

Aus der Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Zelluläre Mechanismen der Wirkung von Statinen beim Antiphospholipid-Syndrom

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Dominika Marová
Aus Levoča, Slowakische Republik

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

10. August 2023

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Historie des Antiphospholipid-Syndroms.....	3
2.2	Klassifikation des Antiphospholipid Syndroms.....	3
2.3	Symptome des APS.....	5
2.4	Katastrophales APS.....	6
2.5	Therapie des APS.....	6
2.5.1	Primäre Thromboseprophylaxe.....	6
2.5.2	Therapie und sekundäre Prophylaxe der Thrombosen.....	8
2.6	Pathophysiologie des Antiphospholipid-Syndroms.....	9
2.6.1	Antiphospholipid-Antikörper.....	9
2.6.2	Entstehung der Antiphospholipid-Antikörper.....	10
2.6.3	Lupus-Antikoagulans	11
2.6.4	Beta-2-Glykoprotein I	12
2.6.5	Zelloberflächenantigene in APS.....	13
2.7	Statine.....	18
2.7.1	Cholesterinbiosynthese	19
2.7.2	Pleiotrope Effekte der Statine und Atherosklerose	19
2.7.3	Pleiotrope Effekte der Statine und Immunmodulation.....	22
2.7.4	Pleiotrope Effekte der Statine und Koagulation.....	23
3	Zielsetzung.....	25
4	Materialien	26
4.1	Verbrauchsmaterialien.....	26
4.2	Reagenzien und Lösungen.....	27
4.3	Puffer.....	28
4.4	Medien und Mediensupplemente.....	28
4.5	Kits	29
4.6	Primer.....	29
4.7	Antikörper	29
4.8	Versuchstiere.....	29

4.9	Geräte.....	29
4.10	Software	31
5	Methoden.....	32
5.1	Zellbiologische Methoden	32
5.1.1	Zellkulturbedingungen	32
5.1.2	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen	32
5.1.3	Manuelle Zellzählung.....	33
5.1.4	Isolierung der mononuklearen Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aus Buffy-Coat .	33
5.1.5	Isolierung von primären menschlichen Monozyten aus PBMC mittels magnetischer Zellsortierung (MACS).....	34
5.1.6	Präparation der Milz für Isolierung von Mausmonozyten	34
5.1.7	Isolierung von Mausmonozyten mittels MACS	34
5.2	Aufreinigung monoklonaler Antiphospholipid- und Kontroll-IgG-Antikörper	35
5.3	Endotoxintest	35
5.4	Stimulations- und Inhibitionsversuche.....	36
5.5	Molekularbiologische Methoden	37
5.5.1	RNA-Isolierung.....	37
5.5.2	Reverse Transkription.....	38
5.5.3	Real-time qPCR	39
5.6	Konfokalmikroskopie.....	40
5.6.1	Prinzip der Konfokalmikroskopie.....	40
5.6.2	Lebendfärbung der Zellen für konfokale Mikroskopie	41
5.6.3	FITC-Markierung von Antikörpern für konfokale Mikroskopie	41
5.6.4	Präparation von F(ab) ₂ -Fragmenten.....	41
5.7	Koagulometrie	42
5.7.1	Prinzip der Koagulometrie.....	42
5.7.2	Clotting Assay	42
5.8	Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	43
5.8.1	Prinzip der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie.....	43
5.8.2	Anfärben der Mausmonozyten für Durchflusