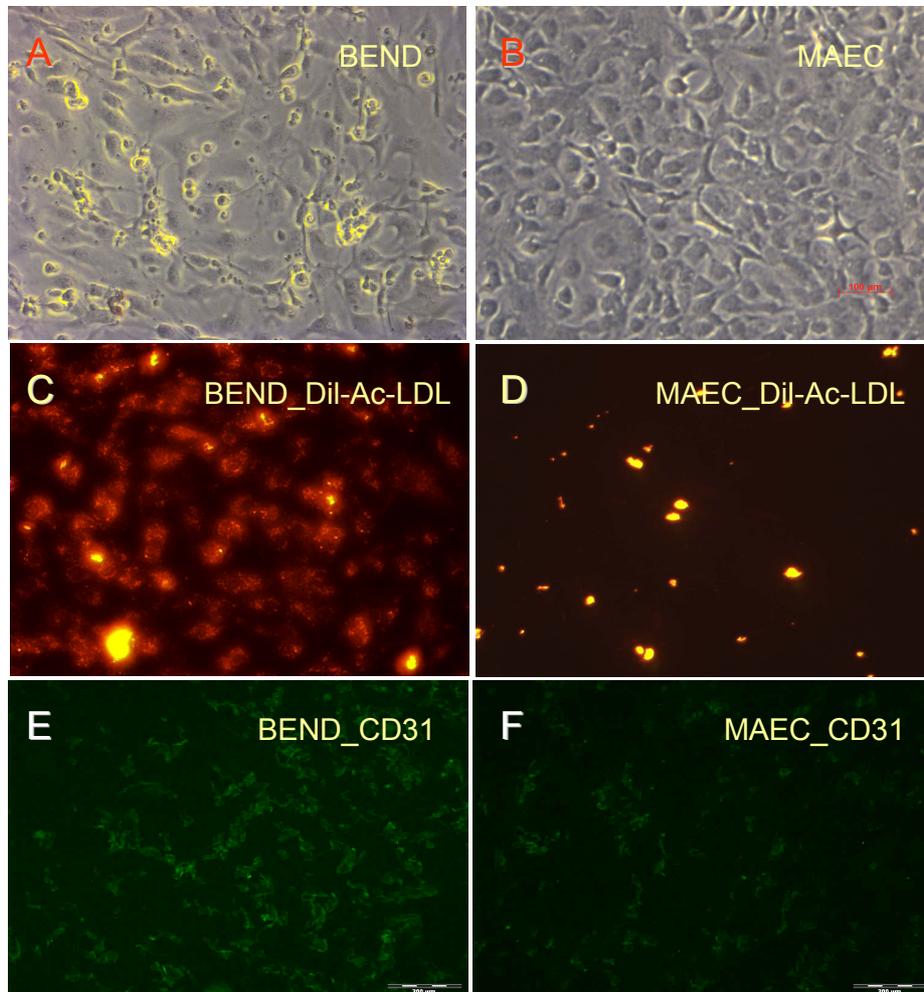


Abb.13: Lichtmikroskopische Aufnahmen der murinen Aortenendothel-Primärzellkultur nach Kobayashi. Die Primärzellkultur wurde charakterisiert. Als Positivkontrolle wurde die endotheliale BEND-Zelllinie benutzt. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme von BEND-Zellen, (B) Lichtmikroskopische Aufnahme von murinen Aortenendothel Zellen (MAEC), (C) und (D) Dil-Ac-LDL-Färbung, (E) und (F) Immunhistochemischer Nachweis von CD31 als Endothelzellmarker.

4.1.9.2 Isolierung frischer Aortenendothelzellen

Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten bei der Etablierung einer murinen Aortenendothelzellkultur und der Tatsache, dass kultivierte Zellen ihr Expressionsmuster ändern, wurde darauf verzichtet, kultivierte Zellen für Genexpressionsstudien zu verwenden. Stattdessen wurden mit der „En Face“-Methode Endothelzellen von der Gefäßwand gelöst und unmittelbar zur RNA-Gewinnung eingesetzt (vgl.3.7.1.1). Einige „En Face“-Präparate wurden immunhistologisch untersucht, um die Reinheit dieser Präparate zu überprüfen. Abbildung 14

zeigt den immunhistologischen Nachweis des Endothelzellmarkers CD31. Trotz der geringen Zellanzahl war es möglich, ausreichende RNA-Mengen zu isolieren, um RT-*real time* PCR Analysen durchzuführen. In der Teilabbildung 14 (B) ist die Expression der Adenosinrezeptoren in frischen Endothelzellen dargestellt. Das Expressionsmuster der WT- und CD73-KO-Präparationen deckt sich mit dem Expressionsmuster der ganzen Aorta (vgl.4.1.7).

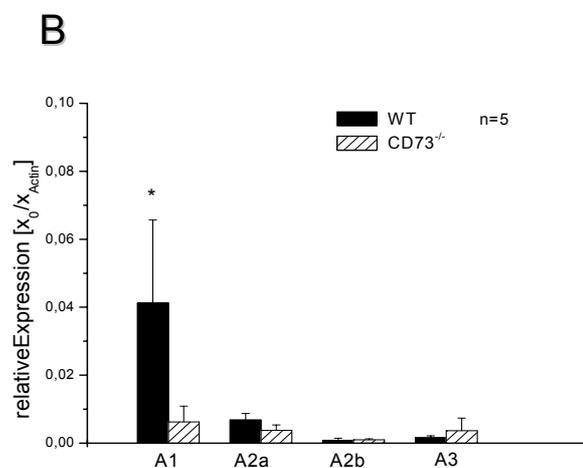
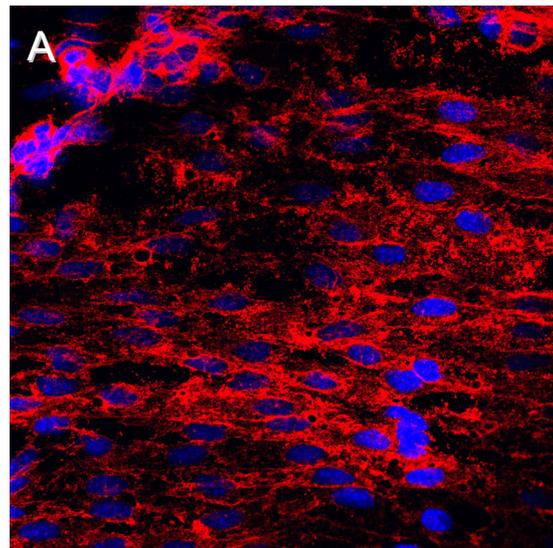


Abb.14: „*En Face*“-Präparat und Expression der Adenosinrezeptoren an frischen Aortenendothelzellen. (A) CD31-Nachweis (rot) an einer „*En Face*“- Präparation. Die Zellkerne sind mit DAPI angefärbt (blau). (B) Vergleichende Expression der Adenosinrezeptoren von WT und CD73^{-/-}-Endothelzellen.

4.2 Physiologische Veränderungen in der CD73^{-/-}-Mutante

4.2.1 Adenosin- und AMP-Dosis-Wirkungskurven an isoliert perfundierten Herzen

Isolierte Herzen von WT- und CD73-KO-Mäusen wurden im Langendorff-Modus bei einem konstanten Druck von 100 mm Hg perfundiert. Während bei WT-Tieren sich ein basaler Koronarfluss von $12,96 \pm 1,69 \text{ ml / min}^{-1} / \text{g}^{-1}$ einstellte, war im KO der basale Koronarfluss mit durchschnittlich $11,16 \pm 1,72 \text{ ml / min}^{-1} / \text{g}^{-1}$ signifikant niedriger.

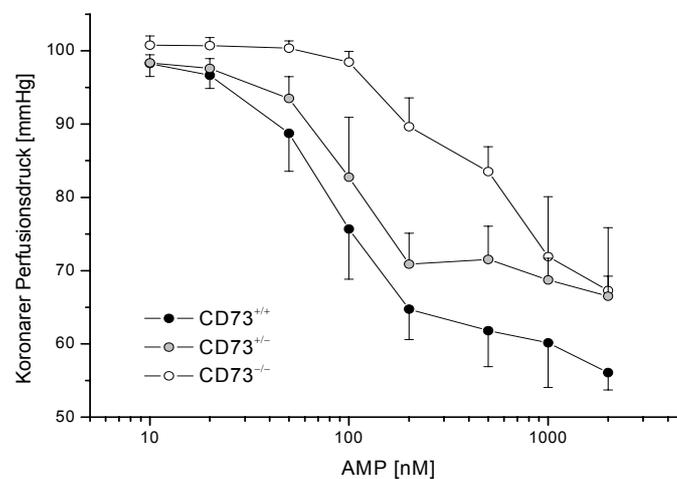


Abb.15: AMP-Dosis-Wirkungskurve an Langendorff-perfundierten isolierten Herzen von 12 Wochen alten WT und CD73^{-/-}-Mäusen. Der koronare Perfusionsdruck ist gegen die AMP-Konzentration aufgetragen. Im CD73^{-/-} kommt es zur Rechtsverschiebung der Kurve.

Dosiswirkungskurven wurden bei konstantem Fluss aufgenommen. Dazu wurde zunächst bei konstantem Druck perfundiert, bis sich ein stabiler basaler Fluss einstellte. Anschließend wurden bei konstantem Fluss Substanzen infundiert und Änderungen im Perfusionsdruck verfolgt. Zur Erstellung einer Adenosin-Dosis-Wirkungskurve wurde Adenosin in verschiedenen Konzentrationen (1-200 $\mu\text{mol/l}$), zur Erstellung einer AMP-Dosis-Wirkungskurve wurde AMP in verschiedenen Konzentrationen (5 nM-2 $\mu\text{mol/l}$) intrakoronar appliziert. Die Adenosin-Dosis-Wirkungskurven von WT und KO unterschieden sich nicht, wohingegen die AMP-Dosis-Wirkungskurve des KO deutlich nach rechts verschoben war. Die AMP-Dosis-Wirkungskurve von heterozygoten Tieren lag zwischen der WT- und der KO-Kurve (Abb.15). Der vasodilatorische Effekt des AMP basiert also auf dem AMP-Abbau zu Adenosin, der unter 4.1.4 beschrieben wurde.

4.2.2 Blutungszeit

Als Maß für die Blutgerinnung wurde die „tail bleeding time“ an 6 Wochen alten WT-, $CD73^{+/-}$ - und $CD73^{-/-}$ -Mäusen bestimmt. Um die Tiere zu genotypisieren wird normalerweise eine Schwanzspitzenbiopsie durchgeführt. Für den Versuch wurden 48 nicht biopsierte Tiere aus heterozygoten Zuchtgruppen ausgewählt, um ein mehrfaches Abschneiden der Schwanzspitze zu umgehen. Zur Bestimmung der Blutungszeit wurden 0,5 cm der Schwanzspitze entfernt. Diese wurde zur Genotypisierung benutzt.

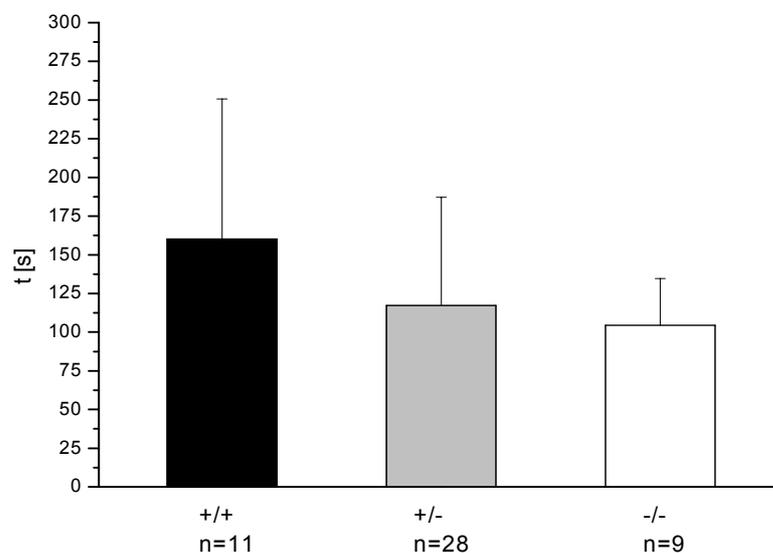


Abb.16: „Tail bleeding time“. Bei 48 Nachkommen aus einer heterozygoten Zuchtgruppe wurden die Blutungszeiten bestimmt. Homozygote $CD73^{-/-}$ -Mäuse zeigen eine tendenziell kürzere Blutungszeit als Wildtypmäuse.

Der Schwanz der Maus wurde sofort nach dem Abschneiden der Spitze in 37°C warme physiologische Kochsalzlösung gehalten. Die Zeit, bis die Blutung zum ersten Mal aufhört, wurde gestoppt. Für WT (n=11) wurde eine durchschnittliche Blutungszeit von 160 ± 90 s ermittelt. Für $CD73^{-/-}$ (n=9) lag die Blutungszeit mit durchschnittlich $104,4 \pm 30$ s deutlich niedriger und für heterozygote Tiere lag die Blutungszeit mit 117 ± 70 s zwischen den Werten für WT und KO. Aufgrund sehr hoher Standardabweichungen wurde kein Signifikanzniveau erreicht. Ein deutlicher Trend hin zu einer verkürzten Blutungszeit bei $CD73^{-/-}$ -Tieren ist jedoch erkennbar (Abb. 16).

4.3 Charakterisierung der ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} Doppelmutante

4.3.1 Arterioskleroseentwicklung unter Western Diät

Durch die Gabe fettreicher Diät lässt sich die Arterioskleroseentwicklung beschleunigen. Daher wurden jeweils 6 WT, ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Mäuse 3 Monate unter Western Diät (Sniff; Deutschland) gehalten. Begonnen wurde die Diät im Alter von 8 Wochen. Im Alter von 5 Monaten wurden die Tiere getötet.

Die frisch entnommenen Aorten wurden sauber frei präpariert und mit Öl Rot gefärbt, die Carotiden wurden für Histologische Untersuchungen in *OCT Freezing Medium* (Jung) eingebettet, zu einem späteren Zeitpunkt geschnitten und gefärbt.

Retroorbital entnommenes heparinisiertes Vollblut wurde 10 min bei 10.000 g zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma wurde direkt aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Anschließend wurden die Plasmaproben auf ihren Gehalt an IL-1 β, IL-10 und MCP-1 mittels ELISA (Endogen) untersucht.

Während IL-1β und IL-10 in der überwiegenden Zahl aller Proben nicht nachweisbar war, zeigten die Doppelmutanten gegenüber Wildtyp- und ApoE^{-/-}-Mäusen einen signifikanten Anstieg in der MCP-1-Plasmakonzentration (Abb. 17 A).

Weder an den Öl Rot gefärbten Aortenpräparaten, noch an den histologischen Schnitten wurden Unterschiede zwischen ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Mutante sichtbar.

Auf Grund dieser Daten wurde darauf verzichtet, weitere Tiere unter Western Diät zu halten. Parallel durchgeführte Arbeiten an normal gefütterten Mäusen zeigten deutliche Unterschiede in der Arterioskleroseentwicklung zwischen ApoE^{-/-}- und Doppelmutanten.

4.3.2 Cytokine und Chemokine in der Arterioskleroseentwicklung

Wie unter 4.3.1 beschrieben, konnte in 5 Monate alten Tieren nach 3 Monaten Western Diät ein signifikanter Anstieg der Plasma- MCP-1-Konzentration gemessen werden (Abb. 17 A).

Weitere Versuche wurden mit WT, CD73^{-/-}, ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Mäusen im Alter von 6 Monaten durchgeführt. Diese Tiere bekamen eine normale Diät.

Die MCP-1-Messung im Plasma dieser Tiere zeigte keinen Unterschied zwischen WT und CD73^{-/-} (Abb. 17 B). Die Werte liegen mit 90-110 pg/ml im selben Bereich wie die für WT und ApoE^{-/-} unter Western Diät ermittelten Werte. ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} unterscheiden sich zwar nicht signifikant voneinander, allerdings ist in diesen beiden Gruppen der MCP-1-Spiegel gegenüber WT und CD73^{-/-} signifikant erhöht (n=10; P<0,05).

ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} zeigen einen tendenziell höheren IL-6-Plasmalevel als WT und CD73^{-/-} (Abb. 17 C).

Die Messung von TNF-α im Plasma zeigte keine Unterschiede zwischen den vier untersuchten Gruppen (Abb. 17 D).

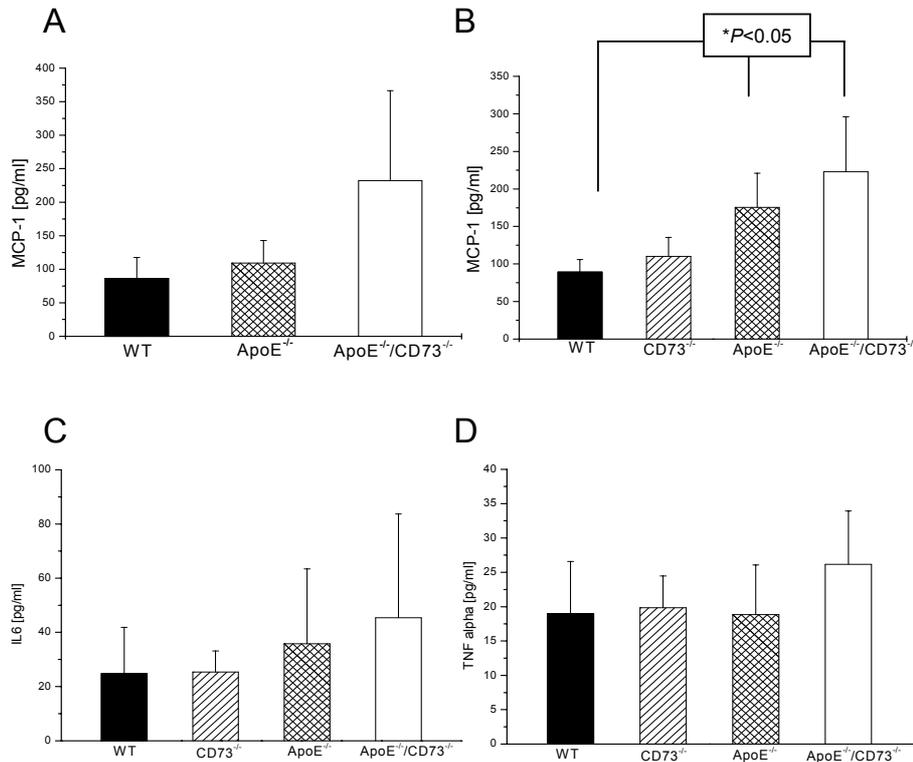


Abb.17: Cytokin- und Chemokinmessungen im Plasma (ELISA). (A) Analyse des MCP-1 -Plasmagehaltes in WT, ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} Mäusen nach 3 Monaten Western Diät (pro Gruppe n=6), (B) Analyse des MCP-1-Plasmagehaltes in WT, CD73^{-/-}, ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} Mäusen nach 6 Monaten (pro Gruppe n=10;*P<0.05); (C) Bestimmung des IL-6 –und (D) des TNF-alpha–Levels im Plasma (Pro Gruppe n=10).

4.3.3 Das quantitative Ausmaß der Arteriosklerose

Wie beispielhaft in Abbildung 18 A gezeigt, wurden Aorten und Carotiden aus 6 Monate alten WT (n=6), ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} Mäusen (n=8) präpariert und im Ganzen mit Öl Rot gefärbt, um arteriosklerotische Läsionen sichtbar zu machen.

Während im WT keine Läsionen sichtbar sind, lassen sich in den ApoE^{-/-}-Mäusen einige Läsionen erkennen. Diese treten bevorzugt an Stellen mit turbulenten Strömungsverhältnissen auf. Deutliche Plaques befinden sich im *Truncus brachiocephalicus*, sowie im Aortenbogen. Gelegentlich sind kleinere Abgänge der *Aorta descendens* betroffen. Die Doppelmutante zeigt

an nahezu allen Abgängen der *Aorta descendens* Läsionen, bzw. Plaques. Der Aortenbogen und der *Truncus brachiocephalicus* sind in einigen Fällen fast vollständig (>85%) mit Plaques bedeckt. Ebenso werden in den Carotiden Läsionen sichtbar. Vor allem an der Bifurcation kommt es zur Plaquebildung.

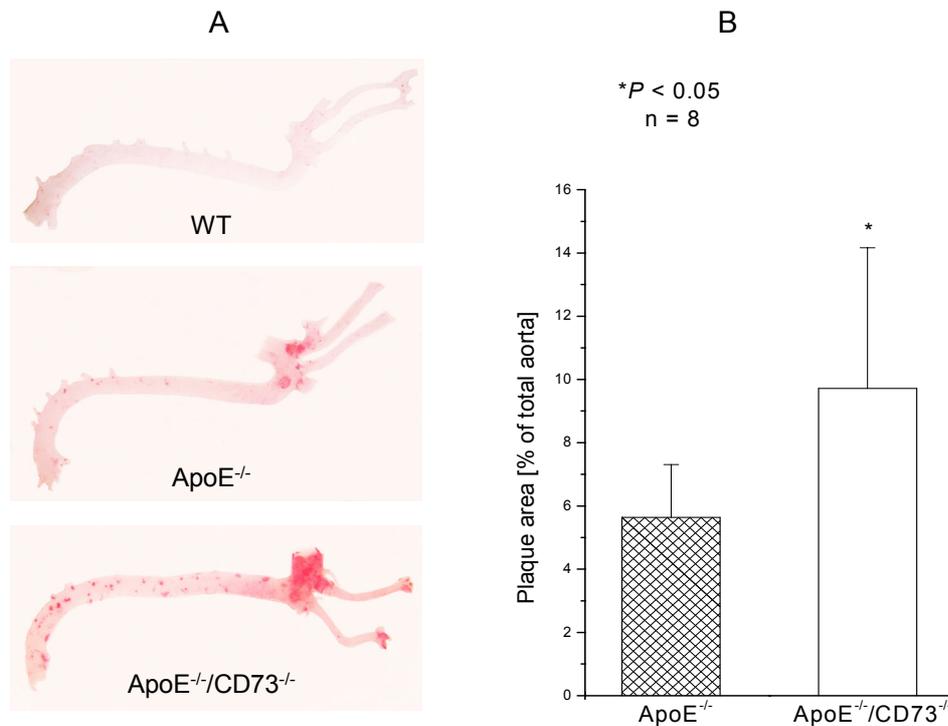


Abb.18: Öl-Rot-Färbung zur Quantifizierung arteriosklerotischer Läsionen in Aortenpräparaten von WT, ApoE^{-/-}, und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} Mäusen nach 6 Monaten. (A) Repräsentative Beispiele von Aortentotalpräparaten aller Gruppen; (B) Quantifizierung der Plaquefläche bezogen auf die Aortengesamtoberfläche an longitudinal geöffneten Präparaten von ApoE^{-/-}, und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} Mäusen (*P<0.05).

Zur Quantifizierung wurden die Aortenbögen und der kraniale Teil der *Aorta descendens* longitudinal geöffnet und mit Minutiennadeln auf Agarosegelpads befestigt. Die Präparate wurden mit einer Digitalkamera durch ein Stereomikroskop fotografiert. Mit *Scion Soft Image* und Photoshop 7.0 wurden die Flächen der rot gefärbten Areale und die Gesamtoberflächen der Gefäße bestimmt. Abbildung 18 B zeigt den prozentualen Anteil der Plaquearea bezogen auf die endotheliale Aortenoberfläche. Es wird deutlich, dass in der Doppelmutante fast die doppelte Fläche Läsionen, bzw. fortgeschrittene Plaques aufweist.

Gestützt werden diese Daten von Befunden an Querschnitten durch den Aortenursprung von 6 Monate alten ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Mäusen. Von 5 Tieren aus jeder Gruppe wurden je

5 Öl Rot-, oder Cholesteringefärbte Querschnitte (Abb.19) aus dem Bereich des Aortenursprungs am Olympus BX50- Mikroskop fotografiert. Die Auswertung mit AnalySIS B (Olympus) ergab pro Tier je über 5 Schnitte gemittelt eine Plaquearea von $0,137 \pm 0,035 \text{ mm}^2$ in $\text{ApoE}^{-/-}$ und $0,205 \pm 0,032 \text{ mm}^2$ ($P < 0,05$) in $\text{ApoE}^{-/-}/\text{CD73}^{-/-}$ -Tieren.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden 12 Monate alte Tiere beider Gruppen untersucht, wobei keine quantitativen Unterschiede in der Plaquefläche mehr festgestellt werden konnten.

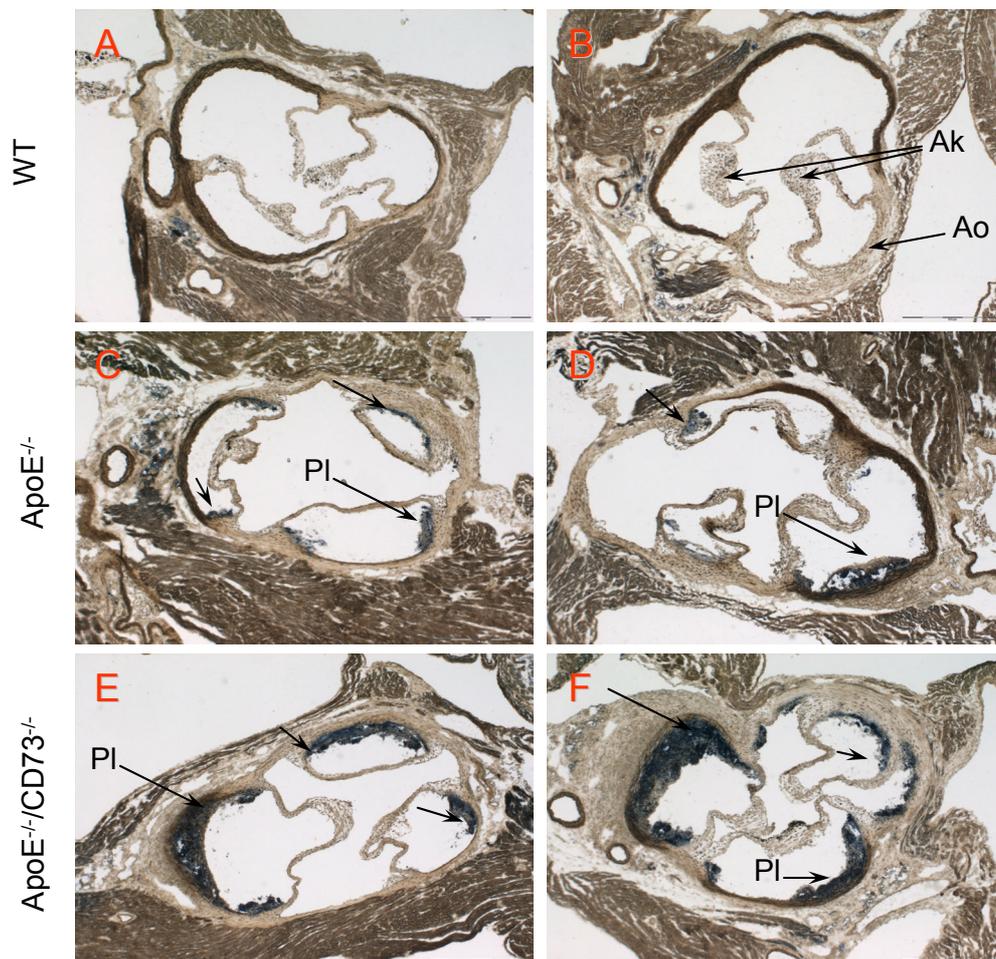


Abb19: Cholesterinfärbung nach Smith-Dietrich an Querschnitten durch den Aortenursprung von WT, $\text{ApoE}^{-/-}$ und $\text{ApoE}^{-/-}/\text{CD73}^{-/-}$ -Mäusen im Alter von 6 Monaten.(A,B) WT, (C,D) $\text{ApoE}^{-/-}$ und (E,F) $\text{ApoE}^{-/-}/\text{CD73}^{-/-}$.

Abkürzungen: Ao: Aorta, Ak: Aortenklappen, Pl: arteriosklerotischer Plaque

4.3.4 Plaquekomposition

Die Einlagerung von Fetten ist ein charakteristisches Merkmal bei der Bildung arteriosklerotischer Läsionen, bzw. Plaques. Um das Ausmaß eines Plaques zu bestimmen, werden daher Fette in histologischen Präparaten angefärbt. Abbildung 19 zeigt beispielhaft Querschnitte durch den Aortenursprung von WT, ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Mäusen.

Die Smith Dietrich Färbung lässt Cholesterin, aber auch Eisen und hämatogene Pigmente blau bis blau-schwarz erscheinen. An WT-Präparaten sind im Herzgewebe vereinzelt blau gefärbte Bereiche auszumachen (Abb. 19 A, B). Weder im Bereich des Aortenursprungs, noch in den der Aorta angrenzenden Gefäßen treten Cholesterinablagerungen auf. In Abbildung 19 C und D sind ApoE^{-/-}-Präparate gezeigt. In den von den Aortenklappen gebildeten Taschen erscheinen deutliche Cholesterinablagerungen. Im Vergleich dazu werden in den Aorten der Doppelmutante noch größere blau gefärbte Areale sichtbar (Abb. 19 E, F). Es handelt sich dabei um fortgeschrittene Plaques.

Dieser optische Eindruck konnte durch eine quantitative Auswertung der Plaqueflächen bestätigt werden (vgl. Abb. 18 B).

Neben Fetteinlagerungen wurden Bestandteile der extrazellulären Matrix in histologischen Präparaten nachgewiesen.

Mit Hilfe der Sirius Rot Färbung wurde zunächst Kollagen sichtbar gemacht. Lichtmikroskopisch betrachtet erscheint Kollagen in dieser Färbung leuchtend rot. Eine Betrachtung unter polarisierendem Licht ermöglicht es, das dicht gepackte Kollagen Typ I auszumachen. Dieses stellt sich ebenfalls rot dar. Kollagen Typ III hingegen erscheint unter polarisierendem Licht grünlich.

Abbildung 20 gibt einen Überblick über die Kollagenverteilung in ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Tieren nach 6 und nach 12 Monaten. Auffallend ist auch dabei, dass nach 6 Monaten die Doppelmutante größere Plaques aufweist als vergleichbare ApoE^{-/-}-Tiere. Außerdem erscheint das Kollagen in der Doppelmutante aufgelockerter (Abb. 20 A-D). Nach 12 Monaten ist in beiden Gruppen deutlich mehr Kollagen als nach 6 Monaten vorhanden. Es gibt aber keine Unterschiede mehr zwischen den beiden untersuchten Gruppen.

Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers (COL 2 3/4C) wurden Kollagen-Neoepitope, also frische Kollagenspaltprodukte detektiert (Abb. 21). Auch diese Färbung erscheint nach 6 Monaten stärker in den Plaques in der Doppelmutante, wohingegen nach 12 Monaten keine Unterschiede mehr festgestellt werden können.

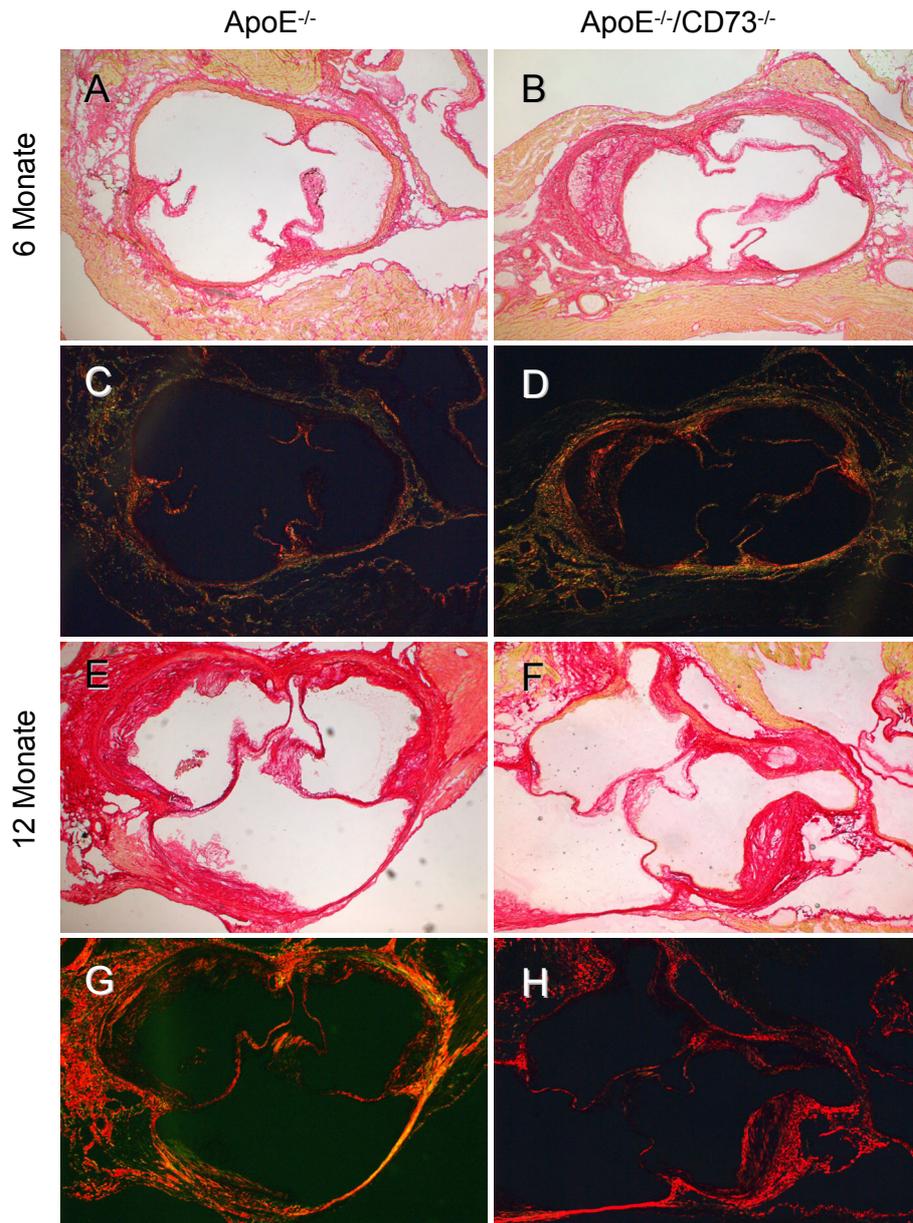


Abb.20: Sirius Rot Färbung zur Kollagendarstellung an Querschnitten durch den Aortenursprung von ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Mäusen. Lichtmikroskopische Aufnahmen (A, B, E, F) und Aufnahmen der gleichen Präparate unter polarisierendem Licht (C,D, G,H), um Kollagen I sichtbar zu machen. (A-D) zeigt Schnitte von 6 Monate alten Tieren, (E-H) zeigt Schnitte von 12 Monate alten Tieren.

Die Abbildung 22 zeigt einen immunhistologischen Hyaluronsäurenachweis. Statt eines Primärantikörpers wurden die Schnitte mit Hyaluronsäure-Bindeprotein inkubiert, mit Steptavidin markiert und mit DAB nachgewiesen.

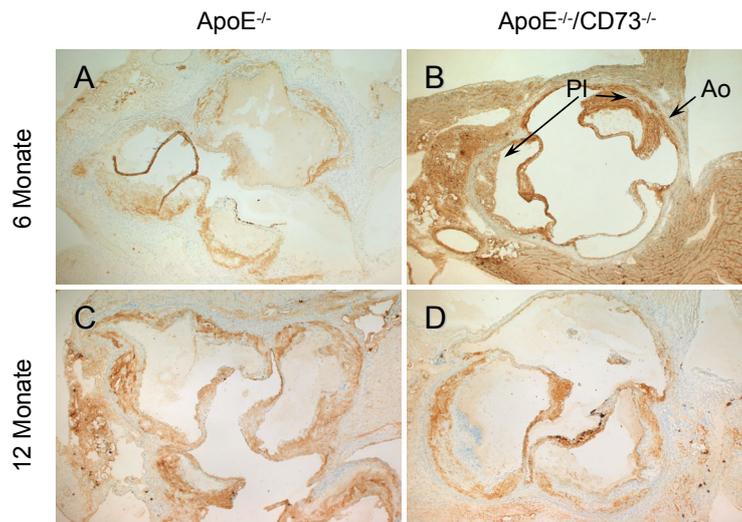


Abb.21: Nachweis von Kollagen-Neoepitopen an Schnitten durch den Aortenursprung. (A) ApoE^{-/-} nach 6 Monaten und (C) nach 12 Monaten; (B) ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} nach 6 und (D) nach 12 Monaten. Die Kollagen-Neoepitope erscheinen braun. Die stärkste Färbung tritt in den Plaques auf.

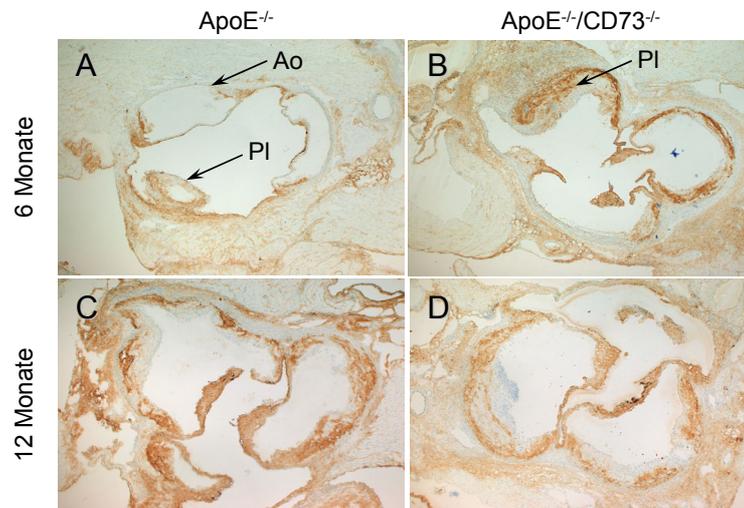


Abb.22: Hyaluronsäure-Nachweis an Schnitten durch den Aortenursprung. A) ApoE^{-/-} nach 6 Monaten und (C) nach 12 Monaten; (B) ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} nach 6 und (D) nach 12 Monaten. Hyaluronsäure erscheint braun gefärbt und ist überwiegend in den Plaques lokalisiert.

Abkürzungen: Ao: Aorta (Wand), PI: arteriosklerotischer Plaque

In allen untersuchten Tieren konnte Hyaluronsäure in den arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen werden. Unterschiede, soweit vorhanden, scheinen hier nur durch die Größe der einzelnen Plaques bedingt zu sein.

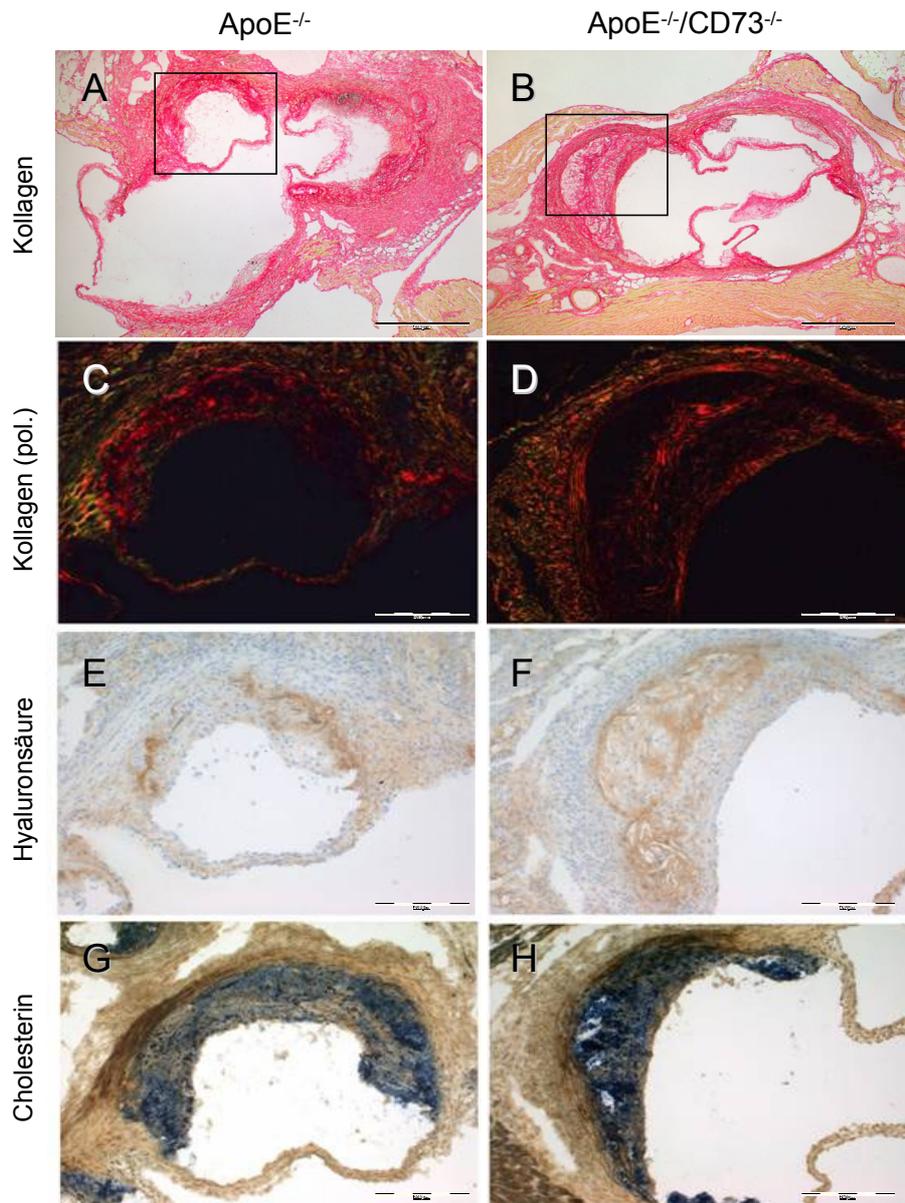


Abb.23: Plaque-Komposition in Querschnitten des Aortenursprungs von ApoE^{-/-} and ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} Mäusen. (A,B) Sirius Rot-Färbung zur Darstellung von Kollagen,(C,D) Ausschnittsvergrößerung unter polarisierendem Licht,(E,F) Immunhistologischer Nachweis von Hyaluronsäure und (G,H) Cholesterinfärbung nach Smith Dietrich an Folgeschnitten.

Abbildung 23 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der untersuchten nichtzellulären Plaquekomponenten. Je ein Plaque aus einer 6 Monate alten ApoE^{-/-}-Maus und aus einer 6 Monate alten ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Doppelmutante wird hier vergleichend gegenüber gestellt.

Die Teilabbildungen C und D zeigen vergrößert die ausgewählten Sirius Rot gefärbten Plaques unter polarisierendem Licht. Der Plaque der Doppelmutante zeigt aufgelockerte Strukturen und

besteht aus zwei Kammern. In den Teilabbildungen E und F sind Hyaluronsäurenachweise an Folgeschnitten gezeigt. Bedingt durch die unterschiedliche Plaquegröße können hier keine quantitativen Aussagen gemacht werden. Weitere Folgeschnitte wurden nach Smith Dietrich gefärbt (Abb. 23 G, H).

Es ist auffällig, dass Cholesterin und Hyaluronsäure in allen Fällen colokalisiert sind. Kollagen Typ I scheint jedoch da lokalisiert zu sein, wo kaum Cholesterin und Hyaluronsäure auftreten.

4.3.5 Adhäsionsmoleküle in arteriosklerotischen Plaques

An Schnitten durch den Aortenursprung wurde immunhistologisch die Expression von Adhäsionsmolekülen nachgewiesen. In allen Plaquebereichen konnten ICAM-1 und VCAM-1 gezeigt werden. E-Selektin und P-Selektin hingegen konnten in 6 Monate alten ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Tieren nur vereinzelt nachgewiesen werden. Erst an 12 Monate alten Tieren konnte eine deutliche Expression dieser Moleküle gezeigt werden.

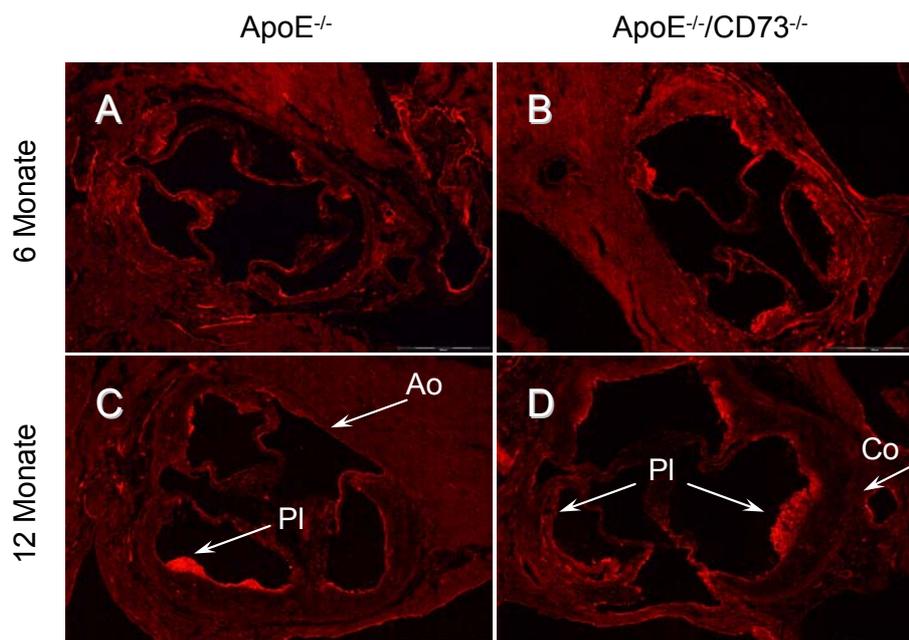


Abb.24: Nachweis von CD54 (ICAM-1) an Schnitten durch den Aortenursprung von ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Mäusen.(A) ApoE^{-/-} nach 6 Monaten und (C) nach 12 Monaten; (B) ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} nach 6 und (D) nach 12 Monaten.

Abkürzungen: Ao: Aorta (Gefäßwand), Co: Koronargefäß, Pl: arteriosklerotischer Plaque

Die ICAM-1- Expression (Abb. 24) erscheint schwach im Herzmuskelgewebe und stark in Gefäßwänden. Die luminalen Plaqueoberflächen weisen die stärkste Expression auf.

In älteren Tieren scheint die Expression stärker als in jüngeren Tieren zu sein. Vor allem in instabil erscheinenden Plaques treten starke Signale auf. Eine Thrombenbildung an diesen Punkten ist denkbar. Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen können anhand der immunhistologischen Färbung nicht ausgemacht werden.

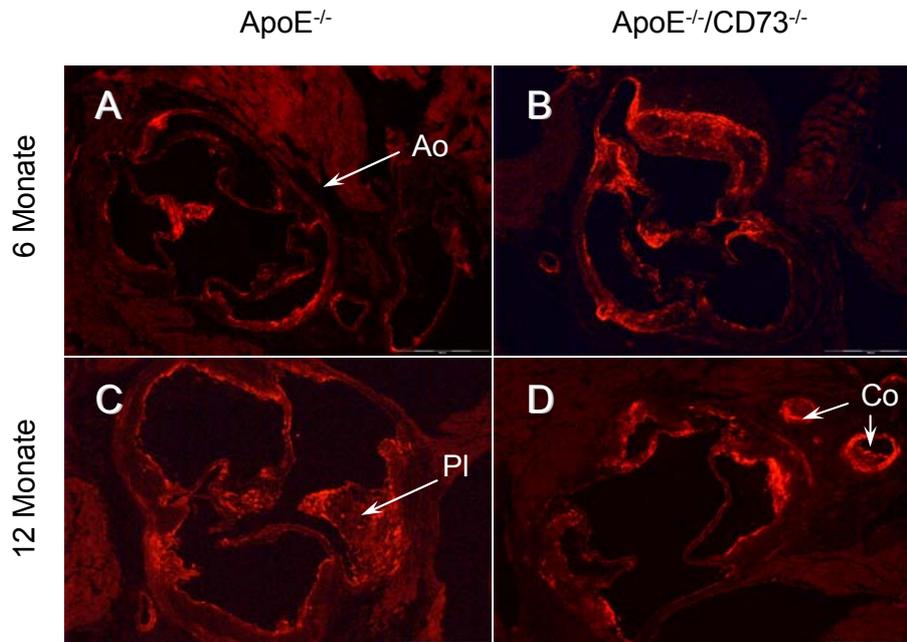


Abb.25: Nachweis von CD106 (VCAM-1) an Schnitten durch den Aortenursprung von ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Mäusen.(A) ApoE^{-/-} nach 6 Monaten und (C) nach 12 Monaten; (B) ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} nach 6 und (D) nach 12 Monaten.

Abkürzungen: Ao: Aorta (Gefäßwand), Co: Koronargefäß, Pl: arteriosklerotischer Plaque

VCAM-1 zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie ICAM-1, wobei die Expression nicht nur an der Plaqueoberfläche, sondern auch im Inneren der Plaques nachgewiesen werden kann (Abb. 25). In 6 Monate alten Doppelmutanten scheint VCAM-1 stärker als in vergleichbaren ApoE^{-/-}-Tieren exprimiert zu sein (Abb. 25 A und B). In 12 Monate alten Tieren können keine Unterschiede ausgemacht werden. Nicht nur in den Plaques in den von den Aortenklappen gebildeten Taschen, sondern auch in angrenzenden Koronargefäßen wird verstärkt VCAM-1 exprimiert. In den entsprechenden Koronargefäßen lässt sich eine deutliche Plaquebildung erkennen (Abb. 25 C und D).

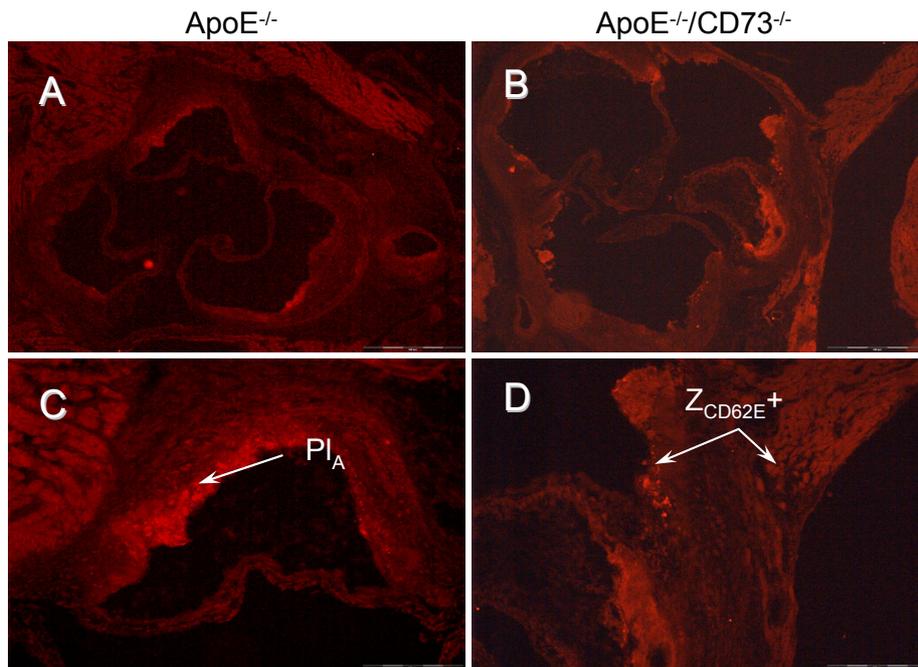


Abb.26: Nachweis von CD62E (E-Selektin) an Schnitten durch den Aortenursprung von ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Mäusen. (A) ApoE^{-/-} und (B) ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} nach 12 Monaten. (C) und (D) zeigt vergrößerte Ausschnitte (100fache Vergrößerung). Auch außerhalb des Plaques sind einige CD62E positive Zellen zu erkennen.

Abkürzungen: PI_A: Artiosklerotischer Plaque in der Aorta, Z_{CD62E+}: CD62E-positive Zellen.

E-Selektin konnte an 6 Monate alten Tieren unter Verwendung eines monoklonalen *rat-anti mouse* CD62E-Antikörpers nur sporadisch nachgewiesen werden. Die Abbildung 26 A und B zeigt entsprechend ausgewählte Schnitte von immunhistologischen Färbungen an 12 Monate alten Tieren. In den Teilabbildungen C und D sind vergrößerte Ausschnitte dargestellt. Auch bei den älteren Tieren lässt sich E-Selektin nicht in allen Plaques nachweisen. Einzelne E-Selektin positive Zellen sind außerhalb der Plaques lokalisiert.

P-Selektin war in 6 Monate alten Tieren mit einem polyklonalen *rabbit anti human* CD62P-Antikörper kaum nachzuweisen. An 12 Monate alten Tieren kann gelegentlich P-Selektin an der luminalen Plaqueoberfläche detektiert werden. Einzelne E-Selektin positive Zellen liegen hinter der Gefäßwand im Myokardgewebe (Abb. 27 C).

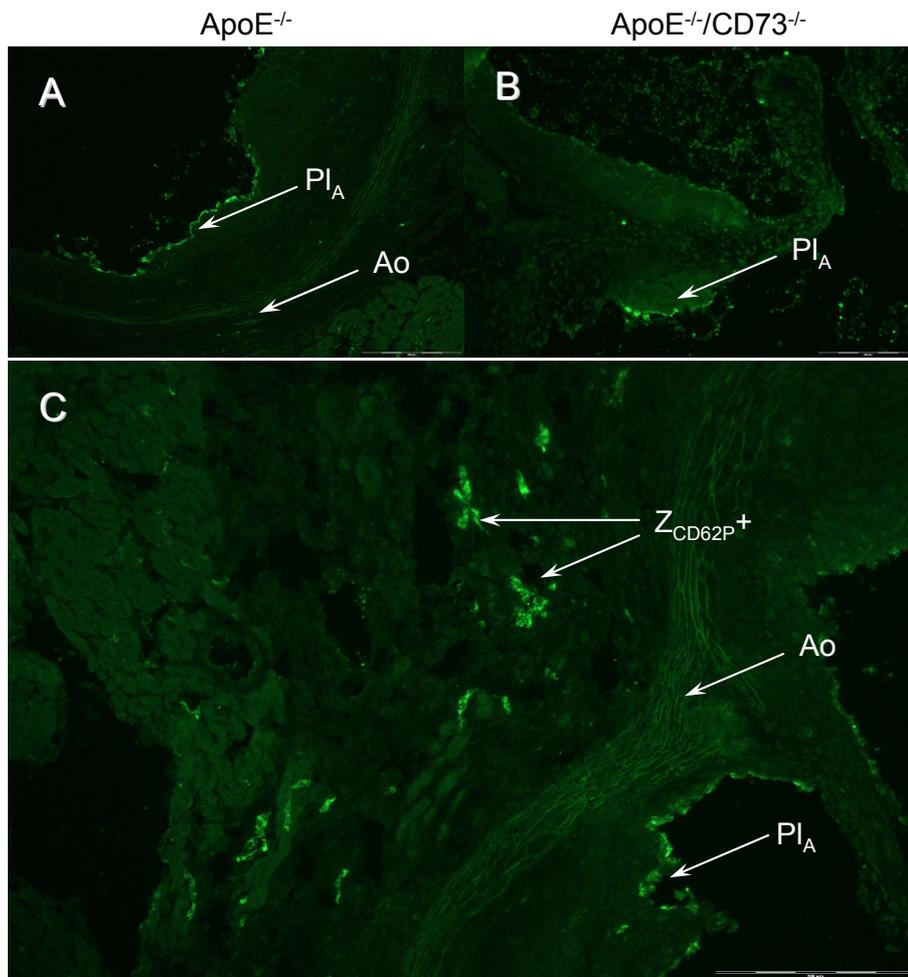


Abb.27: Nachweis von CD62P (P-Selektin) an Schnitten durch den Aortenursprung von ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Mäusen. (A) ApoE^{-/-} und (B) ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} nach 12 Monaten. (C) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt (100fache Vergrößerung). Hier lassen sich einzelne P-Selektin positive Zellen erkennen.

Abkürzungen: Ao: Aorta (Gefäßwand), Pl_A: arteriosklerotischer Plaque in der Aorta, Z_{CD62P}⁺: CD62P-positive Zellen.

4.3.6 Zellen in arteriosklerotischen Plaques

Mit einer immunhistologischen CD31/smAktin Doppelfärbung konnten Endothel- und glatte Muskelzellen nachgewiesen werden. Im gesunden Gefäß sind das die vorkommenden Zellpopulationen. Im Verlauf der Arterioskleroseentwicklung werden Fette in der Gefäßwand abgelagert, die von Makrophagen aufgenommen werden. Somit entstehen Schaumzellen. Auch T-Zellen sind an der Plaquebildung beteiligt. Die luminalen Plaqueoberflächen sind anschließend von Endothelzellen bedeckt. Darunter liegen in den Plaques eingewanderte glatte Muskelzellen (Abb. 27). Am Rand des in Abbildung 28 gezeigten Plaques fallen einige CD31-positive Zellen auf. Sie sind in der Abbildung mit Pfeilen markiert. Da sich diese Zellen von den ebenfalls rot markierten Endothelzellen abheben, kann es sich z.B. um eine CD31-positive

T-Zellsubpopulation handeln. Im Plaque können T-Zellen, Monozyten und Makrophagen unterschieden werden.

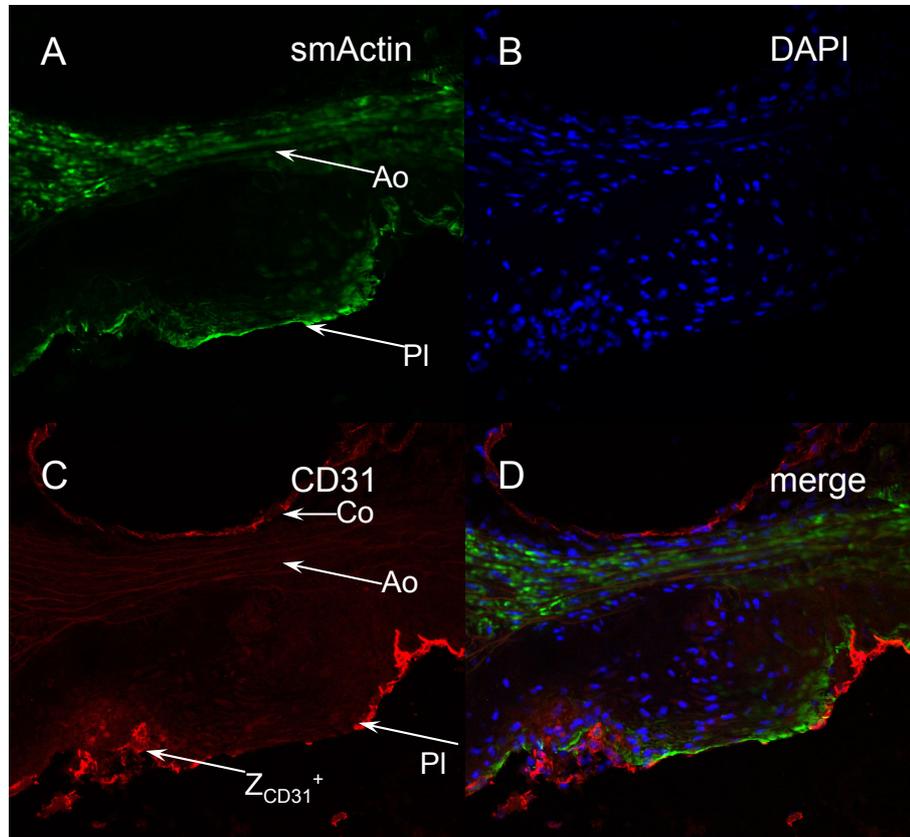


Abb.28: smAktin/CD31-Doppelfärbung am Schnittpräparat durch den Aortenursprung einer ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Maus nach 12 Monaten. Konfokalmikroskopische Aufnahmen: smAktin (grün), CD31 (rot). Zellkerne wurden DAPI-gefärbt (blau).

Abkürzungen: Ao: Aorta (Gefäßwand), Co: angrenzendes Koronargefäß, PI: arteriosklerotischer Plaque, Z_{CD31+}: einzelne CD31 positive Zellen

Zum Nachweis von T-Zellen in histologischen Präparaten wurden *rabbit anti mouse* CD3 und *rat anti mouse* CD4 Primärantikörper und FITC-, bzw. Rhodamin- gekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI markiert. Sowohl in Schnitten von ApoE^{-/-}, als auch in Schnitten von ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Tieren konnten konfokalmikroskopisch einzelne CD4-positive Zellen nachgewiesen werden (Abb. 29). Quantitative Unterschiede zwischen den beiden Gruppen konnten weder nach 6, noch nach 12 Monaten festgestellt werden.

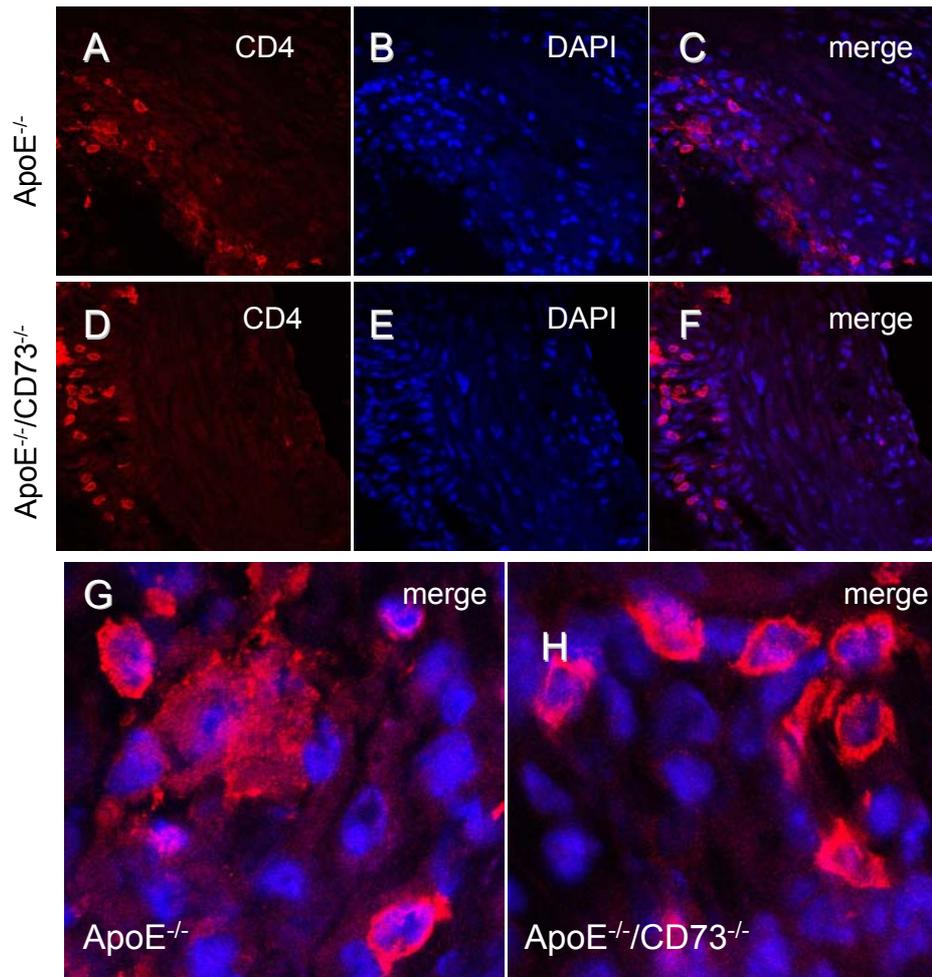


Abb.29: Detektion von CD4⁺-T-Zellen in Schnittpräparaten durch den Aortenursprung von ApoE^{-/-}-und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Mäusen nach 6 Monaten. Konfokale Ausschnittsvergrößerungen mit DAPI-gefärbten Zellkernen. (A,D) CD4-positive Zellen, (B, E) DAPI gefärbte Zellkerne, (C, F) Overlay, (G, H) Overlay vergrößert.

Eine Doppelfärbung mit dem anti-CD3 und dem anti-CD4 Antikörper zeigt, dass die meisten CD3 positiven grün gefärbten Zellen auch CD4-positiv und hier rot gefärbt sind. Im Overlay erscheinen diese Zellen gelb. Bei den CD4-positiven T-Zellen handelt es sich um die größte T-Zellsubpopulation im arteriosklerotischen Plaque (Abb. 30).

Mit einem monoklonalen *rat anti mouse* CD11b (MAC-1) Primärantikörper und einem Rhodamin gekoppelten Sekundärantikörper wurden Monozyten und Makrophagen in Schnitten durch den Aortenursprung dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Die Abbildungen 31 A und 31 B zeigen Übersichtsaufnahmen (40fach vergrößert)

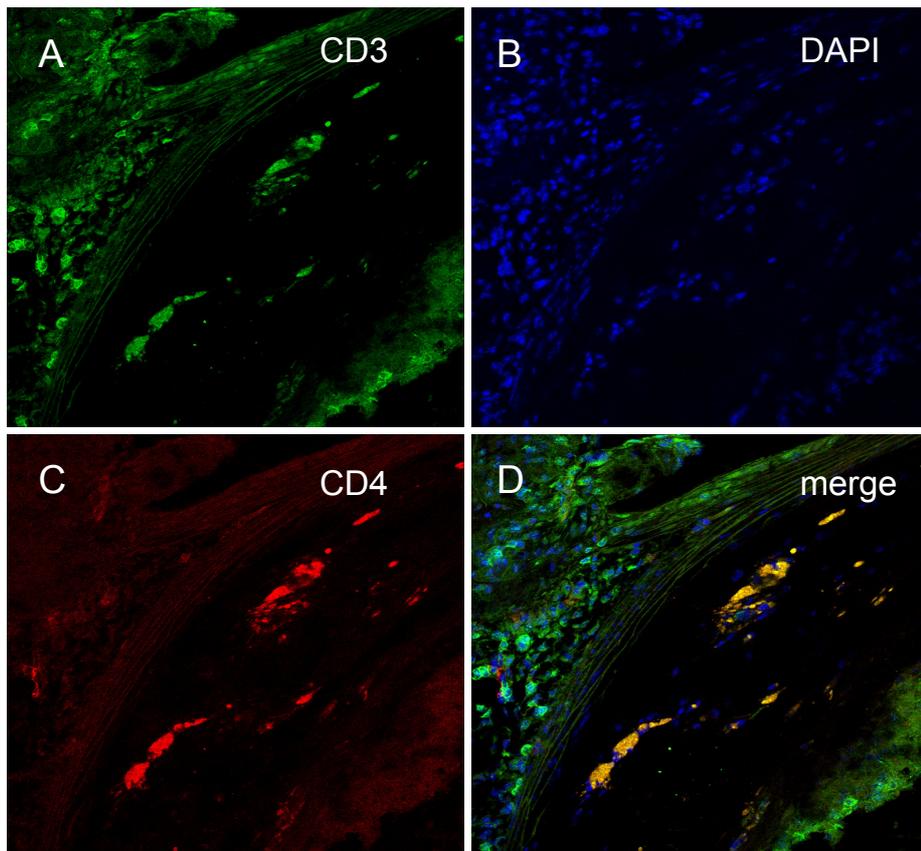


Abb.30: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von T-Zellen im arteriosklerotischen Plaque einer ApoE^{-/-}-Maus. (A) CD3-positive Zellen (grün), (B) DAPI gefärbte Zellkerne (blau), (C) CD4-positive Zellen (rot), (D) Overlay. Der überwiegende Teil der detektierten T-Zellen gehört zur CD4⁺-Subpopulation.

repräsentativer Präparate von ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Tieren nach 6 Monaten. In den Teilabbildungen 31 C-F sind confokalmikroskopische Ausschnittsvergrößerungen gezeigt.

Der Vergleich der Präparate zeigt, dass in der Doppelmutante mehr Monozyten und Makrophagen in die Plaques eingewandert sind. Auch in den umliegenden Geweben können mehr Monozyten und Makrophagen detektiert werden. Dieser Unterschied zwischen ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} lässt sich jedoch nur bei 6 Monate alten Tieren feststellen. Untersucht man Tiere nach 12 Monaten, so sind alle Plaques im gleichen Ausmaß von Makrophagen befallen.

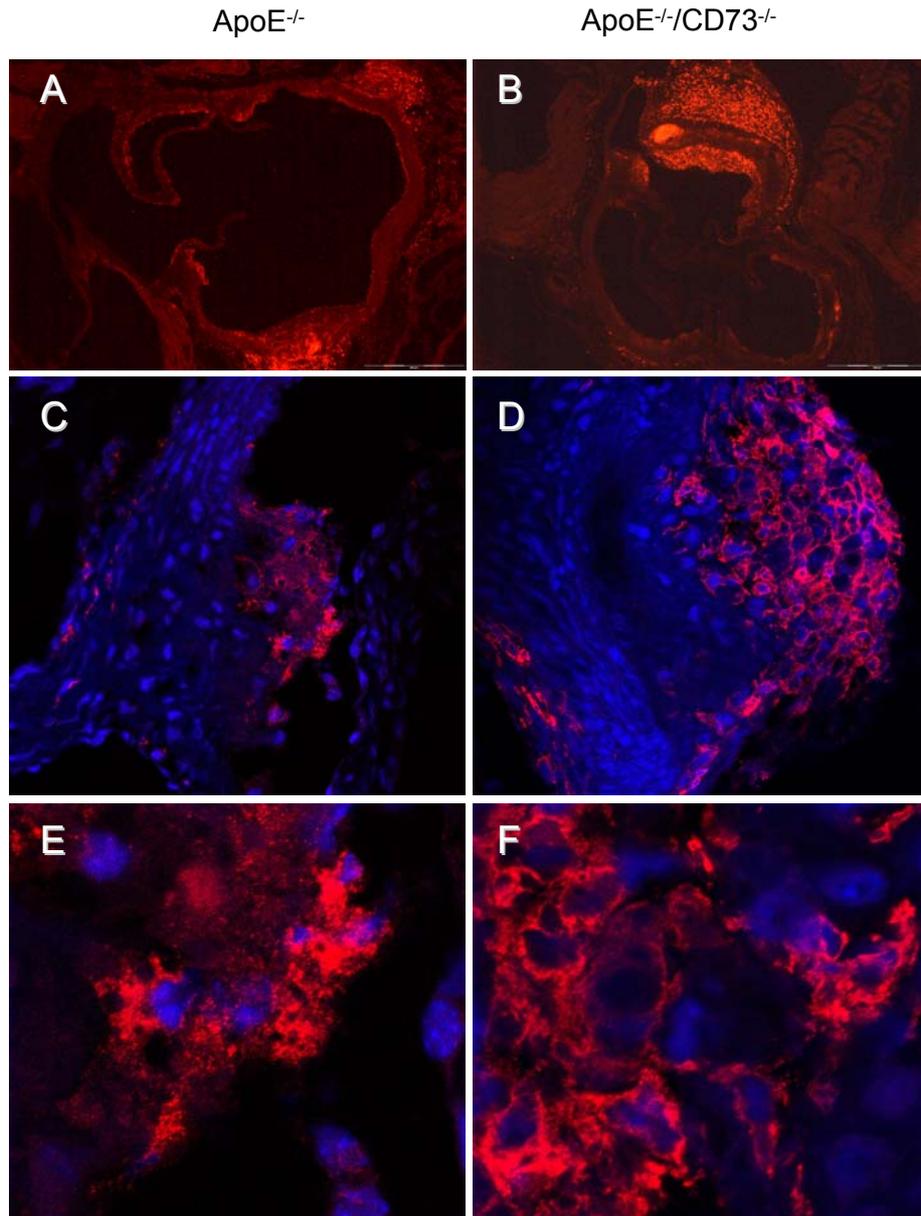


Abb.31: Detektion von Monozyten und Makrophagen in Schnittpräparaten durch den Aortenursprung von ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} Mäusen nach 6 Monaten. Immunhistologischer Nachweis mit einem CD11b-Antikörper. (A,B) Übersicht, (C-F) Konfokale Ausschnittsvergrößerungen mit DAPI-gefärbten Zellkernen.

4.3.7 CD73-Aktivität und Expression in der Arteriosklerose

Wie unter 3.12 beschrieben, wurde ein AMPase-Aktivitätsassay an Gewebeschnitten durchgeführt. Durch Inkubation der Präparate mit 5 mM Levamisol, einem spezifischen APL-Inhibitor kann statt der Gesamt-AMPase-Aktivität die spezifische CD73-Aktivität dargestellt werden.

In Abbildung 32 sind Aortenquerschnitte von 6 Monate alten WT, ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Tieren gezeigt. Der Aktivitäts-Assay wurde unter Verwendung von Levamisol durchgeführt.

In der Doppelmutante lässt sich keine Aktivität nachweisen, wohingegen im WT und ApoE^{-/-} im Bereich des Endothels braune Niederschläge erkennbar sind. In Abbildung 32 B wird jedoch auch deutlich, dass es im Bereich eines Aortenabgangs, in dem sich bereits arteriosklerotische Läsionen befinden, zu einer starken CD73-Aktivität kommt.

Parallel zum Aktivitätsnachweis wurden Schnitte aus diesen Tieren mit einem *rat-anti mouse-CD73*-Antikörper inkubiert (Abb. 32 D-F). Zur Detektion wurde ein *FITC*-gekoppelter Sekundärantikörper benutzt.

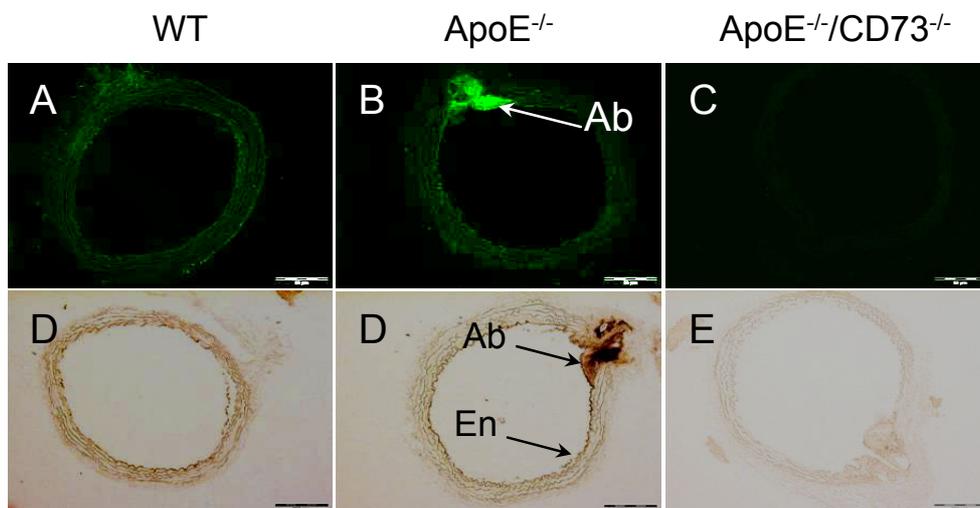


Abb.32: Nachweis der CD73-Expression (A,B,C) und Aktivität (D,E,F) an Aortenquerschnitten von WT, ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Mäusen nach 6 Monaten.

Abkürzungen: Ab: Aortenabgang, En: Endothel

Der immunhistologische CD73-Nachweis korreliert mit den Daten aus dem Aktivitäts-Assay.

In Abbildung 33 werden Aktivitäts-Assay und Immunhistologischer CD73-Nachweis an Schnittpräparaten durch den Aortenursprung gezeigt. In der Immunhistologie wurde zur Detektion diesmal ein Rhodamin-gekoppelter Sekundärantikörper benutzt.

Die CD73-Aktivitäts-Daten für 6 Monate alte Tiere decken sich mit den Befunden, die an Aortenquerschnitts-Präparaten gewonnen wurden. Bei ApoE^{-/-}-Mäusen kommt es zur verstärkten Aktivität der CD73 im Bereich arteriosklerotischer Plaques.

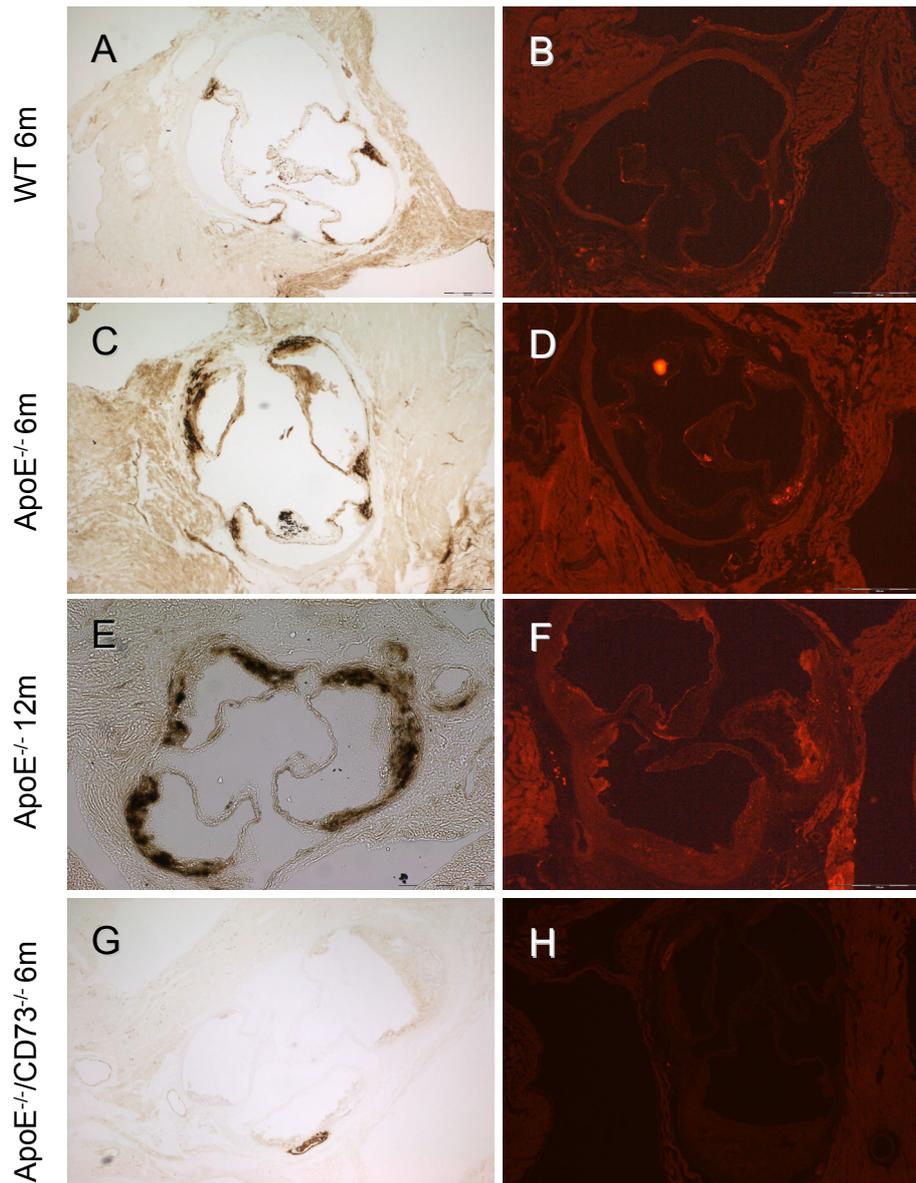


Abb.33: Nachweis der CD73-Aktivität (A,C,E,G) und –Expression (B,D,F,H) an Schnitten durch den Aortenursprung von WT, ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Mäusen nach 6, bzw. nach 12 Monaten (E,F).

Zusätzlich wurden 12 Monate alte ApoE^{-/-}-Mäuse untersucht. Dabei zeigte sich, dass im weiteren Verlauf der Arteriosklerose die CD73-Aktivität noch stärker zunimmt (Abb. 33 E).

Die immunhistologischen Färbungen hingegen zeigen in den Plaques nur schwache Signale.

Erst durch konfokalmikroskopische Aufnahmen konnten in ApoE^{-/-}-Mäusen einzelne CD73-positive Zellen ausgemacht werden.

Wie in Abbildung 34 gezeigt, befinden sich diese Zellen in den arteriosklerotischen Plaques.

Die Präparate wurden zusätzlich mit einem anti-*smAktin*-Antikörper inkubiert. Zur Detektion wurde ein FITC gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt. Außerdem wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. In den Präparaten erscheinen die Kerne blau, die Muskelzellen grün und die CD73-positiven Zellen rot.

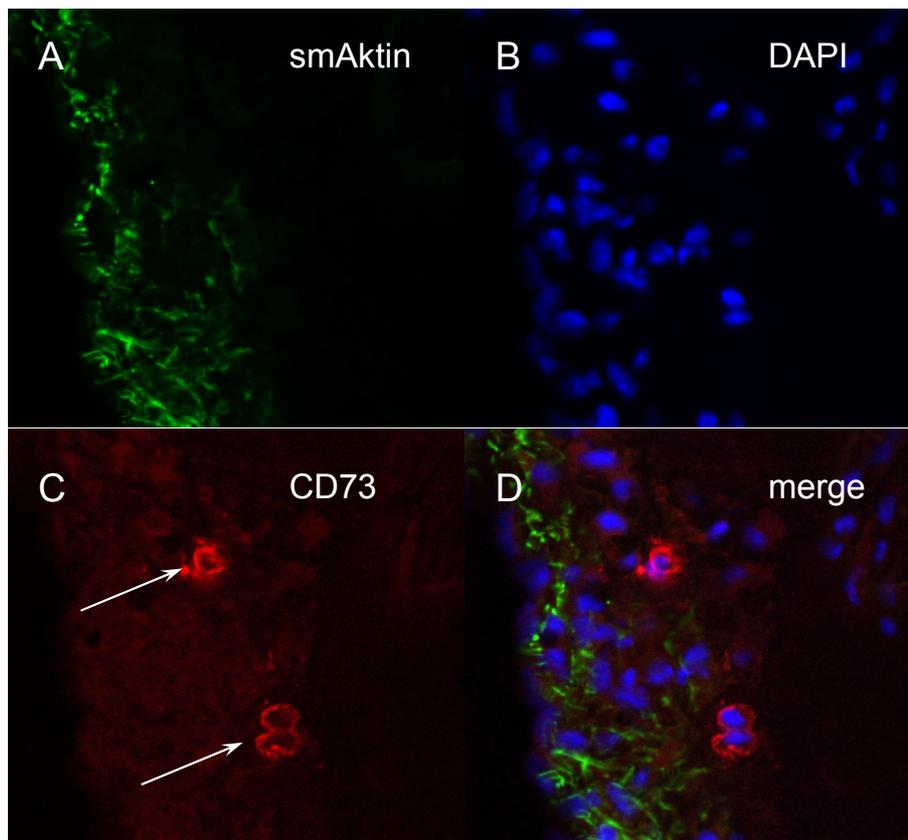


Abb.34: Konfokalmikroskopische Aufnahmen einer *smAktin*(grün) /*CD73*(rot) Doppelfärbung am Schnittpräparat durch den Aortenursprung einer *ApoE*^{-/-}-Maus nach 12 Monaten. Zellkerne wurden DAPI-gefärbt (blau). Einzelne *CD73*-positive Zellen sind mit Pfeilen markiert.

In einem weiteren Ansatz wurde eine *CD3/CD73*-Doppelfärbung durchgeführt. Zur Detektion von *CD3* wurde ein FITC-gekoppelter Sekundärantikörper und zur Detektion von *CD73* wurde ein Rhodamin-gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt. *CD3*-positive Zellen erscheinen daher grün, *CD73*-positive Zellen rot. Doppelt positive Zellen erscheinen gelb im Overlay. Die Zellkerne wurden auch hier mit DAPI angefärbt.

Es konnte gezeigt werden, dass viele der *CD73*-positiven Zellen in den arteriosklerotischen Plaques auch *CD3*-positiv sind. Somit handelt es sich also vermutlich um T-Zellen. In der Abbildungen 35 sind entsprechende Präparate in unterschiedlichen Vergrößerungen dargestellt.

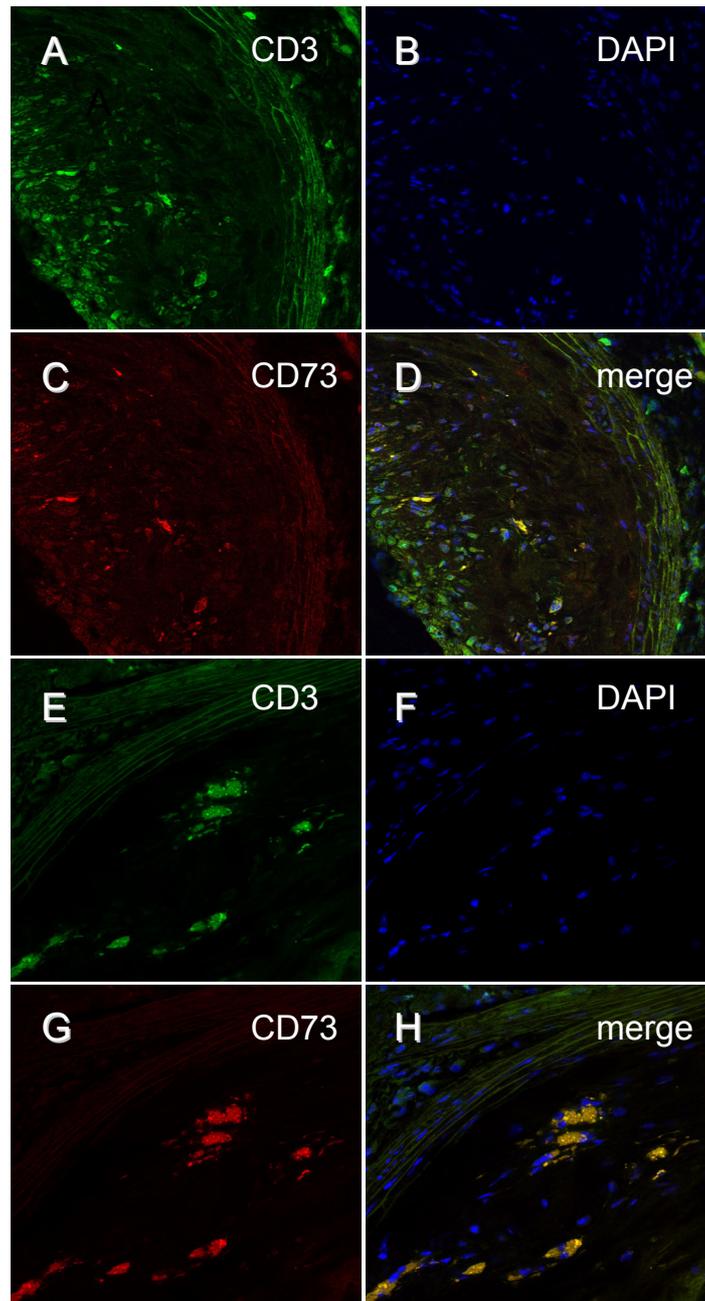


Abb.35: Vergrößerte Konfokalmikroskopische Aufnahmen einer CD3/CD73-Doppelfärbung in einem arteriosklerotischen Plaque einer ApoE^{-/-}-Maus. (A) CD3-positive Zellen (grün), (B) DAPI gefärbte Zellkerne (blau), (C) CD73-positive Zellen (rot), (D) Overlay. Bei den CD73 positiven Zellen handelt es sich zugleich um CD3 positive Zellen.

4.3.8 Fortgeschrittene Arteriosklerose an 12 Monate alten Tieren

Bei den Betrachtungen zur Plaquezusammensetzung fiel immer wieder auf, dass sowohl ApoE^{-/-}, als auch ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Doppelmutanten im Alter von 12 Monaten ausgedehnte Plaques in der Aorta aufweisen. Quantitative Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in

der Ausdehnung der Plaques, der Expression von Adhäsionsmolekülen oder dem Auftreten von Entzündungszellen konnten nicht beobachtet werden.

Im Vergleich der 12 Monate alten Tiere mit 6 Monate alten Tieren fallen neben größeren Plaques einige Besonderheiten auf. Bei fast allen alten Tieren waren nach 12 Monaten neben der Aorta auch angrenzende Koronargefäße mit Plaques befallen.

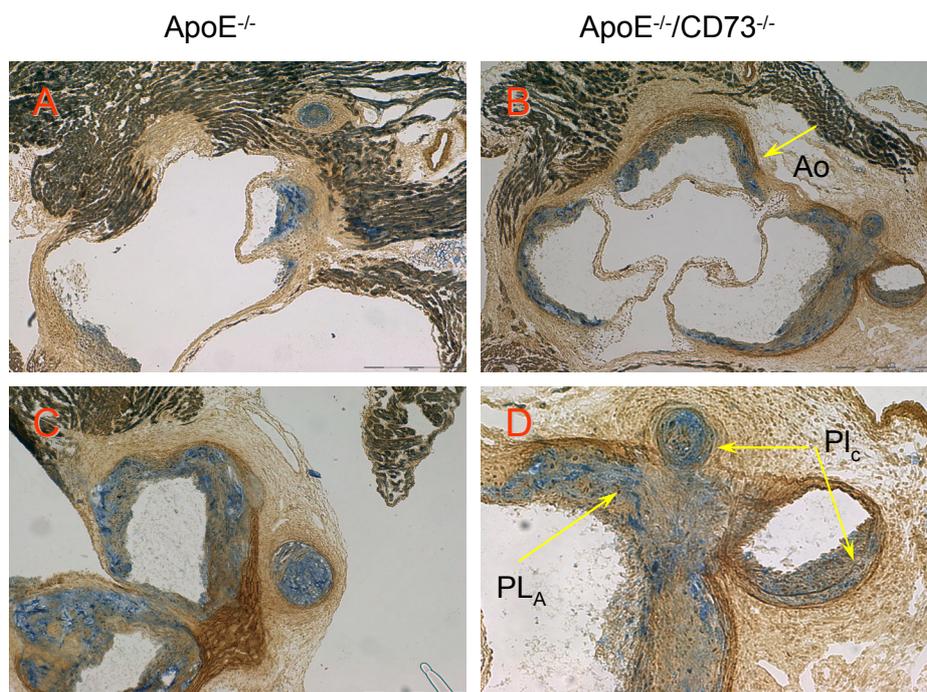


Abb.36: Cholesterinfärbung nach Smith Dietrich an Querschnitten durch den Aortenursprung von ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Mäusen im Alter von 12 Monaten.(A,C) ApoE^{-/-}, (B,D) ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}. Sowohl bei ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} als auch bei ApoE^{-/-} sind zu diesem Zeitpunkt die Koronargefäße von Arteriosklerose befallen.

Abkürzungen: Ao: Aorta, PL_A: arteriosklerotischer Plaque in der Aorta, PL_C: arteriosklerotischer Plaque im Koronargefäß

An Smith Dietrich gefärbten Querschnitten durch den Aortenursprung lassen sich die betroffenen Koronargefäße besonders gut erkennen (Abb. 36).

Die Plaques in den Koronargefäßen ähneln den Plaques im Aortenursprung. Auch hier lassen sich Monozyten, Makrophagen (Abb. 37 A) und CD4⁺ T-Zellen (Abb. 37 C) identifizieren.

Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 werden verstärkt exprimiert (Abb. 37 E-F).

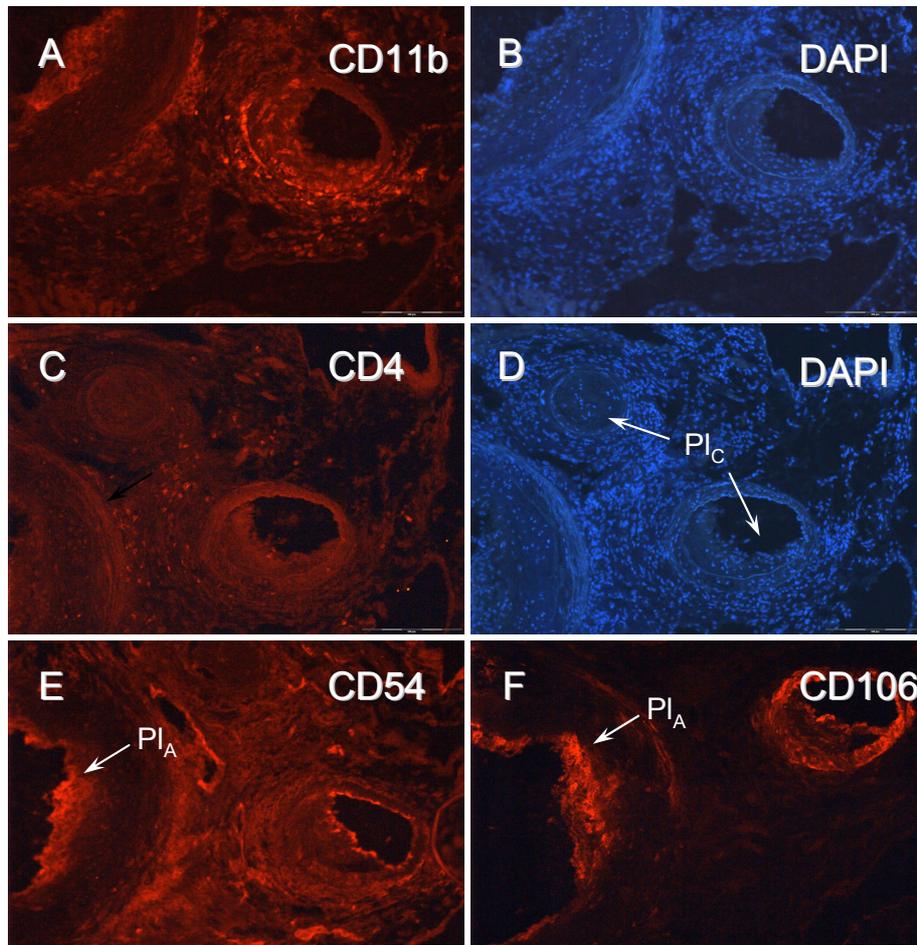


Abb.37: Querschnitte durch den Aortenursprung einer ApoE^{-/-}-Maus nach 12 Monaten. Wie in den arteriosklerotischen Plaques im Aortenbogen sind auch angrenzende Gefäße mit Plaques befallen. In Abbildung (A) sind Monozyten und Makrophagen, in (C) sind CD4⁺-T-Zellen gefärbt. (B) und (D) zeigt die dazugehörigen DAPI gefärbten Zellkerne. Auch Adhäsionsmoleküle werden nun verstärkt in den der Aorta angrenzenden Gefäßen exprimiert. (E) zeigt die ICAM-1- und (F) zeigt die VCAM-1-Expression.

Abkürzungen: Pl_A: arteriosklerotischer Plaque in der Aorta, Pl_C: arteriosklerotischer Plaque im Koronargefäß.

Bei den entnommenen Herzen von 12 Monate alten Tieren wurden einige Veränderungen beobachtet. Bei einem ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Tier wurde ein Vorderwandinfarkt festgestellt, der sich von der Herzspitze bis zur Höhe der Herzohren erstreckte. Die Herzen von drei weiteren Doppelmutanten zeigten etwas unterhalb der Herzohren kleinere helle Stellen an der Gewebeoberfläche. Bei all diesen Tieren war außerdem der rechte Vorhof stark vergrößert und mit z.T. Blut gefüllt.

Die entnommenen Herzen der ApoE^{-/-} Tiere erschienen äußerlich unauffällig.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden die Herzen der vier auffälligen Doppelmутanten und die Herzen von vier ApoE^{-/-}-Tieren eingebettet und geschnitten. Von allen Tieren wurden Herzquerschnitte Öl Rot bzw. Masson Trichrom gefärbt.

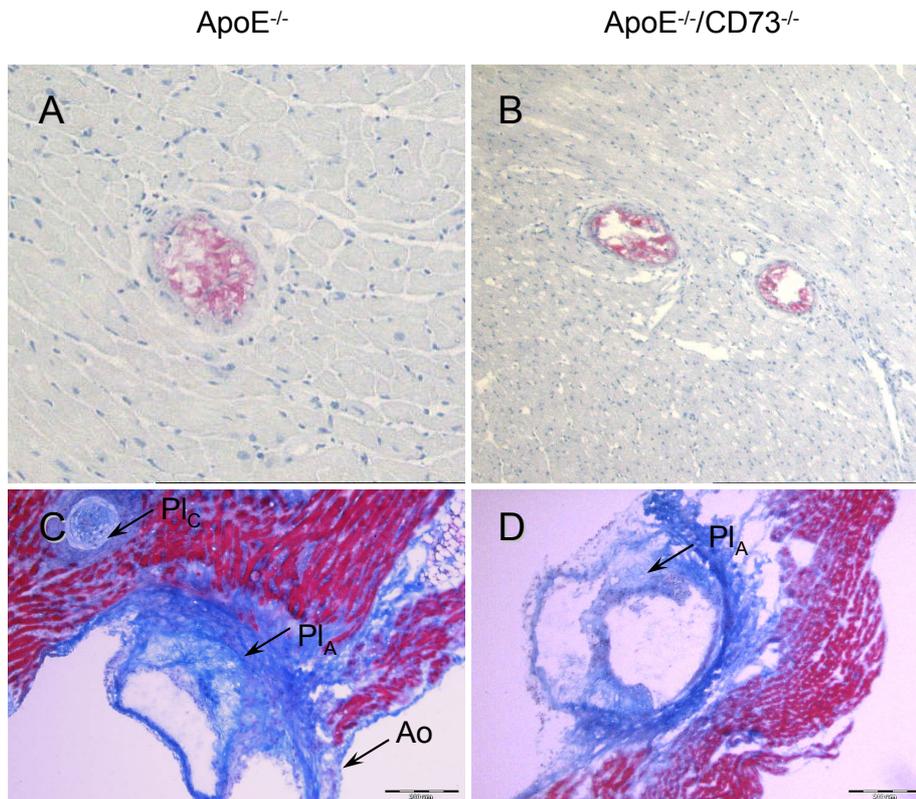


Abb.38: Öl Rot gefärbte Querschnitte durch das Herz von (A) einer ApoE^{-/-}- und (B) einer ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Maus. Masson Trichrom gefärbte Querschnitte durch das Herzen von (C) einer ApoE^{-/-} und (D) einer ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Maus nach 12 Monaten. Sowohl bei ApoE^{-/-}-, als auch bei ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Tieren weisen im Herzen in der inneren Wand des linken Ventrikels einzelne Gefäße arteriosklerotische Läsionen auf. Auf Höhe des Aortenursprungs lassen sich betroffene Koronargefäße ausmachen (C). Vor allem in den Doppelmутanten erscheinen die arteriosklerotischen Plaques in der Aorta inhomogen und löchrig (D).

Abkürzungen: Ao: Aorta (Gefäßwand), Pl_A: arteriosklerotischer Plaque in der Aorta, Pl_C: arteriosklerotischer Plaque im Koronargefäß.

Die Öl Rot Färbungen offenbarten, dass sowohl bei Doppelmутanten, als auch bei ApoE^{-/-}-Tieren in der inneren Wand des linken Ventrikels kleinere Blutgefäße mit arteriosklerotischen Plaques befallen sind (Abb. 38 A-B). Die Masson Trichromfärbung im Bereich des Aortenursprungs zeigt, wie zuvor beschrieben, befallene Koronargefäße. Im Herzmuskelgewebe lassen sich blau gefärbte bindegewebsartige Einlagerungen zwischen den Muskelzellen

erkennen (Abb. 38 C-D). Die Plaques in den Aorten sind zwar gleich groß, allerdings erscheinen in der Doppelmutante die meisten Plaques aufgelockert und nekrotisch (Abb. 38 D). Plaqueinstabilität und Ausbildung von Thromben ist möglich.

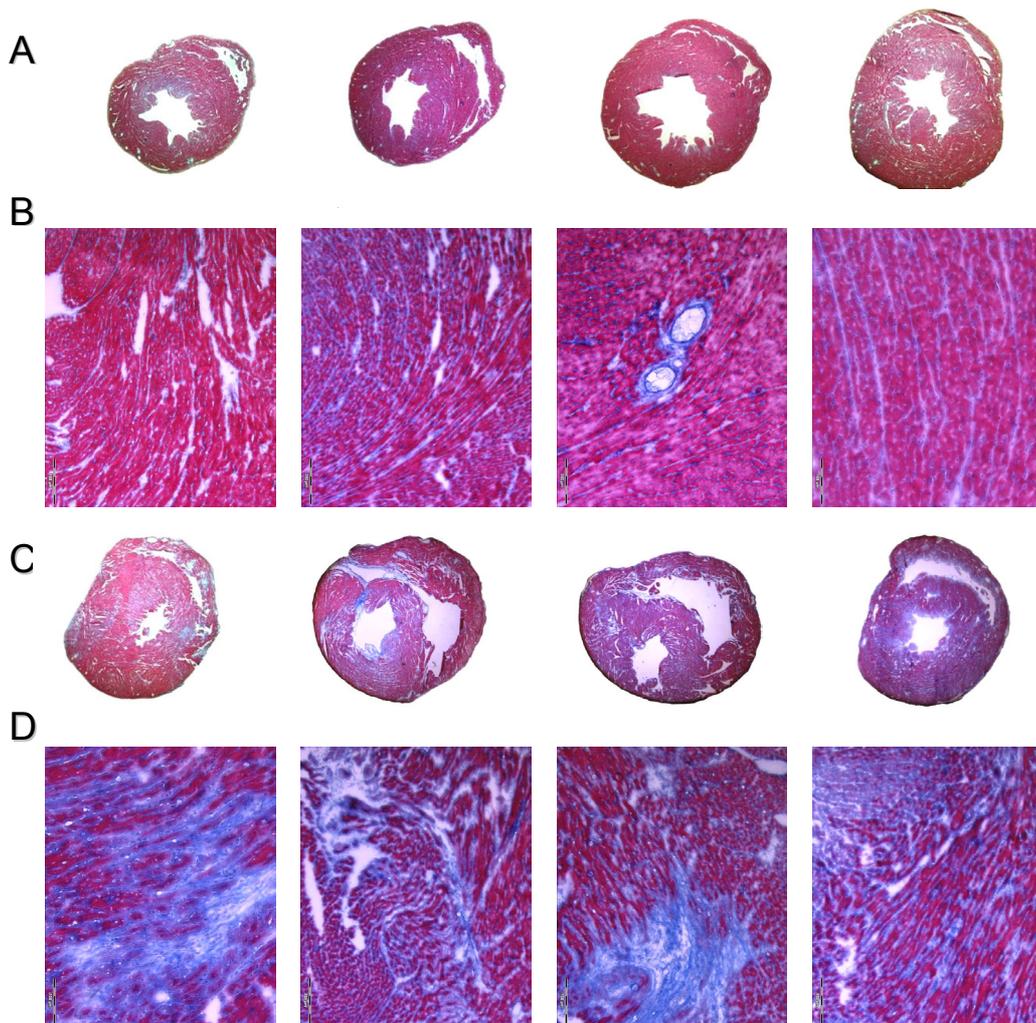


Abb.39: Masson Trichrom gefärbte Querschnitte durch die Herzen von ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Mäusen nach 12 Monaten. (A) 4 Querschnitte von ApoE^{-/-}-Mäusen (12,5fach) und (B) 4 repräsentative 100fache Ausschnittsvergrößerungen (C) 4 Querschnitte von ApoE^{-/-}/CD73^{-/-} Mäusen und (D) 4 repräsentative Ausschnittsvergrößerungen.

In Abbildung 39 sind vergleichend Masson Trichrom gefärbte Herzquerschnitte von vier ApoE^{-/-} und vier Doppelmutanten gezeigt. Alle Schnitte wurden 7-8 mm von der Herzspitze entfernt angefertigt. In den Teilabbildungen B und D sind vergrößerte repräsentative Querschnitte aus diesen Tieren gezeigt.

Der bei der Präparation makroskopisch gewonnene Eindruck kann anhand dieser Daten bestätigt werden. Während die Herzen der vier untersuchten ApoE^{-/-}-Tiere fast unauffällig sind, treten bei den Doppelmutanten zahlreiche massive Defekte auf.

Bei den ApoE^{-/-}-Tieren ist stellenweise Bindegewebe zwischen den Muskelzellen eingelagert. Dennoch erscheint der Gewebeverband weitgehend intakt. Linker und rechter Ventrikel weisen eine normale Größe auf. Wie bei der Entnahme der Herzen festgestellt wurde, können auch an histologischen Schnitten bei den Doppelmutanten Infarktbereiche ausgemacht werden.

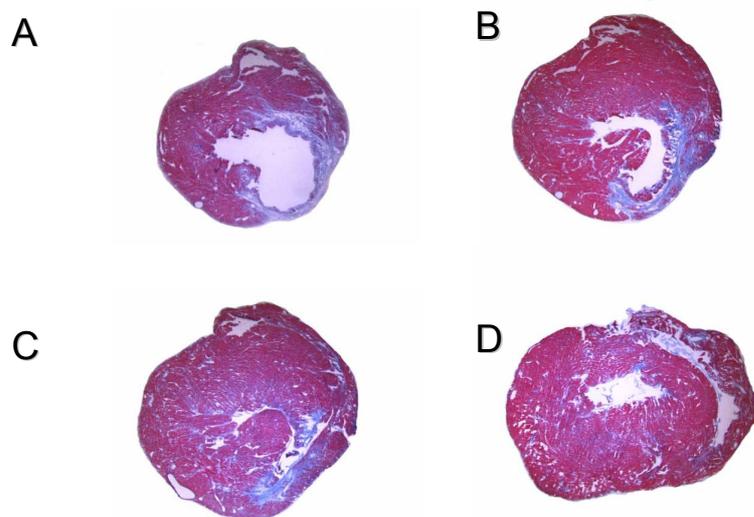


Abb.40: Ausgedehnter Vorderwandinfarkt einer ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Maus nach 12 Monaten. Masson Trichrom gefärbte Querschnitte durch das Herz (A) 3 mm von der Herzspitze entfernt, (B) 4,5 mm, (C) 6 mm und (D) 8 mm von der Herzspitze entfernt.

Nur in einem Fall erstreckte sich der Infarkt über die gesamte Vorderwand (Abb. 40). In den anderen Tieren wurden zahlreiche kleine Infarkte beobachtet. Bei den untersuchten Doppelmutanten war der rechte Ventrikel auffällig vergrößert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Doppelmutante gegenüber ApoE^{-/-}-Tieren eine beschleunigte Arterioskleroseentwicklung aufweist. Alte Doppelmutanten unterscheiden von ApoE^{-/-}-Mäusen in Hinsicht auf die Folgen der fortgeschrittenen Arteriosklerose. Nur in der Doppelmutante konnten mehrfach Infarkte, sowie Vergrößerungen des rechten Ventrikels festgestellt werden.

5 Diskussion

5.1 Der Phänotyp der CD73^{-/-}-Maus ist unter basalen Bedingungen unauffällig

Um die Rolle der CD73 *in vivo* zu untersuchen, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine CD73^{-/-}-Mutante generiert. Dabei wurde ein *Target*-Vektor eingesetzt, der sowohl die Erzeugung konstitutiver, als auch konditionaler Mutanten ermöglicht. Im *Targeting*-Konstrukt wird sowohl Exon II, als auch das distal eingefügte Neomycinresistenzgen von *lox P*-Elementen flankiert. Durch homologe Rekombination und Aktivierung des *Cre-lox*-Systems entstanden Klone mit deletierten, bzw. mit von *lox P*-Elementen flankiertem Exon II. Dieses Exon codiert das Phosphoesterase Signatur Motiv und ist für die AMPase Aktivität der CD73 essentiell. Die konditionalen Mutanten wurden bislang nur in den C57Bl/6-Hintergrund gekreuzt, um sie später mit gewebsspezifisch *Cre*-exprimierenden Tieren zu verpaaren.

Vor Beginn der eigentlichen Phänotypisierung der konstitutiven CD73-KO wurde der Erfolg der KO-Strategie mit RT-PCR, Southern blot- und Western blot-Analysen nachgewiesen. Die CD73^{-/-}-Mutanten erscheinen äußerlich unauffällig und zeigen gegenüber dem WT keine Verhaltensänderungen. Körpergewicht und Herz-Körperindex sind unverändert. Mit einem Flusskatheter wurden hämodynamische und kontraktile Parameter wie Blutdruck, Schlagvolumen und Herzrate bestimmt. Signifikante Unterschiede wurden nicht beobachtet⁵⁷.

Von mir wurde festgestellt, dass die CD73^{-/-}- Mutanten auch im Blutbild keine Unterschiede zum WT zeigen. Sowohl Hämatokrit, Zellzahl und Zusammensetzung sowie berechnete Größen wie Erythrozytenindices waren unverändert⁵⁷. Die cAMP-Spiegel der Blutplättchen waren jedoch signifikant erniedrigt, während der cGMP-Gehalt im CD73-KO gegenüber dem WT unverändert war. Es ist bekannt, dass die Aktivierung der G_s-gekoppelten A₂-Adenosinrezeptoren auf den Blutplättchen zur Stimulation der Adenylzyklase führt und somit den cAMP-Spiegel erhöht⁷⁹. Offenbar ist das von der CD73 generierte Adenosin quantitativ ausreichend, um die cAMP-Spiegel im Blutplättchen zu modulieren. Darüber hinaus zeigte die CD73-KO-Mutante einen verminderten basalen Koronarfluss⁵⁷. Beide Befunde deuten auf eine erniedrigte Adenosinkonzentration an der Grenzfläche zwischen Endothel und zirkulierenden Zellen bzw. Blutplättchen im CD73-KO hin.

Im Langendorff-Modus perfundierte CD73-KO Herzen zeigten eine verminderte Vasodilatation nach intrakoronarer Applikation von AMP, aber keine veränderte Antwort auf Adenosin. Die Fähigkeit zur vasodilatorischen Adenosinantwort ist somit im KO unverändert, wohingegen zur AMP-induzierten Vasodilatation offensichtlich der von der CD73 katalysierte

AMP-Abbau zu Adenosin notwendig ist. Diese Befunde legen nahe, dass die A2a-Rezeptordichte und Funktionalität im CD73-KO unbeeinträchtigt sind. Tatsächlich konnte ich zeigen, dass die A2a-Rezeptorexpression im Herzen von WT und CD73-KO-Tieren gleich stark ist.

5.2 CD73 vs. Alkalische Phosphatase (ALP) als Quelle für extrazelluläres Adenosin

Enzymaktivitätsmessungen an ConA- angereicherten Membranproteinpräparationen aus dem Herzen, aber auch aus Niere¹⁸⁵, Leber und Lunge zeigten, dass unter V_{\max} -Bedingungen die CD73 für ca. 80% der AMP-Hydrolyse verantwortlich ist. Die ALP spielt hierbei offensichtlich nur eine untergeordnete Rolle. Im nach Langendorff salin-perfundierten Herzen sind hingegen unter V_{\max} -Bedingungen bei einmaliger Passage 60 % der AMP-Hydrolyse auf die Aktivität der CD73 zurückzuführen. Allerdings wird im Gegensatz zu Enzymaktivitätsmessungen an Membranproteinpräparationen an isoliert perfundierten Herzen nur die endotheliale CD73-Aktivität erfasst. Der im Gewebeextrakt bestimmte prozentuale Anteil der CD73-Aktivität an der Gesamt-AMPase-Aktivität ist im Vergleich zum isoliert perfundierten Herzen daher höher. Darüber hinaus zeigten histologische Daten am Herzen neben der endothelialen CD73-Aktivität auch CD73-Aktivität im Muskelgewebe im Bereich der Z-Streifen⁵⁷ und eine heterogene Expression der CD73 und der ALP in der Mikrozirkulation⁵⁷. Die beiden untersuchten Enzyme haben für AMP unterschiedliche K_M -Werte. Im Fall der CD73 liegt der K_M -Wert in niederen mikromolaren Bereich zwischen 1 und 50 μM ⁶². Von der ALP sind hoch- und niedrig-affine Komponenten mit K_M -Werten von 36 μM , bzw. 117 μM beschrieben¹⁸⁶. Unter physiologischen Bedingungen, wo man mit einer nanomolaren AMP-Konzentration im Blut rechnen kann, hat die CD73 eine höhere Substrataffinität und spielt gegenüber der ALP eine dominierende Rolle¹⁸⁶.

Das über einen GPI-Anker kovalent an die Zellmembran gebundene Enzym CD73 kann durch endogene Phospholipase C von der Membran gelöst werden. Durch dieses „*Shedding*“ entsteht eine lösliche Form^{62;65}, die bereits unter basalen Bedingungen im Plasma nachweisbar ist. Unter erhöhtem „*Shear stress*“ wird von vaskulären Endothelzellen vermehrt ATP freigesetzt und zusätzlich werden lösliche nukleotidabbauende Ectoenzyme wie CD39 und CD73 ins Blut abgegeben⁶⁵. Es wird deshalb spekuliert, dass das „*Shedding*“ von Ectoenzymen unter „*Shear stress*“-Bedingungen die Adhäsion von Blutzellen am Endothel modulieren kann⁶⁵. Darüber hinaus wurden Änderungen der Plasma-5`NT-Aktivität unter pathophysiologischen Bedingungen, wie bei hepatobiliären Krankheiten und bei *Hyperemesis gravidarum* beschrieben^{187;188}. Neben der Enzymaktivität der membrangebundenen CD73 habe ich daher

auch die Aktivität der löslichen CD73 im Plasma gemessen. In murinem Plasma werden unter V_{\max} -Bedingungen zwei Drittel des AMP von der CD73 hydrolysiert, wohingegen in humanem Plasma ca. die Hälfte des AMP-Abbaus auf die CD73 zurückgeht. In meinen Versuchen stellte ich keine Unterschiede in der ALP-Aktivität zwischen WT und CD73-KO fest. Es kommt auch im Falle eines Verlusts der CD73 nicht zu einer kompensatorischen Hochregulation der ALP.

Zeitgleich mit unserer Arbeitsgruppe wurden von zwei weiteren Gruppen ebenfalls CD73-defiziente Mäuse generiert, wobei Thompson *et al.*¹⁴⁶ Exon III und Castrop *et al.*¹⁸⁹ Exon II und Exon III deletierten. Enzymaktivitätsmessungen im Lungengewebe an der von Thompson *et al.* generierten CD73-Mutante stimmen mit meinen Befunden überein. Im Lungengewebe dieser Tiere wurde eine gegenüber dem WT unveränderte ALP-Aktivität gemessen¹⁹⁰. Im Widerspruch zu diesen und meinen Daten wird von Castrop *et al.* jedoch eine erhöhte ALP-Plasmakonzentration im CD73-KO beschrieben. Höchstwahrscheinlich beruht diese Differenz auf der gewählten Knockout-Strategie bzw. auf dem unterschiedlichen genetischen Hintergrund. Beim Generieren der von Castrop *et al.* verwendeten CD73-KO-Maus verblieb die Neomycinresistenz-Kassette im *Target-Locus*¹⁸⁹, wodurch bekanntlich durch Positionseffekte unerwartete Phänotypen bei Knockout –Mäusen auftreten können^{191;192}. Die PGK-Neo-Kassette kann z.B. mit Positions-Kontrollregionen interagieren und die Expression sowohl benachbarter, aber auch weiter entfernt liegender Gene beeinflussen¹⁹². Die von Castrop *et al.* untersuchten Tiere wiesen außerdem einen genetischen Mischhintergrund aus 129SvEv und C57BL/6 auf¹⁸⁹, wohingegen die von uns verwendeten Versuchstiere über 7 Generationen in den C57Bl/6-Hintergrund rückgekreuzt waren. Auch hier ist bekannt, dass der genetische Hintergrund den Phänotyp erheblich beeinflussen kann¹⁹³⁻¹⁹⁶.

Obwohl vor allem die CD73 in vielen Geweben für den Abbau von AMP verantwortlich ist, zeigt die CD73-KO-Mutante unter basalen Bedingungen einen unauffälligen Phänotyp. Ebenfalls unauffällig ist der Phänotyp der bereits 1999 von Enjyoji *et al.*³⁵ generierten Apyrase/CD39-KO-Mutante. Dieser Mutante fehlt das in der extrazellulären Nukleotidabbaukaskade der CD73 vorgelagerte Enzym CD39, welches wie bereits in der Einleitung (1.1) beschrieben, sowohl ATP, als auch ADP zu AMP hydrolysiert (vgl. Abb.1). In dieser Mausmutante sind das extrazelluläre AMP- und Adenosinangebot eingeschränkt. Im Gegensatz zu der von mir untersuchten CD73-KO-Mutante, in der es zur AMP-Akkumulation kommt, akkumuliert in der CD39-KO-Maus ADP.

5.3 Beeinflussen Statine die CD73-Aktivität in der Maus?

Im Zuge der oben beschriebenen AMPase-Aktivitätsmessungen in verschiedenen Organen untersuchte ich im Rahmen dieser Arbeit den Einfluss der Statine auf die CD73-Aktivität in der Maus. Statine sind 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-(HMG-) Coenzym A Reduktase Inhibitoren und blockieren die Cholesterinbiosynthese¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Von ihrem cholesterinsenkenden Effekt unabhängig sind inzwischen zahlreiche pleiotrope Effekte bekannt²⁰⁰. Statine wirken antiinflammatorisch und es gibt Befunde, dass sie die CD73-Aktivität steigern^{184;201-203}. Somit ist es vorstellbar, dass diese Steigerung der CD73-Aktivität mit einer Erhöhung des extrazellulären Adenosins einhergeht, die dann einen Teil der bekannten antiinflammatorischen Wirkung der Statine erklären könnte. In der Tat wurde von Ledoux *et al.* eine Steigerung der CD73-Aktivität nach Statingabe an SV40 transfizierten kultivierten Ratten-Aortenendothelzellen beschrieben¹⁸⁴. Als dafür verantwortlichen Mechanismus wird die durch Statingabe reduzierte Endocytose der CD73 postuliert. Es kommt an diesen Zellen folglich nicht zur vermehrten Transkription oder Translation der CD73, vielmehr verlängert sich die Verweildauer des Enzyms an der Zelloberfläche¹⁸⁴. Von diesem postulierten Mechanismus ausgehend, wurden von mir Versuche zur CD73-Aktivitätssteigerung an isolierten Aorten durchgeführt. Obwohl verschiedene Statine (Lovastatin, Pravastatin und Simvastatin) in einem breiten Konzentrationsbereich eingesetzt wurden, habe ich keine Änderungen in der extrazellulären AMPase-Aktivität festgestellt. Daher habe ich in Analogie zu Ledoux die Versuche an humanen kultivierten Endothelzellen (HUVEC) wiederholt. Auch hier konnte ich keine Steigerung der Enzymaktivität nach Statingabe nachweisen. Der Widerspruch zwischen meinen am frischen Mausendothel und humanen kultivierten Endothelzellen gewonnenen und den Daten aus der Literatur lässt sich derzeit nur schwer erklären. Möglicherweise sind sie auf speziesspezifische Unterschiede zurückzuführen oder hängen mit der SV40-induzierten Immortalisierung der verwendeten Zelllinie zusammen.

In Versuchen an Hunden und Kaninchen wurde ebenfalls nach Statingabe eine CD73-Aktivitätssteigerung gezeigt^{201;202}. Bekanntermaßen können kurze Perioden von Ischämie/Reperfusion vor einer lang anhaltenden Ischämie die Infarktgröße reduzieren²⁰⁴. Man spricht dabei von ischämischer Präkonditionierung (IP). Adenosin, bzw. die Aktivierung verschiedener Adenosinrezeptoren sind daran unmittelbar beteiligt (vgl.5.5). Darüber hinaus steigert IP die CD73-Aktivität^{205;206}. Interessanterweise können Statine die durch ischämische Präkonditionierung gesteigerte CD73-Aktivität im Myokardinfarktmodell am Kaninchen noch weiter verstärken²⁰². Auch am Hundeherzen wurden durch Ischämie/Reperfusion induzierte Myokardinfarkte durch Statingabe reduziert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass es während

der Reperfusionphase auch in diesem Modell zur gesteigerten Aktivität der PI3-Kinase und anschließend zur Steigerung der CD73 Aktivität kommt ²⁰¹.

Viele pleiotrope Effekte der Statine werden darauf zurückgeführt, dass Statine die Isoprenylierung von kleinen GTPasen wie Rho und Ras unterbinden ^{197;207}. Da die Aktivität dieser GTPasen von der Isoprenylierung abhängt, können Statine viele Signaltransduktionswege und somit auch die Expression verschiedener Gene beeinflussen. An der Regulation von komplexen Prozessen wie bei Entzündungsreaktionen oder ischämischer Präkonditionierung sind eine Vielzahl von Faktoren beteiligt, die direkt oder indirekt durch Statine beeinflusst werden können. Da z.B. bei Entzündungen ^{148;190} oder bei ischämischer Präkonditionierung ^{205;206} die CD73-Aktivität heraufreguliert wird und Statine in der *in vivo* Situation diesen Effekt offenbar verstärken, ist aufgrund des vermehrt gebildeten Adenosins eine verstärkte antiinflammatorische Adenosinrezeptoraktivierung zu erwarten.

5.4 Die Rolle der CD73 bei der Thromboregulation und Entzündung

Um die Frage zu klären, ob sich das im CD73-KO verminderte extrazelluläre Adenosinangebot auf die Thromboregulation der Tiere auswirkt, wurde von mir zunächst die Gerinnungsfähigkeit getestet. Ein üblicher Test bei Mäusen ist die Bestimmung der Blutungszeit nach Amputation der Schwanzspitze ^{179;208}. Die Blutungszeit („*tail bleeding time*“) der CD73^{-/-}-Mutante war gegenüber WT-Mäusen um ca. 30% verkürzt. Ein Signifikanzniveau wurde allerdings nicht erreicht, weil die Methode sehr störanfällig ist und erheblich durch die spontanen Bewegungen der Tiere beeinflusst wird. In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Carotiden von WT und CD73-Mäusen durch Applikation von FeCl₃-Lösung verletzt. Durch die Läsionen des Endothels kommt es zur Thrombenbildung aus aktivierten Blutplättchen, Fibrinfasern und eingeschlossenen Erythrozyten. Die Gefäßverschlusszeit war im CD73-KO signifikant verkürzt ⁵⁷. Die Blutplättchen der CD73-KO-Mutante, die sich durch einen geringeren cAMP-Gehalt auszeichnen, befinden sich möglicherweise bereits in einem leicht aktivierten Zustand, so dass die Thrombenbildung beschleunigt abläuft und sich die Blutungszeit verkürzt.

Interessanterweise zeigt die bereits erwähnte CD39-KO-Mutante eine signifikant verlängerte Blutungszeit und eine verzögerte Thrombusbildung im *FeCl₃-Injury*-Modell. Die CD39-KO-Mutante weist im Gegensatz zur CD73-KO-Mutante eine Plättchendysfunktion auf. Verantwortlich dafür ist eine ATP-vermittelte Desensibilisierung des P2Y1-Rezeptors. Im Gegensatz zu der von uns untersuchten CD73-KO-Mutante kommt es in der CD39-KO-Mutante zur ADP- und nicht zur AMP-Akkumulation. Die Aktivierung von P2-Rezeptoren

spielt daher im CD39-KO die entscheidende Rolle gegenüber der verminderten P1-Rezeptoraktivierung durch das verminderte Adenosinangebot.

Von der mit uns kooperierenden Gruppe um Klaus Ley wurden Ischämie/Reperfusionen am *Cremaster*-Muskel durchgeführt, um die Bedeutung des endogen von der CD73 produzierten Adenosins in der vaskulären Entzündungsantwort zu untersuchen. In den Venen des *Cremaster*-Muskels fanden sich im CD73-KO bereits basal tendenziell mehr adhärierende Leukozyten. Nach Ischämie/Reperfusion war dieser Prozess beschleunigt: im CD73 KO adhärten 2-3mal mehr Leukozyten als im WT⁵⁷. In Übereinstimmung mit diesen Versuchen zeigte die *ex vivo*-Perfusion von Carotiden mit markierten Monozyten, dass unter basalen Bedingungen im CD73-KO vermehrt Monozyten adhärten⁵⁷. Für die proinflammatorische Monozytenrekrutierung in den Carotiden ist wahrscheinlich die *very late antigen* VLA-4/VCAM-1-Interaktion verantwortlich, wie wir in Kooperation mit der Gruppe um C. Weber zeigen konnten. Die CD73-Defizienz geht nämlich mit einer erhöhten konstitutiven NF-κB-Aktivität und verstärkter endothelialer VCAM-1-Expression einher¹⁴⁸. Interessanterweise vermittelt die Bindung von (VLA)-4 an VCAM-1 die Adhäsion mononuklearer Zellen am Endothel auch in der frühen Arteriosklerose²⁰⁹. Die transkriptionelle Steigerung von VCAM-1 im CD73 KO beruht wahrscheinlich auf der erhöhten NF-κB-Aktivität infolge des verringerten Adenosinangebotes. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass Adenosin und cAMP die NF-κB-Aktivität inhibieren²¹⁰. Das neue an unseren Befunden ist, dass das über die extrazelluläre Nukleotidkaskade gebildete Adenosin quantitativ ausreicht, um die NF-κB-Aktivität unter *in vivo* Bedingungen zu modulieren. Zusammengenommen deuten diese Befunde darauf hin, dass von der CD73 generiertes Adenosin eine signifikante Rolle in der antiinflammatorischen Vasoprotektion spielt.

5.5 Veränderungen der Adenosinrezeptorexpression in der CD73^{-/-}-Maus

Da im CD73-KO im Vergleich zum WT weniger Adenosin an der Endotheloberfläche gebildet wird, habe ich untersucht, ob dies einen Einfluss auf die Expression der Adenosinrezeptoren hat. Es fanden sich zum Teil erhebliche Expressionsänderungen der Adenosinrezeptoren-Transkripte zwischen WT und CD73-KO. Insbesondere war die Expression des A1-Rezeptors in Herz und Aorta des CD73KO um 80% reduziert. In der Niere war der A3-Rezeptor im CD73-KO nicht mehr nachzuweisen. Im Cortex und Hypothalamus fand sich hingegen eine Expressionssteigerung des A3-Rezeptors im CD73-KO.

Der A3-Rezeptor ist im Gehirn im Vergleich zu den anderen Rezeptorsubtypen am geringsten exprimiert. Außerdem hat Adenosin zum A3-Rezeptor eine im Vergleich zum A1- und A2a-Rezeptor geringere Affinität²¹¹. Die modulatorische Rolle des A3-Rezeptors bei apoptotischen Ereignissen wird kontrovers diskutiert: die A3-Stimulation mit Agonisten in geringen Konzentrationen schützt vor Apoptose, wohingegen Agonisten in hoher Konzentration A3-Rezeptor-vermittelte Apoptose induzieren²¹²⁻²¹⁴. Über die Aktivierung des A3-Rezeptors auf Mastzellen durch Inosin, dem Abbauprodukt von Adenosin, kommt es zu deren Degranulation⁷⁸. Es ist umstritten, ob der A3-Rezeptor im Gehirn neurotoxisch oder neuroprotektiv wirkt²¹⁴ und welche Effekte auf Adenosin oder auf Inosin zurückzuführen sind. Es ist denkbar, dass neben dem Adenosin- auch das Inosinangebot im CD73-KO eingeschränkt ist. Ob die beobachtete gesteigerte A3-Rezeptorexpression funktionelle Konsequenzen hat, muss in zukünftigen Studien analysiert werden.

Von Vitzthum *et al.*²¹⁵ wurde die Adenosinrezeptorzusammensetzung in der Niere bestimmt. Übereinstimmend mit meinen Daten ist in der Niere der A2a-Rezeptor am stärksten und der A3-Rezeptor am schwächsten exprimiert. Im einzelnen konnte der A3-Rezeptor nur in *Tubulus*, *Glomeruli* und *Vasa recta* nachgewiesen werden²¹⁶. Die Rolle der A3-Rezeptor vermittelten Effekte in der Niere ist nicht bekannt. Somit ist unklar, warum die ohnehin geringe A3-Rezeptorexpression im CD73-KO noch weiter abnimmt und welche funktionellen Konsequenzen damit einhergehen.

Die Aktivierung des A1-Rezeptors führt zur Inhibition der Adenylylzyklase über Aktivierung des Pertussistoxin-sensitiven G_i-Proteins²¹⁷. Im Herzmuskel können infolge der A1-Rezeptoraktivierung über die βγ-Untereinheiten des G_i-Proteins K⁺-Kanäle und ATP-sensitive K⁺-(K_{ATP}) Kanäle aktiviert werden. Dies beeinflusst direkt den vasculären Tonus²¹⁸. Eine besondere Rolle spielt der A1-Rezeptor jedoch beim Schutz des Herzens²¹⁹, aber auch der Lunge²²⁰ und des Gehirns²²⁰ vor Ischämie/Reperfusionsschäden. Durch A1-Rezeptoraktivierung kommt es nämlich zur Aktivierung und Translokation der Proteinkinase C (PKC) zu sarcolemmalen und mitochondrialen Membranen, so dass verstärkt K_{ATP}-Kanäle geöffnet werden. In erster Linie spielen die mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle eine entscheidende Rolle bei der so genannten ischämischen Präkonditionierung (IP). Wie bereits unter 5.3 beschrieben, reduzieren kurze Perioden von Ischämie/Reperfusion vor einer lang anhaltenden Ischämie die Infarktgröße²⁰⁴. A1-Rezeptor KO-Mäuse weisen eine verminderte myokardiale Ischämietoleranz auf²²¹. Interessanterweise fand ich im Rahmen der vorliegenden Arbeit, dass im Herzen der CD73-KO-Mutante die Expression des A1-Rezeptors um 80% reduziert ist. Es wäre anhand der bekannten Fähigkeiten des A1-Rezeptors am Herzen und der beobachteten

reduzierten A1-Expression zu erwarten, dass die Herzen von CD73-KO-Tieren schlechter zu präkonditionieren sind. Tatsächlich wurde dies inzwischen von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt: der IP-vermittelte Schutz des Herzens vor Ischämie/Reperfusionsschäden entfällt im CD73-KO ²²². Es wurde außerdem in dieser Studie gezeigt, dass im WT durch IP die Transkription der CD73 und des A2b-Rezeptors heraufreguliert wird. Die CD73-vermittelte Adenosinproduktion scheint also auch für die schützenden IP-Effekte mit verantwortlich zu sein. Welcher Adenosinrezeptor-Subtyp in diesem Zusammenhang die größere Bedeutung hat, ist noch nicht geklärt. Die bislang gewonnenen Daten sprechen für die Beteiligung sowohl des A1-, als auch des A2b-Rezeptors.

Auch in der Aorta und in frisch mit der „*En Face*“-Methode aus der Aorta isolierten Endothelzellen wurde eine drastisch verminderte A1-Rezeptorexpression im CD73 KO festgestellt. Die Adenosin-vermittelte arterielle Vasodilatation erfolgt überwiegend über die Stimulation des A2a-Rezeptors auf glatten Muskelzellen der Gefäßwand ²²³. Auf glatten Muskelzellen kann Adenosin aber auch über die A1-Rezeptoren ATP-sensitive K⁺-Kanäle aktivieren ²²⁴, wodurch der Gefäßwiderstand sinkt und Blutfluss und Sauerstoffversorgung gesteigert werden ^{224;225}. Ein weiterer wichtiger Mechanismus, über den Adenosin Vasodilatation vermittelt, ist die primäre Aktivierung von A2a- und A1-Rezeptoren auf vaskulären Endothelzellen. Zum einen kommt es zur Steigerung der Synthese des Vasodilators NO ²²⁶, zum anderen werden endotheliale Faktoren wie Prostaglandine ²²⁷ und endothelabhängige hyperpolarisierende Faktoren ^{228,229} freigesetzt. Es ist umstritten, ob die Adenosinrezeptoren auf den Endothelzellen, oder die Rezeptoren auf den glatten Muskelzellen wichtiger für die Regulation des vaskulären Tonus sind. Neben der Beteiligung an der Regulation der Vasodilatation kommt dem Endothel vor allem bei der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion eine zentrale Bedeutung zu. Interessanterweise zeigen sowohl CD39-, als auch CD73-KO-Tiere eine erhöhte vaskuläre Permeabilität. Offenbar ist dafür aber die verminderte A2-Rezeptoraktivierung verantwortlich ^{146;147;230;231}. Die Expression der endothelialen A2-Rezeptoren ist im CD73-KO jedoch unverändert. Über die Rolle des A1-Rezeptors an der Regulation der vaskulären Permeabilität liegen meines Wissens keine Befunde vor.

Da es mit der „*En-Face*“-Methode möglich ist, RNA aus frischen Aortenendothelzellen zu gewinnen, können in Zukunft weiterführende Genexpressionsstudien durchgeführt werden. Bislang reichte die mit der „*En Face*“-Präparationsmethode gewonnene RNA-Menge jedoch noch nicht für eine weiterführende Micro-Array-Analyse aus. Durch Amplifikation des Ausgangsmaterials sollte es aber in Zukunft möglich sein, die endotheliale Genexpression

einzelner Tiere zu vergleichen. Entsprechende Arbeiten werden zur Zeit in Kooperation mit dem BMFZ durchgeführt.

5.6 Die CD73-Defizienz beschleunigt die Arterioskleroseentwicklung

Um die Rolle der CD73 im chronischen Entzündungsmodell zu untersuchen, wurden die CD73-KO-Mutanten mit ApoE-defizienten Tieren verpaart. Die so generierte ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Doppelmutante wurde hinsichtlich der Arterioskleroseentwicklung untersucht. Unter normaler Diät gehaltene 6 Monate alte ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Tiere zeigten in der Aorta eine deutliche Plaquebildung (vgl. Abb.18), wobei die Doppelmutante fast die doppelte mit arteriosklerotischen Plaques bedeckte Fläche aufweist. Dieser zunächst an Aorten-Totalpräparaten gewonnene Befund wurde durch die Quantifizierung von Plaqueflächen in Schnittpräparaten durch den Aortenursprung bestätigt.

Neben dem unterschiedlichen Ausmaß der arteriosklerotischen Plaqueentwicklung fanden sich auch qualitative Unterschiede in der Histologie der Plaquekomposition. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Kollagenzusammensetzung. Die arteriosklerotischen Plaques der ApoE-KO-Tiere sind sehr kompakt, während die Plaques der Doppelmutante aufgelockerte Kollagenstrukturen und Nekrosen zeigen. Zusammen sprechen diese Befunde für eine weiter vorgeschrittene Arterioskleroseentwicklung infolge der CD73-Defizienz. Das von der CD73 extrazellulär generierte Adenosin hemmt offensichtlich die Progression der Entzündung und verzögert somit den Prozess der Arterioskleroseentwicklung.

Wie bereits in der Einleitung (1.3) beschrieben, sind bei jeder Entzündungsreaktion, wie auch in der Arterioskleroseentwicklung, Immunzellen und deren Interaktion mit dem Endothel von zentraler Bedeutung. An der Rekrutierung der Immunzellen und Monozyten sind sowohl Adhäsionsmoleküle, als auch Cytokine beteiligt. Zu Beginn der Arterioskleroseentwicklung spielen Blutplättchen eine wichtige Rolle. Eine Reihe von Molekülen, lokalisiert auf der Oberfläche aktivierter Plättchen oder in Plättchen-Granulae, sind an der Interaktion der Plättchen mit anderen Zellen während vaskulärer Entzündung und Arterioskleroseentwicklung beteiligt²³². Die Plättchen-Glykoproteine Ib und IIb/IIIa koppeln an Oberflächenmoleküle auf Endothelzellen und tragen zur Aktivierung des Endothels bei¹⁵⁵. Aktivierte Endothelzellen wiederum exprimieren Leukozyten-Adhäsionsmoleküle. Dadurch und durch die Induzierung der MCP-1-Produktion ändern sich die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften der Endothelzellen²³³⁻²³⁵. Wie bereits dargestellt (5.1.), konnten wir in unseren eigenen Untersuchungen zeigen, dass aufgrund des Adenosinmangels bei Verlust der CD73 der cAMP-Gehalt der Plättchen reduziert ist. Die Plättchen könnten sich also in einem leicht aktivierten,

proaggregatorischen Zustand befinden und die initiale Endothelaktivierung in der Arterioskleroseentwicklung beschleunigen.

Adhäsionsmoleküle sind in allen Phasen der Leukozytenrekrutierung von Bedeutung. VCAM-1 ist zusammen mit P- und E-Selektin am ersten Schritt, dem „*tethering and rolling*“ beteiligt und unterstützt darüber hinaus wie auch ICAM-1 die feste Adhäsion der Entzündungszellen am Endothel. PECAM-1 hingegen fördert die transendotheliale Zellmigration, wobei VCAM-1 diesen Effekt verstärkt¹⁵⁴. In arteriosklerotischen Läsionen bei ApoE-KO-Tieren sind sowohl ICAM-1, als auch VCAM-1 heraufreguliert, wohingegen im WT diese Adhäsionsmoleküle nur schwach exprimiert werden¹⁵⁴. Die histologischen Befunde meiner Arbeit stimmen damit überein. Sowohl ICAM-1, als auch VCAM-1 sind an der luminalen Plaqueoberfläche 6 Monate alter ApoE-KO und ApoE/CD73-Doppel-KO-Tiere stark exprimiert. Die VCAM-1-Expression ist in der Doppelmutante sogar noch stärker als in den vergleichbaren ApoE-KO-Tieren. Die VCAM-1-Rezeptoren auf Monozyten und Lymphozyten sind für die Adhäsion dieser Zellen verantwortlich²¹⁵. Die adhärierenden Zellen werden von Chemokinen zur Migration stimuliert.

Ein kritischer Schritt in der Arterioskleroseentwicklung ist die durch MCSF (*macrophage colony-stimulating factor*) stimulierte Differenzierung migrierter Monozyten in Makrophagen²³⁶. Damit geht eine Heraufregulation von *Scavenger*-Rezeptoren und *Toll-like*-Rezeptoren einher¹⁵⁸. Über *Scavenger*-Rezeptoren wird die Aufnahme apoptotischer Zellfragmente und oxidiertes LDL-Partikel gesteuert und es kommt so zur Schaumzellbildung¹⁵⁸. Auch über *Toll-like*-Rezeptoren werden pathogene Moleküle gebunden. Darüber hinaus können *Toll-like*-Rezeptoren eine Kaskade aktivieren, die zur Zellaktivierung führt. Diese aktivierten Makrophagen produzieren inflammatorische Cytokine, Proteasen und cytotoxische Sauerstoff- und Stickstoffradikale²¹⁵. Meine histologischen Befunde zeigen CD11-positive Monozyten und Makrophagen in den arteriosklerotischen Plaques und dem umliegenden Gewebe der ApoE- und ApoE/CD73-Doppel-Mutante. Pro Plaqueareal weist die Doppelmutante dabei mehr CD11-positive Zellen auf. In Übereinstimmung mit diesen Daten ist in der Doppelmutante auch der MCP-1-Plasmaspiegel stärker erhöht als im ApoE-KO. MCP-1 ist an der Rekrutierung der Monozyten beteiligt und wird u.a. von aktivierten Makrophagen freigesetzt.

In arteriosklerotischen Plaques sind neben Monozyten und Makrophagen stets auch proatherogene und antiatherogene T-Zellpopulationen lokalisiert. Meine histologischen T-Zellnachweise zeigen jedoch keine quantitativen Unterschiede zwischen ApoE-KO-Tieren und der ApoE/CD73-Doppel-Mutante. In Übereinstimmung mit Arbeiten von Roselaar *et al.*²³⁷

und Paulsson *et al.* ²³⁸ sind die meisten in den Plaques detektierten T-Zellen CD4-positiv. Diese T-Zellpopulation erkennt Antigene, die von MHC Klasse II-Molekülen präsentiert werden. Durch den Kontakt des Antigenrezeptors mit dem Antigen wird die T-Zelle aktiviert, wodurch die Expression von Cytokinen, Zelloberflächenmolekülen und Enzymen gefördert wird ²¹⁵. Bei den meisten CD4 positiven T-Zellen in den arteriosklerotischen Plaques handelt es sich um proinflammatorische IFN- γ -produzierende Th1-Zellen ²³⁹⁻²⁴². Zu den proatherogenen Effekten, die von IFN- γ ausgelöst werden können, gehören Makrophagenaktivierung, Sekretion von Metalloproteinasen und TNF- α , Endothelzellaktivierung und Steigerung der Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle ²⁴². Obwohl sich die Anzahl der T-Zellen in den Plaques der ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Tiere nicht unterscheidet, kann es Unterschiede in der Funktionalität der T-Zellen geben. Adenosin wirkt über die Aktivierung der A2a- und A2b-Rezeptoren auf den T-Zellen als endogener Modulator der T-Zellantwort ²⁴³. Beispielsweise hemmt Adenosin die Bildung von IL-2 und IFN- γ ^{244;245}.

Fasst man meine Befunde zusammen, so weist die ApoE/CD73-Doppel-KO-Maus einen verstärkt inflammatorischen Phänotyp auf. Dies zeigt sich in beschleunigter Plaquebildung, verstärkter VCAM-1-Expression, erhöhtem MCP-1-Spiegel und vermehrtem Monozyten- und Makrophagengehalt in den arteriosklerotischen Plaques. Offenbar spielt das endogen von der CD73 generierte Adenosin auch im chronischen Entzündungsverlauf eine antiinflammatorische Rolle.

Darüber hinaus wurden einige ApoE^{-/-}-Tiere und Doppelmutanten, die unter normaler Diät gehalten wurden, nach 12 Monaten untersucht. Alle Tiere wiesen ausgedehnte Plaques sowohl in der Aorta, als auch in Koronargefäßen auf. Obwohl ApoE-KO und Doppelmutante von den Plaques ausgehend Thromben bilden, treten nur in der Doppelmutante Myokardinfarkte auf. In den Herzen von ApoE^{-/-}-Tieren finden sich nur gelegentliche Bindegewebeinlagerungen, wie sie für ältere Tiere charakteristisch sind. Meines Wissens wurden bislang bei ApoE^{-/-}-Mäusen, die unter normaler Diät gehalten wurden, keine Myokardinfarkte beobachtet. Lediglich unter Western Diät und zusätzlichem mentalen oder hypoxischen Stress wurden Infarkte bei ApoE^{-/-}/LDLR^{-/-}-Mäusen beschrieben ²⁴⁶. Die bei den ApoE^{-/-}/CD73^{-/-}-Doppelmutanten aufgetretenen Infarkte sind offenbar die Folge der beschleunigten Arterioskleroseentwicklung aufgrund des Verlustes der CD73 und des damit verbundenen Adenosinmangels. Ob die den Infarkten vorangegangenen Koronargefäßverschlüsse durch die beschleunigte Plaqueprogression verursacht wurden oder ob verminderte Plaquestabilität und Thrombenbildung zum plötzlichen Gefäßverschluss geführt haben, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht entschieden werden.

5.7 Expression der CD73 in akuter und chronischer Entzündung

Die im chronischen Modell der Arterioskleroseentwicklung gewonnenen Befunde stehen im Einklang mit Daten, die am CD73-KO im akuten Entzündungsmodell erhoben wurden. In einer Kooperation mit dem Labor von Christian Weber, Aachen wurde von Zerneck *et al.* die Rolle der CD73 in der Neointima-Plauebildung nach „*wire-induced injury*“ untersucht ¹⁴⁸. Dabei wurden im CD73-KO ebenfalls ein signifikant erhöhter Monozytengehalt und ein gegenüber dem WT unveränderter T-Zellgehalt festgestellt. Vier Wochen nach der Verletzung konnte im CD73-KO eine stärkere Plauebildung als im WT gezeigt werden. Die im KO gesteigerte VCAM-1-Expression wurde durch die Verletzung weiter erhöht.

Nach der akuten Verletzung konnten an WT-Tieren sowohl eine Expressions-, als auch eine Aktivitätssteigerung der CD73 an der Plaueschulter und an der luminalen Plaueoberfläche gezeigt werden. Es scheint sich um eine kompensatorische Genregulation als Antwort auf die Entzündung zu handeln ¹⁴⁸. Auch in der bereits erwähnten Studie von Volmer *et al.* ¹⁹⁰ wurde in einem Bleomycin-induzierten Lungenentzündungsmodell gezeigt, dass CD73 für die Adenosinakkumulation während der Entzündung verantwortlich ist.

Darüber hinaus konnte ich an ApoE^{-/-}-Tieren zeigen, dass die CD73-Aktivität im Verlauf einer chronisch-entzündlichen Erkrankung eine entscheidende Rolle spielt. An Schnittpräparaten durch die Aorta, bzw. durch den Aortenursprung konnte gezeigt werden, dass im Endothel des WT CD73-Aktivität auftritt. In 6 Monate alten ApoE^{-/-}-Tieren wurde CD73-Aktivität zusätzlich in arteriosklerotischen Plaues nachgewiesen. Mit zunehmendem Alter der Versuchstiere und fortschreitender Arteriosklerose steigt diese Aktivität weiter an.

In der Vergangenheit haben sich bereits einige Gruppen mit der transkriptionalen Regulierbarkeit der CD73 beschäftigt. Der Promotor des CD73-Genes enthält ein „*cAMP response element*“ (CRE) und kann daher über den cAMP-abhängigen Coaktivator *CRE-binding protein* (CREB) aktiviert werden ^{230;247;248}. Da die Aktivierung der A2a- und A2b-Rezeptoren zur Steigerung des intrazellulären cAMP-Spiegels und zur Aktivierung von CREB führt, kann Adenosin die CD73-Expression regulieren ²³⁰. Darüber hinaus enthält der CD73-Promotor eine Bindungsstelle für den „*Hypoxia-inducible factor-1*“ (HIF-1). Hypoxie als inflammatorischer Stimulus induziert im Endothel die Transkription und Ectonukleotidaseaktivität der CD73 und der CD39 ^{138;230;231}. Aktivierte zirkulierende Plättchen und Leukozyten setzen unter Hypoxie vermehrt ATP frei und liefern somit das Substrat für die Ectonukleotidasen. Infolge der gesteigerten Ectoenzymaktivitäten steht mehr Adenosin zur Verfügung, welches wiederum über die Aktivierung der Leukozyten-A2a- und A2b-Rezeptoren

deren Adhäsion und Migration durch die endotheliale Barriere hemmt. CD73 und CD39 sind somit wichtige Kontrollpunkte eines endogenen antiinflammatorischen Mechanismus. Neben der beschriebenen transkriptionalen Kontrolle der CD73 sind weitere regulatorische Mechanismen bekannt. Wie unter 5.3 beschrieben, kann die Oberflächenexpression des Enzyms durch Statingabe über Verminderung der Endocytose durch *Rho*-Modulation gesteigert werden¹⁸⁴. Ledoux beschreibt neben der transkriptionalen Regulation der CD73 unter Hypoxie in diesem Zusammenhang einen HIF-unabhängigen Mechanismus¹⁴⁵. Durch Hypoxie kommt es zu Modifikationen in der Membranzusammensetzung und damit, ähnlich wie nach Statingabe, zu einer verminderten Endocytose des Enzyms¹⁴⁵. Zusätzlich stellt „*Shedding*“ einen Mechanismus dar, der die Oberflächenexpression der CD73 kontrollieren kann⁶⁵. Die verschiedenen Mechanismen, die die Expression und Funktion dieses Enzyms kontrollieren, sind darüber hinaus zelltypspezifisch. So führt z.B. die Bindung eines spezifischen Antikörpers zum „*Shedding*“ der CD73 auf Lymphozyten, nicht aber zum „*Shedding*“ des endothelialen Moleküls^{61;249;250}. Die Effekte verschiedener Cytokine auf die Regulation der Enzymaktivität unterscheiden sich ebenfalls zwischen Lymphozyten und Endothelzellen²⁴⁹.

Interessanterweise konnte ich immunhistologisch zeigen, dass in den arteriosklerotischen Plaques der ApoE^{-/-}-Tiere einzelne T-Lymphozyten CD73 stark exprimieren. Bislang wurde jedoch nicht geklärt, um welche T-Zellpopulation es sich dabei handelt. Inwieweit die von T-Zellen exprimierte CD73 im Vergleich zur endothelialen CD73 zur Modulation der chronischen Entzündungsreaktion beiträgt, konnte durch meine bisherigen Versuche nicht geklärt werden. Um die Rolle der CD73-Expression auf T-Zellen in diesem Zusammenhang zu untersuchen, sind daher reziproke Knochenmarkstransplantationsexperimente mit entsprechenden KO-Mutanten in der Arbeitsgruppe in Zukunft geplant.

6 Zusammenfassung

Die Aktivität nukleotidabbauender Ectoenzyme spielt eine wichtige Rolle in der Thromboregulation, Hämostase und Modulation inflammatorischer Prozesse. Durch diesen schrittweisen Abbau von Nukleotiden zu Nukleosiden an der Zelloberfläche durch die CD73 und CD39 kommt es von einer primären P2-Rezeptoraktivierung zur Aktivierung von P1-Rezeptoren, die über Adenosin vermittelt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des 5'-Ecto-Nukleotidase (CD73)-vermittelten AMP-Abbaus zu Adenosin am Modell CD73 defizienter Mausmutanten untersucht. Dabei zeigte sich, dass die CD73 im Vergleich zu der ebenfalls AMP zu Adenosin abbauenden Alkalischen Phosphatase (ALP) unter physiologischen Bedingungen eine dominierende Rolle spielt. Die CD73-Defizienz führt nicht zur kompensatorischen Hochregulation der ALP-Aktivität. Aufgrund der verminderten Adenosinbildung verringert sich im CD73-KO die vasodilatorische AMP-Antwort, wohingegen die Gabe von Adenosin am isolierten Herzen zur gleichen Antwort wie im Wildtyp führt. Dies spricht für eine unveränderte A2-Rezeptoraktivierbarkeit. Infolge des verringerten Adenosinangebots zeigt die CD73-KO-Mutante einen reduzierten Koronarfluss. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass im Herzen, in der Aorta und in Aortenendothelzellen die Expression des Adenosinrezeptors A1 im KO um 80 % gegenüber dem WT vermindert ist. Die CD73-KO-Mausmutante zeigt aufgrund der verringerten Adenosinkonzentration an der Grenzfläche zwischen Endotheloberfläche und zirkulierenden Zellen einen proinflammatorischen Phänotyp mit gestörter Thromboregulation. Es zeigte sich eine vermehrte Leukozytenadhäsion am Endothel, verkürzte Blutungszeit und beschleunigte Thrombenbildung nach Gefäßverletzung. Die im Rahmen dieser Arbeit gezüchtete ApoE/CD73-Doppel-KO-Mutante zeigte eine beschleunigte Arterioskleroseentwicklung, die von verstärkter Entzündung gekennzeichnet ist und im weiteren Verlauf sogar zum Myokardinfarkt führt. Auch chronisch-inflammatorische Prozesse werden von CD73-generiertem Adenosin moduliert. Darüber hinaus ist in arteriosklerotischen Plaques ApoE-defizienter Mäuse die CD73 stark exprimiert. Mit zunehmendem Alter der Tiere und fortschreitender Arteriosklerose nimmt die CD73-Expression noch weiter zu. Es wurde gezeigt, dass in den arteriosklerotischen Plaques der ApoE-KO-Tiere einzelne T-Zellen CD73-positiv sind. Offenbar ist die CD73 ein wichtiger Kontrollpunkt, der über die Verfügbarkeit des antiinflammatorischen Signalmoleküls Adenosin die Progression von akuten und chronischen Entzündungen moduliert.

7 Summary

The activity of nucleotide catabolizing ectoenzymes plays a major role in thromboregulation, hemostasis, and modulation of inflammatory processes. The gradual breakdown of nucleotides to nucleosides at the cell surface by CD73 and CD39 results in a primary P2 receptor activation and, subsequently, in an adenosine-mediated activation of P1 receptors.

In the present work the role of the 5'-ecto-nucleotidase (CD73) in AMP degradation to adenosine was investigated by using mouse models lacking CD73. The results demonstrate that under physiological conditions CD73 is the predominant player in the conversion of AMP to adenosine as compared to the alkaline phosphatase (ALP) which also mediates breakdown of AMP to adenosine. CD73 deficiency does not lead to a compensatory upregulation of the ALP activity. Due to the reduced adenosine formation in CD73 knockout mice the sensitivity of the vasodilatory response to AMP is decreased, whereas the application of adenosine to isolated perfused hearts showed no differences between mutant and wildtype. This indicates that the A2 receptor capacity of being activated is unchanged. As a consequence of the diminished adenosine levels, CD73 KO hearts display a reduced coronary flow. Furthermore, it could be shown that in heart, aorta, and aortic endothelial cells of KO mice the expression of the adenosine receptor A1 is decreased by 80 % in comparison with the WT group. Because of the reduced adenosine concentration at the junction of endothelial surface and circulating cells, CD73 KO mice are characterized by a proinflammatory phenotype with an impaired thromboregulation. An increased adhesion of leucocytes at the endothel, a decreased bleeding time, and an accelerated thrombus formation after vessel injury was observed. The ApoE/CD73 double KO mutant generated in this study exhibited an enhanced development of arteriosclerosis, which was accompanied by boosted inflammation and in the later course by myocardial infarction. This suggests that also chronic inflammatory processes are modulated by CD73-generated adenosine. It is noteworthy, that CD73 is highly expressed in arteriosclerotic plaques of ApoE-deficient mice. The CD73 expression further increases with age and progression of arteriosclerosis. Furthermore, CD73 positive T-cells were identified in arteriosclerotic plaques of ApoE KO mutants. Obviously, CD73 is an important checkpoint which modulates the progression of acute and chronic inflammation by regulating the availability of the antiinflammatory signal molecule adenosine.

8 Literatur

1. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol*. 1970;40:668-688.
2. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*. 1972;24:509-581.
3. Bodin P, Burnstock G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res*. 2001;26:959-969.
4. Burnstock G. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol*. 2006;147 Suppl 1:S172-S181.
5. Ostrom RS, Gregorian C, Insel PA. Cellular release of and response to ATP as key determinants of the set-point of signal transduction pathways. *J Biol Chem*. 2000;275:11735-11739.
6. Donaldson SH, Lazarowski ER, Picher M, Knowles MR, Stutts MJ, Boucher RC. Basal nucleotide levels, release, and metabolism in normal and cystic fibrosis airways. *Mol Med*. 2000;6:969-982.
7. Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J Biol Chem*. 2000;275:31061-31068.
8. Schwiebert LM, Rice WC, Kudlow BA, Taylor AL, Schwiebert EM. Extracellular ATP signaling and P2X nucleotide receptors in monolayers of primary human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282:C289-C301.
9. Morel N, Meunier FM. Simultaneous release of acetylcholine and ATP from stimulated cholinergic synaptosomes. *J Neurochem*. 1981;36:1766-1773.
10. Richardson PJ, Brown SJ. ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J Neurochem*. 1987;48:622-630.
11. Schweitzer E. Coordinated release of ATP and ACh from cholinergic synaptosomes and its inhibition by calmodulin antagonists. *J Neurosci*. 1987;7:2948-2956.
12. Baumgartner H, Winkler H, Hortnagl H. Isolated chromaffin granules maintenance of ATP content during incubation at 31 degrees C. *Eur J Pharmacol*. 1973;22:102-104.
13. Holmsen H, Weiss HJ. Further evidence for a deficient storage pool of adenine nucleotides in platelets from some patients with thrombocytopathia--"storage pool disease". *Blood*. 1972;39:197-209.
14. Daniel JL, Molish IR, Holmsen H. Radioactive labeling of the adenine nucleotide pool of cells as a method to distinguish among intracellular compartments. Studies on human platelets. *Biochim Biophys Acta*. 1980;632:444-453.
15. Godecke S, Stumpe T, Schiller H, Schnittler HJ, Schrader J. Do rat cardiac myocytes release ATP on contraction? *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;289:C609-C616.

16. Furuya K, Sokabe M, Furuya S. Characteristics of subepithelial fibroblasts as a mechano-sensor in the intestine: cell-shape-dependent ATP release and P2Y1 signaling. *J Cell Sci.* 2005;118:3289-3304.
17. John K, Barakat AI. Modulation of ATP/ADP concentration at the endothelial surface by shear stress: effect of flow-induced ATP release. *Ann Biomed Eng.* 2001;29:740-751.
18. Genetos DC, Geist DJ, Liu D, Donahue HJ, Duncan RL. Fluid shear-induced ATP secretion mediates prostaglandin release in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2005;20:41-49.
19. Bodin P, Milner P, Winter R, Burnstock G. Chronic hypoxia changes the ratio of endothelin to ATP release from rat aortic endothelial cells exposed to high flow. *Proc Biol Sci.* 1992;247:131-135.
20. Bodin P, Burnstock G. Synergistic effect of acute hypoxia on flow-induced release of ATP from cultured endothelial cells. *Experientia.* 1995;51:256-259.
21. Bergfeld GR, Forrester T. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc Res.* 1992;26:40-47.
22. Dutta AK, Okada Y, Sabirov RZ. Regulation of an ATP-conductive large-conductance anion channel and swelling-induced ATP release by arachidonic acid. *J Physiol.* 2002;542:803-816.
23. Jans D, Srinivas SP, Waelkens E, Segal A, Lariviere E, Simaels J, Van Driessche W. Hypotonic treatment evokes biphasic ATP release across the basolateral membrane of cultured renal epithelia (A6). *J Physiol.* 2002;545:543-555.
24. Phillis JW, O'Regan MH. Evidence for swelling-induced adenosine and adenine nucleotide release in rat cerebral cortex exposed to monocarboxylate-containing or hypotonic artificial cerebrospinal fluids. *Neurochem Int.* 2002;40:629-635.
25. Goldstein L, Koomoa DL, Musch MW. ATP release from hypotonically stressed skate RBC: potential role in osmolyte channel regulation. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2003;296:160-163.
26. Gheorghiu M, Van Driessche W. Modeling of basolateral ATP release induced by hypotonic treatment in A6 cells. *Eur Biophys J.* 2004;33:412-420.
27. Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, Fulmer SB, Allen SS, Cutting GR, Guggino WB. CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell.* 1995;81:1063-1073.
28. Gomes P, Srinivas SP, Van Driessche W, Vereecke J, Himpens B. ATP release through connexin hemichannels in corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:1208-1218.
29. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 2001;11:1156-1166.

30. Dean M, Annilo T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005;6:123-142.
31. Bodas E, Aleu J, Pujol G, Martin-Satue M, Marsal J, Solsona C. ATP crossing the cell plasma membrane generates an ionic current in xenopus oocytes. *J Biol Chem.* 2000;275:20268-20273.
32. Yegutkin GG, Henttinen T, Samburski SS, Spsychala J, Jalkanen S. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *Biochem J.* 2002;367:121-128.
33. Yegutkin GG, Henttinen T, Jalkanen S. Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions. *FASEB J.* 2001;15:251-260.
34. BORN GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962;194:927-929.
35. Enjyoji K, Sevigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Esch JS, Imai M, Edelberg JM, Rayburn H, Lech M, Beeler DL, Csizmadia E, Wagner DD, Robson SC, Rosenberg RD. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med.* 1999;5:1010-1017.
36. Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM, Koller BH. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat Med.* 1999;5:1199-1202.
37. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 2002;8:1227-1234.
38. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity.* 2001;15:825-835.
39. Clifford EE, Martin KA, Dalal P, Thomas R, Dubyak GR. Stage-specific expression of P2Y receptors, ecto-apyrase, and ecto-5'-nucleotidase in myeloid leukocytes. *Am J Physiol.* 1997;273:C973-C987.
40. Kunapuli SP, Daniel JL. P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem J.* 1998;336 (Pt 3):513-523.
41. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood.* 2001;97:587-600.
42. Idzko M, Dichmann S, Panther E, Ferrari D, Herouy Y, Virchow C, Jr., Luttmann W, Di Virgilio F, Norgauer J. Functional characterization of P2Y and P2X receptors in human eosinophils. *J Cell Physiol.* 2001;188:329-336.
43. Dunn PM, Zhong Y, Burnstock G. P2X receptors in peripheral neurons. *Prog Neurobiol.* 2001;65:107-134.
44. Knight GE, Burnstock G. Identification of P1 and P2 purinoceptors in the aorta of the lizard (*Agama sp.*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2001;128:413-423.

45. Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, Voigt M, Humphrey PP. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev.* 2001;53:107-118.
46. Kukley M, Stausberg P, Adelman G, Chessell IP, Dietrich D. Ecto-nucleotidases and nucleoside transporters mediate activation of adenosine receptors on hippocampal mossy fibers by P2X7 receptor agonist 2'-3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP. *J Neurosci.* 2004;24:7128-7139.
47. Burnstock G. Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem.* 2004;4:793-803.
48. Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA. Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat Neurosci.* 1999;2:322-330.
49. Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, Voigt M, Humphrey PP. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev.* 2001;53:107-118.
50. Khakh BS, Gittermann D, Cockayne DA, Jones A. ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. *J Neurosci.* 2003;23:7426-7437.
51. Le Feuvre RA, Brough D, Iwakura Y, Takeda K, Rothwell NJ. Priming of macrophages with lipopolysaccharide potentiates P2X7-mediated cell death via a caspase-1-dependent mechanism, independently of cytokine production. *J Biol Chem.* 2002;277:3210-3218.
52. Gao Z, Chen T, Weber MJ, Linden J. A2B adenosine and P2Y2 receptors stimulate mitogen-activated protein kinase in human embryonic kidney-293 cells. cross-talk between cyclic AMP and protein kinase c pathways. *J Biol Chem.* 1999;274:5972-5980.
53. Inbe H, Watanabe S, Miyawaki M, Tanabe E, Encinas JA. Identification and characterization of a cell-surface receptor, P2Y15, for AMP and adenosine. *J Biol Chem.* 2004;279:19790-19799.
54. Yegutkin GG, Samburski SS, Jalkanen S. Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase and phosphotransfer reactions. *FASEB J.* 2003;17:1328-1330.
55. Zimmermann H. Ectonucleotidases: Some Recent Developments and Note on Nomenclature. *Drug Development Research.* 2001;2001:44-56.
56. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001;53:527-552.
57. Koszalka P, Ozuyaman B, Huo Y, Zerneck A, Flogel U, Braun N, Buchheiser A, Decking UK, Smith ML, Sevigny J, Gear A, Weber AA, Molojavyi A, Ding Z, Weber C, Ley K, Zimmermann H, Godecke A, Schrader J. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res.* 2004;95:814-821.

58. Bianchi V, Spychala J. Mammalian 5'-nucleotidases. *J Biol Chem.* 2003;278:46195-46198.
59. Resta R, Hooker SW, Laurent AB, Jamshedur Rahman SM, Franklin M, Knudsen TB, Nadon NL, Thompson LF. Insights into thymic purine metabolism and adenosine deaminase deficiency revealed by transgenic mice overexpressing ecto-5'-nucleotidase (CD73). *J Clin Invest.* 1997;99:676-683.
60. Mlodzik K, Loffing J, Le Hir M, Kaissling B. Ecto-5'-nucleotidase is expressed by pericytes and fibroblasts in the rat heart. *Histochem Cell Biol.* 1995;103:227-236.
61. Airas L, Niemela J, Jalkanen S. CD73 engagement promotes lymphocyte binding to endothelial cells via a lymphocyte function-associated antigen-1-dependent mechanism. *J Immunol.* 2000;165:5411-5417.
62. Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J.* 1992;285 (Pt 2):345-365.
63. Thompson LF, Ruedi JM, O'Connor RD, Bastian JF. Ecto-5'-nucleotidase expression during human B cell development. An explanation for the heterogeneity in B lymphocyte ecto-5'-nucleotidase activity in patients with hypogammaglobulinemia. *J Immunol.* 1986;137:2496-2500.
64. Widnell CC, Schneider YJ, Pierre B, Baudhuin P, Trouet A. Evidence for a continual exchange of 5'-nucleotidase between the cell surface and cytoplasmic membranes in cultured rat fibroblasts. *Cell.* 1982;28:61-70.
65. Yegutkin G, Bodin P, Burnstock G. Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 2000;129:921-926.
66. Broch OJ, Ueland PM. Regional and subcellular distribution of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the adult rat brain. *J Neurochem.* 1980;35:484-488.
67. Goerlach A. Control of adenosine transport by hypoxia. *Circulation Research.* 2005;2005:1-3.
68. Aymerich I, Duflot S, Fernandez-Veledo S, Guillen-Gomez E, Huber-Ruano I, Casado FJ, Pastor-Anglada M. The concentrative nucleoside transporter family (SLC28): new roles beyond salvage? *Biochem Soc Trans.* 2005;33:216-219.
69. Williams TC, Jarvis SM. Multiple sodium-dependent nucleoside transport systems in bovine renal brush-border membrane vesicles. *Biochem J.* 1991;274 (Pt 1):27-33.
70. Anderson CM, Xiong W, Young JD, Cass CE, Parkinson FE. Demonstration of the existence of mRNAs encoding N1/cif and N2/cit sodium/nucleoside cotransporters in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996;42:358-361.
71. Baldwin JM, Schertler GF, Unger VM. An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J Mol Biol.* 1997;272:144-164.

72. Lynge J, Juel C, Hellsten Y. Extracellular formation and uptake of adenosine during skeletal muscle contraction in the rat: role of adenosine transporters. *J Physiol*. 2001;537:597-605.
73. Baldwin SA, Mackey JR, Cass CE, Young JD. Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today*. 1999;5:216-224.
74. Wang J, Schaner ME, Thomassen S, Su SF, Piquette-Miller M, Giacomini KM. Functional and molecular characteristics of Na(+)-dependent nucleoside transporters. *Pharm Res*. 1997;14:1524-1532.
75. Spychala J, Datta NS, Takabayashi K, Datta M, Fox IH, Gribbin T, Mitchell BS. Cloning of human adenosine kinase cDNA: sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:1232-1237.
76. Arch JR, Newsholme EA. Activities and some properties of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in tissues from vertebrates and invertebrates in relation to the control of the concentration and the physiological role of adenosine. *Biochem J*. 1978;174:965-977.
77. Lloyd HG, Fredholm BB. Involvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extracellular adenosine concentration in rat hippocampal slices. *Neurochem Int*. 1995;26:387-395.
78. Jin X, Shepherd RK, Duling BR, Linden J. Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *J Clin Invest*. 1997;100:2849-2857.
79. van Calker D, Muller M, Hamprecht B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem*. 1979;33:999-1005.
80. Olah ME. Identification of A2a adenosine receptor domains involved in selective coupling to Gs. Analysis of chimeric A1/A2a adenosine receptors. *J Biol Chem*. 1997;272:337-344.
81. Pierce KD, Furlong TJ, Selbie LA, Shine J. Molecular cloning and expression of an adenosine A2b receptor from human brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;187:86-93.
82. Kull B, Svenningsson P, Fredholm BB. Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. *Mol Pharmacol*. 2000;58:771-777.
83. Linden J, Thai T, Figler H, Jin X, Robeva AS. Characterization of human A(2B) adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol Pharmacol*. 1999;56:705-713.
84. Palmer TM, Benovic JL, Stiles GL. Agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the rat A3 adenosine receptor. Evidence for a G-protein-coupled receptor kinase-mediated mechanism. *J Biol Chem*. 1995;270:29607-29613.

85. Palmer TM, Gettys TW, Stiles GL. Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A3 adenosine receptor. *J Biol Chem*. 1995;270:16895-16902.
86. Fredholm BB, Gerwins P, Johansson B, Parkinson FE, van dP, I. Signalling via G-protein coupled receptors--using adenosine receptors as an example. *Drug Des Discov*. 1993;9:189-197.
87. Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Hardemark A, Betsholtz C, Herlenius E, Fredholm BB. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:9407-9412.
88. Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, Parmentier M. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature*. 1997;388:674-678.
89. Salvatore CA, Tilley SL, Latour AM, Fletcher DS, Koller BH, Jacobson MA. Disruption of the A(3) adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *J Biol Chem*. 2000;275:4429-4434.
90. Yang D, Zhang Y, Nguyen HG, Koupenova M, Chauhan AK, Makitalo M, Jones MR, St Hilaire C, Seldin DC, Toselli P, Lamperti E, Schreiber BM, Gavras H, Wagner DD, Ravid K. The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. *J Clin Invest*. 2006;116:1913-1923.
91. Dubey RK, Mi Z, Gillespie DG, Jackson EK. Cyclic AMP-adenosine pathway inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension*. 1996;28:765-771.
92. Dubey RK, Gillespie DG, Osaka K, Suzuki F, Jackson EK. Adenosine inhibits growth of rat aortic smooth muscle cells. Possible role of A2b receptor. *Hypertension*. 1996;27:786-793.
93. Dubey RK, Gillespie DG, Mi Z, Suzuki F, Jackson EK. Smooth muscle cell-derived adenosine inhibits cell growth. *Hypertension*. 1996;27:766-773.
94. Ikeda U, Kurosaki K, Ohya K, Shimada K. Adenosine stimulates nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 1997;35:168-174.
95. Firestein GS, Bullough DA, Erion MD, Jimenez R, Ramirez-Weinhouse M, Barankiewicz J, Smith CW, Gruber HE, Mullane KM. Inhibition of neutrophil adhesion by adenosine and an adenosine kinase inhibitor. The role of selectins. *J Immunol*. 1995;154:326-334.
96. Schrader J, Deussen A, Smolenski RT. Adenosine is a sensitive oxygen sensor in the heart. *Experientia*. 1990;46:1172-1175.
97. Schrader J. Adenosine. A homeostatic metabolite in cardiac energy metabolism. *Circulation*. 1990;81:389-391.

98. Sakaguchi T, Sawa Y, Kitakaze M, Suzuki K, Nishimura M, Kaneda Y, Matsuda H. Ecto-5'-nucleotidase plays a role in the cardioprotective effects of heat shock protein 72 in ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Cardiovasc Res.* 2000;47:74-80.
99. Ethier MF, Chander V, Dobson JG, Jr. Adenosine stimulates proliferation of human endothelial cells in culture. *Am J Physiol.* 1993;265:H131-H138.
100. Kawashima Y, Nagasawa T, Ninomiya H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood.* 2000;96:2157-2162.
101. Kroll K, Decking UK, Dreikorn K, Schrader J. Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart. *Circ Res.* 1993;73:846-856.
102. Decking UK, Skwirba S, Zimmermann MF, Preckel B, Thamer V, Deussen A, Schrader J. Spatial heterogeneity of energy turnover in the heart. *Pflugers Arch.* 2001;441:663-673.
103. Armstrong JM, Chen JF, Schwarzschild MA, Apasov S, Smith PT, Caldwell C, Chen P, Figler H, Sullivan G, Fink S, Linden J, Sitkovsky M. Gene dose effect reveals no Gs-coupled A2A adenosine receptor reserve in murine T-lymphocytes: studies of cells from A2A-receptor-gene-deficient mice. *Biochem J.* 2001;354:123-130.
104. Day YJ, Li Y, Rieger JM, Ramos SI, Okusa MD, Linden J. A2A adenosine receptors on bone marrow-derived cells protect liver from ischemia-reperfusion injury. *J Immunol.* 2005;174:5040-5046.
105. Odashima M, Otaka M, Jin M, Komatsu K, Wada I, Matsuhashi T, Horikawa Y, Hatakeyama N, Oyake J, Ohba R, Linden J, Watanabe S. Selective A2A adenosine agonist ATL-146e attenuates acute lethal liver injury in mice. *J Gastroenterol.* 2005;40:526-529.
106. Lange-Sperandio B, Forbes MS, Thornhill B, Okusa MD, Linden J, Chevalier RL. A2A adenosine receptor agonist and PDE4 inhibition delays inflammation but fails to reduce injury in experimental obstructive nephropathy. *Nephron Exp Nephrol.* 2005;100:e113-e123.
107. Reece TB, Laubach VE, Tribble CG, Maxey TS, Ellman PI, Warren PS, Schulman AM, Linden J, Kern JA, Kron IL. Adenosine A2A receptor agonist improves cardiac dysfunction from pulmonary ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 2005;79:1189-1195.
108. Odashima M, Otaka M, Jin M, Komatsu K, Wada I, Matsuhashi T, Horikawa Y, Hatakeyama N, Oyake J, Ohba R, Linden J, Watanabe S. Selective adenosine A receptor agonist, ATL-146e, attenuates stress-induced gastric lesions in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005;20:275-280.
109. Mubagwa K, Flameng W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res.* 2001;52:25-39.
110. Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, Kojima H, Koshiba M, Caldwell C, Ohta A, Thiel M. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by

- hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:657-682.
111. Apasov SG, Koshiba M, Chused TM, Sitkovsky MV. Effects of extracellular ATP and adenosine on different thymocyte subsets: possible role of ATP-gated channels and G protein-coupled purinergic receptor. *J Immunol*. 1997;158:5095-5105.
 112. Huang S, Apasov S, Koshiba M, Sitkovsky M. Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood*. 1997;90:1600-1610.
 113. Lukashev DE, Smith PT, Caldwell CC, Ohta A, Apasov SG, Sitkovsky MV. Analysis of A2a receptor-deficient mice reveals no significant compensatory increases in the expression of A2b, A1, and A3 adenosine receptors in lymphoid organs. *Biochem Pharmacol*. 2003;65:2081-2090.
 114. Lukashev D, Ohta A, Apasov S, Chen JF, Sitkovsky M. Cutting edge: Physiologic attenuation of proinflammatory transcription by the Gs protein-coupled A2A adenosine receptor in vivo. *J Immunol*. 2004;173:21-24.
 115. Ley K, Gaetgens P, Fennie C, Singer MS, Lasky LA, Rosen SD. Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood*. 1991;77:2553-2555.
 116. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*. 1991;65:859-873.
 117. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell*. 1993;74:541-554.
 118. Alon R, Fuhlbrigge RC, Finger EB, Springer TA. Interactions through L-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow. *J Cell Biol*. 1996;135:849-865.
 119. Ley K, Kansas GS. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:325-335.
 120. Dunne JL, Collins RG, Beaudet AL, Ballantyne CM, Ley K. Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation. *J Immunol*. 2003;171:6105-6111.
 121. Dunne JL, Ballantyne CM, Beaudet AL, Ley K. Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood*. 2002;99:336-341.
 122. Ding ZM, Babensee JE, Simon SI, Lu H, Perrard JL, Bullard DC, Dai XY, Bromley SK, Dustin ML, Entman ML, Smith CW, Ballantyne CM. Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. *J Immunol*. 1999;163:5029-5038.
 123. van Buul JD, Hordijk PL. Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:824-833.

124. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998;91:3527-3561.
125. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;283:R7-28.
126. Ley K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol Rev*. 2002;186:8-18.
127. Sheikine Y, Hansson GK. Chemokines and atherosclerosis. *Ann Med*. 2004;36:98-118.
128. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*. 2004;95:858-866.
129. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest*. 1991;88:1121-1127.
130. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Jr., Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*. 1999;398:718-723.
131. Taub DD, Proost P, Murphy WJ, Anver M, Longo DL, van Damme J, Oppenheim JJ. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J Clin Invest*. 1995;95:1370-1376.
132. Schechter AD, Berman AB, Yi L, Ma H, Daly CM, Soejima K, Rollins BJ, Charo IF, Taubman MB. MCP-1-dependent signaling in CCR2(-/-) aortic smooth muscle cells. *J Leukoc Biol*. 2004;75:1079-1085.
133. Sheikine YA, Hansson GK. Chemokines as potential therapeutic targets in atherosclerosis. *Curr Drug Targets*. 2006;7:13-27.
134. Cronstein BN. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol*. 1994;76:5-13.
135. McCallion K, Harkin DW, Gardiner KR. Role of adenosine in immunomodulation: review of the literature. *Crit Care Med*. 2004;32:273-277.
136. Linden J. New insights into the regulation of inflammation by adenosine. *J Clin Invest*. 2006;116:1835-1837.
137. Baxter GF. Role of adenosine in delayed preconditioning of myocardium. *Cardiovasc Res*. 2002;55:483-494.
138. Eltzschig HK, Thompson LF, Karhausen J, Cotta RJ, Ibla JC, Robson SC, Colgan SP. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. *Blood*. 2004;104:3986-3992.
139. Fishman P, Bar-Yehuda S, Farbstein T, Barer F, Ohana G. Adenosine acts as a chemoprotective agent by stimulating G-CSF production: a role for A1 and A3 adenosine receptors. *J Cell Physiol*. 2000;183:393-398.

140. Gilbertsen RB. Adenosine and adenosine receptors in immune function. Minireview and meeting report. *Agents Actions*. 1987;22:91-98.
141. Soderback U, Sollevi A, Wallen NH, Larsson PT, Hjemdahl P. Anti-aggregatory effects of physiological concentrations of adenosine in human whole blood as assessed by filragnetometry. *Clin Sci (Lond)*. 1991;81:691-694.
142. Bouma MG, Stad RK, van den Wildenberg FA, Buurman WA. Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes. *J Immunol*. 1994;153:4159-4168.
143. Massaia M, Perrin L, Bianchi A, Ruedi J, Attisano C, Altieri D, Rijkers GT, Thompson LF. Human T cell activation. Synergy between CD73 (ecto-5'-nucleotidase) and signals delivered through CD3 and CD2 molecules. *J Immunol*. 1990;145:1664-1674.
144. Strohmeier GR, Lencer WI, Patapoff TW, Thompson LF, Carlson SL, Moe SJ, Carnes DK, Mrsny RJ, Madara JL. Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia. *J Clin Invest*. 1997;99:2588-2601.
145. Ledoux S, Runembert I, Koumanov K, Michel JB, Trugnan G, Friedlander G. Hypoxia enhances Ecto-5'-Nucleotidase activity and cell surface expression in endothelial cells: role of membrane lipids. *Circ Res*. 2003;92:848-855.
146. Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van De Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC, Colgan SP. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med*. 2004;200:1395-1405.
147. Narravula S, Lennon PF, Mueller BU, Colgan SP. Regulation of endothelial CD73 by adenosine: paracrine pathway for enhanced endothelial barrier function. *J Immunol*. 2000;165:5262-5268.
148. Zerneck A, Bidzhekov K, Ozuyaman B, Fraemohs L, Liehn EA, Luscher-Firzloff JM, Luscher B, Schrader J, Weber C. CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. *Circulation*. 2006;113:2120-2127.
149. Belkin M, Donaldson MC, Whittmore AD. Abdominal aortic aneurysms. *Curr Opin Cardiol*. 1994;9:581-590.
150. Ernst CB. Abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med*. 1993;328:1167-1172.
151. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997;349:1436-1442.
152. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
153. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*. 1973;180:1332-1339.
154. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:842-851.

155. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*. 2002;196:887-896.
156. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med*. 2003;9:61-67.
157. Huo Y, Ley KF. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2004;14:18-22.
158. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2002;14:123-128.
159. Tupin E, Nicoletti A, Elhage R, Rudling M, Ljunggren HG, Hansson GK, Berne GP. CD1d-dependent activation of NKT cells aggravates atherosclerosis. *J Exp Med*. 2004;199:417-422.
160. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1876-1890.
161. Rosenfeld ME, Tsukada T, Chait A, Bierman EL, Gown AM, Ross R. Fatty streak expansion and maturation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis*. 1987;7:24-34.
162. Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol*. 1981;103:181-190.
163. Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*. 1985;57:65-73.
164. Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*. 2004;55:503-517.
165. Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 1987;51:503-512.
166. Piedrahita JA, Zhang SH, Hagan JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:4471-4475.
167. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992;71:343-353.
168. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992;258:468-471.
169. Thorngate FE, Rudel LL, Walzem RL, Williams DL. Low levels of extrahepatic nonmacrophage ApoE inhibit atherosclerosis without correcting hypercholesterolemia in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1939-1945.

170. Tangirala RK, Pratico D, FitzGerald GA, Chun S, Tsukamoto K, Maugeais C, Usher DC, Pure E, Rader DJ. Reduction of isoprostanes and regression of advanced atherosclerosis by apolipoprotein E. *J Biol Chem.* 2001;276:261-266.
171. Kelly ME, Clay MA, Mistry MJ, Hsieh-Li HM, Harmony JA. Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cell Immunol.* 1994;159:124-139.
172. Ali K, Middleton M, Pure E, Rader DJ. Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo. *Circ Res.* 2005;97:922-927.
173. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest.* 1993;92:883-893.
174. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:4431-4435.
175. Witting PK, Pettersson K, Ostlund-Lindqvist AM, Westerlund C, Eriksson AW, Stocker R. Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *FASEB J.* 1999;13:667-675.
176. Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem.* 1979;100:95-97.
177. Kreisel D, Krupnick AS, Szeto WY, Popma SH, Sankaran D, Krasinskas AM, Amin KM, Rosengard BR. A simple method for culturing mouse vascular endothelium. *J Immunol Methods.* 2001;254:31-45.
178. Kobayashi M, Inoue K, Warabi E, Minami T, Kodama T. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *J Atheroscler Thromb.* 2005;12:138-142.
179. Dejana E, Callioni A, Quintana A, de Gaetano G. Bleeding time in laboratory animals. II - A comparison of different assay conditions in rats. *Thromb Res.* 1979;15:191-197.
180. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis.* 1987;68:231-240.
181. Romeis B. *Mikroskopische Technik.* 1968. R-Oldenbourg-Verlag, München; Wien.
182. Braun N, Lenz C, Gillardon F, Zimmermann M, Zimmermann H. Focal cerebral ischemia enhances glial expression of ecto-5'-nucleotidase. *Brain Res.* 1997;766:213-226.
183. Ripellino JA, Klinger MM, Margolis RU, Margolis RK. The hyaluronic acid binding region as a specific probe for the localization of hyaluronic acid in tissue sections. Application to chick embryo and rat brain. *J Histochem Cytochem.* 1985;33:1060-1066.

184. Ledoux S, Laouari D, Essig M, Runembert I, Trugnan G, Michel JB, Friedlander G. Lovastatin enhances ecto-5'-nucleotidase activity and cell surface expression in endothelial cells: implication of rho-family GTPases. *Circ Res.* 2002;90:420-427.
185. Ozuyaman B, Ding Z, Buchheiser A, Koszalka P, Braun N, Godecke A, Decking UK, Zimmermann H, Schrader J. Adenosine produced via the CD73/ecto-5'-nucleotidase pathway has no impact on erythropoietin production but is associated with reduced kidney weight. *Pflugers Arch.* 2006;452:324-331.
186. Picher M, Burch LH, Hirsh AJ, Szychala J, Boucher RC. Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J Biol Chem.* 2003;278:13468-13479.
187. Yoneyama Y, Kobayashi H, Kato M, Chihara H, Yamada T, Otsubo Y, Araki T. Plasma 5'-nucleotidase activities increase in women with hyperemesis gravidarum. *Clin Biochem.* 2002;35:561-564.
188. Sunderman FW, Jr. The clinical biochemistry of 5'-nucleotidase. *Ann Clin Lab Sci.* 1990;20:123-139.
189. Castrop H, Huang Y, Hashimoto S, Mizel D, Hansen P, Theilig F, Bachmann S, Deng C, Briggs J, Schnermann J. Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice. *J Clin Invest.* 2004;114:634-642.
190. Volmer JB, Thompson LF, Blackburn MR. Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated adenosine production is tissue protective in a model of bleomycin-induced lung injury. *J Immunol.* 2006;176:4449-4458.
191. Olson EN, Arnold HH, Rigby PW, Wold BJ. Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell.* 1996;85:1-4.
192. Pham CT, MacIvor DM, Hug BA, Heusel JW, Ley TJ. Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:13090-13095.
193. De Sanctis GT, Merchant M, Beier DR, Dredge RD, Grobholz JK, Martin TR, Lander ES, Drazen JM. Quantitative locus analysis of airway hyperresponsiveness in A/J and C57BL/6J mice. *Nat Genet.* 1995;11:150-154.
194. Duguet A, Biyah K, Minshall E, Gomes R, Wang CG, Taoudi-Benchekroun M, Bates JH, Eidelman DH. Bronchial responsiveness among inbred mouse strains. Role of airway smooth-muscle shortening velocity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:839-848.
195. Guerassimov A, Hoshino Y, Takubo Y, Turcotte A, Yamamoto M, Ghezzi H, Triantafillopoulos A, Whittaker K, Hoidal JR, Cosio MG. The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:974-980.
196. Ma B, Blackburn MR, Lee CG, Homer RJ, Liu W, Flavell RA, Boyden L, Lifton RP, Sun CX, Young HW, Elias JA. Adenosine metabolism and murine strain-specific IL-4-induced inflammation, emphysema, and fibrosis. *J Clin Invest.* 2006;116:1274-1283.

197. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest.* 2001;108:391-397.
198. Weitz-Schmidt G. Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23:482-486.
199. Klotz U. Pharmacological comparison of the statins. *Arzneimittelforschung.* 2003;53:605-611.
200. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 2005;45:89-118.
201. Sanada S, Asanuma H, Minamino T, Node K, Takashima S, Okuda H, Shinozaki Y, Ogai A, Fujita M, Hirata A, Kim J, Asano Y, Mori H, Tomoike H, Kitamura S, Hori M, Kitakaze M. Optimal windows of statin use for immediate infarct limitation: 5'-nucleotidase as another downstream molecule of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circulation.* 2004;110:2143-2149.
202. Ueda Y, Kitakaze M, Komamura K, Minamino T, Asanuma H, Sato H, Kuzuya T, Takeda H, Hori M. Pravastatin restored the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning blunted by hypercholesterolemia in the rabbit model of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:2120-2125.
203. Osman L, Chester AH, Amrani M, Yacoub MH, Smolenski RT. A novel role of extracellular nucleotides in valve calcification: a potential target for atorvastatin. *Circulation.* 2006;114:1566-1572.
204. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74:1124-1136.
205. Minamino T, Kitakaze M, Morioka T, Node K, Komamura K, Takeda H, Inoue M, Hori M, Kamada T. Cardioprotection due to preconditioning correlates with increased ecto-5'-nucleotidase activity. *Am J Physiol.* 1996;270:H238-H244.
206. Komamura K, Kitakaze M, Funaya H, Ueda Y, Node K, Minamino T, Kurihara T, Hori M. Ecto-5'-nucleotidase mediates infarct size-limiting effect by ischemic preconditioning in the rabbit heart. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997;30:775-783.
207. Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation.* 2004;109:III39-III43.
208. Dejana E, Quintana A, Callioni A, de Gaetano G. Bleeding time in laboratory animals. *Thromb Res.* 1979;15:199-207.
209. Huo Y, Hafezi-Moghadam A, Ley K. Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions. *Circ Res.* 2000;87:153-159.
210. Minguet S, Huber M, Rosenkranz L, Schamel WW, Reth M, Brummer T. Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *Eur J Immunol.* 2005;35:31-41.

211. Poulsen SA, Quinn RJ. Adenosine receptors: new opportunities for future drugs. *Bioorg Med Chem*. 1998;6:619-641.
212. Abbracchio MP, Rainaldi G, Giammarioli AM, Ceruti S, Brambilla R, Cattabeni F, Barbieri D, Franceschi C, Jacobson KA, Malorni W. The A3 adenosine receptor mediates cell spreading, reorganization of actin cytoskeleton, and distribution of Bcl-XL: studies in human astrogloma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;241:297-304.
213. Abbracchio MP, Ceruti S, Barbieri D, Franceschi C, Malorni W, Biondo L, Burnstock G, Cattabeni F. A novel action for adenosine: apoptosis of astroglial cells in rat brain primary cultures. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;213:908-915.
214. de Mendonca A, Sebastiao AM, Ribeiro JA. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Brain Res Rev*. 2000;33:258-274.
215. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-1695.
216. Vitzthum H, Weiss B, Bachleitner W, Kramer BK, Kurtz A. Gene expression of adenosine receptors along the nephron. *Kidney Int*. 2004;65:1180-1190.
217. van Calker D, Muller M, Hamprecht B. Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature*. 1978;276:839-841.
218. Olsson RA, Pearson JD. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev*. 1990;70:761-845.
219. Sakamoto J, Miura T, Goto M, Iimura O. Limitation of myocardial infarct size by adenosine A1 receptor activation is abolished by protein kinase C inhibitors in the rabbit. *Cardiovasc Res*. 1995;29:682-688.
220. Neely CF, Keith IM. A1 adenosine receptor antagonists block ischemia-reperfusion injury of the lung. *Am J Physiol*. 1995;268:L1036-L1046.
221. Reichelt ME, Willems L, Molina JG, Sun CX, Noble JC, Ashton KJ, Schnermann J, Blackburn MR, Headrick JP. Genetic deletion of the A1 adenosine receptor limits myocardial ischemic tolerance. *Circ Res*. 2005;96:363-367.
222. Eckle T, Krahn T, Grenz Almut, Köhler D, Mittelbronn M, Ledent C, Jacobson Ma, Osswald H, Thompson LF, Unertl K, Eltzschig HK. Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors. *Circulation*. 2007;submitted.
223. Cerqueira MD. The future of pharmacologic stress: selective A2A adenosine receptor agonists. *Am J Cardiol*. 2004;94:33D-40D.
224. Daut J, Maier-Rudolph W, von Beckerath N, Mehrke G, Gunther K, Goedel-Meinen L. Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Science*. 1990;247:1341-1344.
225. Shryock JC, Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol*. 1997;79:2-10.

226. Edmunds NJ, Moncada S, Marshall JM. Does nitric oxide allow endothelial cells to sense hypoxia and mediate hypoxic vasodilatation? In vivo and in vitro studies. *J Physiol.* 2003;546:521-527.
227. Maddock HL, Broadley KJ, Bril A, Khandoudi N. Effects of adenosine receptor agonists on guinea-pig isolated working hearts and the role of endothelium and NO. *J Pharm Pharmacol.* 2002;54:859-867.
228. Grbovic L, Radenkovic M, Prostran M, Pesic S. Characterization of adenosine action in isolated rat renal artery. Possible role of adenosine A(2A) receptors. *Gen Pharmacol.* 2000;35:29-36.
229. Rump LC, Jabbari T, von K, I, Oberhauser V. Adenosine mediates nitric-oxide-independent renal vasodilation by activation of A2A receptors. *J Hypertens.* 1999;17:1987-1993.
230. Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, Hansen KR, Thompson LF, Colgan SP. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest.* 2002;110:993-1002.
231. Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA, Enjyoji K, Robson SC, Colgan SP. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J Exp Med.* 2003;198:783-796.
232. Huo Y, Ley KF. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14:18-22.
233. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schomig A, Neumann F. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis.* 2000;148:75-85.
234. Gawaz M, Page S, Massberg S, Nothdurfter C, Weber M, Fisher C, Ungerer M, Brand K. Transient platelet interaction induces MCP-1 production by endothelial cells via I kappa B kinase complex activation. *Thromb Haemost.* 2002;88:307-314.
235. Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Direct viewing of atherosclerosis in vivo: plaque invasion by leukocytes is initiated by the endothelial selectins. *FASEB J.* 2001;15:1149-1157.
236. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:8264-8268.
237. Roselaar SE, Kakkanathu PX, Daugherty A. Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apoE ^{-/-} and LDL receptor ^{-/-} mice. Decreasing density with disease progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:1013-1018.
238. Paulsson G, Zhou X, Tornquist E, Hansson GK. Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:10-17.

239. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 1999;145:33-43.
240. Zhou X, Stemme S, Hansson GK. Evidence for a local immune response in atherosclerosis. CD4+ T cells infiltrate lesions of apolipoprotein-E-deficient mice. *Am J Pathol*. 1996;149:359-366.
241. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:3893-3897.
242. Zhou X, Robertson AK, Rudling M, Parini P, Hansson GK. Lesion development and response to immunization reveal a complex role for CD4 in atherosclerosis. *Circ Res*. 2005;96:427-434.
243. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*. 2001;414:916-920.
244. Lappas CM, Sullivan GW, Linden J. Adenosine A2A agonists in development for the treatment of inflammation. *Expert Opin Investig Drugs*. 2005;14:797-806.
245. Butler JJ, Mader JS, Watson CL, Zhang H, Blay J, Hoskin DW. Adenosine inhibits activation-induced T cell expression of CD2 and CD28 co-stimulatory molecules: role of interleukin-2 and cyclic AMP signaling pathways. *J Cell Biochem*. 2003;89:975-991.
246. Caligiuri G, Levy B, Pernow J, Thoren P, Hansson GK. Myocardial infarction mediated by endothelin receptor signaling in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:6920-6924.
247. Hansen KR, Resta R, Webb CF, Thompson LF. Isolation and characterization of the promoter of the human 5'-nucleotidase (CD73)-encoding gene. *Gene*. 1995;167:307-312.
248. Montminy M. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem*. 1997;66:807-822.
249. Niemela J, Henttinen T, Yegutkin GG, Airas L, Kujari AM, Rajala P, Jalkanen S. IFN-alpha induced adenosine production on the endothelium: a mechanism mediated by CD73 (ecto-5'-nucleotidase) up-regulation. *J Immunol*. 2004;172:1646-1653.
250. Airas L, Niemela J, Salmi M, Puurunen T, Smith DJ, Jalkanen S. Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *J Cell Biol*. 1997;136:421-431.

9 Abkürzungen

A1	Adenosinrezeptor A1
A2a	Adenosinrezeptor A2a
A2b	Adenosinrezeptor A2b
A3	Adenosinrezeptor A3
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ado	Adenosin
AdoRA	Adenosinrezeptor A
ADP	Adenosindiphosphat
ALP	Alkalische Phosphatase
AMP	Adenosinmonophosphat
ApoE	Apolipoprotein E
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bEnd	<i>brain endothelium</i>
BSA	<i>Bovines (Rinder-)Serum Albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> (Zyklisches Adenosinmonophosphat)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy-desoxyribonuclein acid</i>
cGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i> (Zyklisches Guanosinmonophosphat)

CNT	<i>concentrative nucleoside transporter</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	Destiliertes Wasser
Dil-Ac-LDL	1,1'-Dioctadecyl-1,3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine perchlorate acetylated low-density lipoprotein
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
dNTP(s)	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
E 5`NT	Ecto 5`-Nukleotidase (CD73)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis (β-aminoethylether)-N,N- tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ENT	<i>equilibrative nucleoside transporter</i>
E-Selektin	<i>Endothelial</i> (endotheliales) Selektin
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat, manchmal als Abkürzung für Fluorescein
G _i	Inhibitorisches G-Protein
G _{olf}	olf für olfaktorische Rezeptoren; gehört zur stimulierenden G _s -G-Proteinfamilie

G _q	G-Protein, das Phospholipase C aktiviert
G _s	Stimulierendes G-Protein
HCT	Hämatokrit
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1piperazineethanesulfonic acid
HGB	Hämoglobin
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
Hyp	Hypoxantin
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule 1 (CD54)</i>
IL-	Interleukin
Ino	Inosin
KO	<i>knockout</i>
konz.	konzentriert
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LOVA	Lovastatin
Lsg.	Lösung
Lymp	Lymphozyten
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
max.	maximal
MCH	<i>mean corpuscular hemoglobin</i> (mittleres korpuskuläres Hämoglobin) Das MCH errechnet sich aus Hämoglobinkonzentration / Erythrozytenzahl.
MCHC	<i>mean corpuscular hemoglobin concentration</i> (mittlere korpuskuläre

	Hämoglobinkonzentration) Die MCHC errechnet sich aus Hämoglobinkonzentration / Hämatokrit.
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
MCV	<i>mean corpuscular volume</i> (mittleres korpuskuläres Volumen) Das MCV errechnet sich aus Erythrozytenzahl / Hämatokrit.
MPV	<i>mean platelet volume</i> (durchschnittliches Thrombozytenvolumen)
mRNA	<i>messenger Ribonuclein acid</i>
Neut	Neutrophile
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>Phosphate buffered saline tween</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PECAM	<i>platelet/endothelial cell adhesion molecule</i>
pH-Wert	Negativer dekadischer Logarithmus der $[H^+]$
P-LCR	<i>platelet distribution width,</i>
PLT	<i>Platelets</i> /(Plättchen)
PRAVA	Pravastatin
PRP	Plättchen reiches Plasma
P-Selektin	<i>Platelet – (Plättchen)-Selektin</i>
RBC	<i>Red Blood Cells</i>
RDW	<i>red cell distribution width</i> (Verteilungsbreite der Erythrozyten) Sie ist ein Maß für die Heterogenität der Erythrozytenpopulation.
RET	Retikulozyten

rpm	<i>Rotations per minute</i>
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription- <i>Polymerase chain reaction</i>
s.o.	Siehe oben
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
SIM	Simvastatin
SVAREC	<i>SV40-transfected aortic rat endothelial cell line</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB	<i>Tris buffer</i>
TE	<i>Tris-EDTA buffer</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRITC	Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule (CD106)</i>
Vgl.	vergleiche
w/v	<i>weight/volume</i>
WBC	<i>White Blood Cells</i>
WT	Wildtyp

10 Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Schrader und Herrn Prof. Dr. Heinz Mehlhorn für die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit. Herrn Prof. Schrader danke ich darüber hinaus für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur Arbeit in seinem Institut.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Herz- und Kreislaufphysiologie danke ich für das gute Arbeitsklima und die fachliche und technische Unterstützung, was mir beim Anfertigen dieser Arbeit von großer Hilfe war. Im Besonderen sei den Technischen Assistentinnen Barbara Emde, Daniela Haubs, Susanne Küsters, Barbara Patzer, Jutta Ziemann und Hülya Duzcu gedankt, die mit Ihrem ständigen Eifer und Ihrer Hilfsbereitschaft eine große Stütze im Laboralltag waren.

Herrn Schätz möchte ich für die technisch perfekten Umsetzungen meiner Ideen danken. So manch brauchbarer Helfer hat die Feinmechanische Werkstatt verlassen und ist im Labor erfolgreich zum Einsatz gekommen.

Für die gute Versorgung aller Versuchstiere und für stets gute Zusammenarbeit danke ich den Tierpflegerinnen und Tierpflegern Andrea Quadflieg, Marion Schröter und Andreas Zander.

Mein Dank gilt auch den mit uns kooperierenden Arbeitsgruppen um Herbet Zimmermann in Frankfurt, um Christian Weber in Aachen und um Klaus Ley in Charlottesville.

Für die sehr gute Zusammenarbeit, fachliche Beratung und zur Verfügungstellung technischer Ressourcen danke ich Jens Fischer und seinen Mitarbeitern aus dem Institut für Pharmakologie an der HHU Düsseldorf.

Für fachliche Beratung, vor allem aber für die weit darüber hinausgehende Freundschaft danke ich Marion Stoll, Christoph Jacoby und Uli Floegel.

Meinen Freunden Kerstin, Udo, Steffi, Melanie, den 4 Lorsbachs und allen nicht namentlich genannten gilt ein ganz besonderes Dankeschön für ständiges Motivieren und das Ertragen meiner schlimmsten Launen.

Für das Ermöglichen meines Studiums und dieser Arbeit sei zuletzt auch meiner Familie gedankt. Neben Anola und Max schliesst dies meine zukünftigen Schwiegereltern Helma und Heribert Pohland ein. Von Herzen danke ich Georg, der in zehn gemeinsamen Jahren stets zu mir gehalten hat.

11 Erklärung

Die hier vorliegende Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 20.02.2007

Anja Buchheiser

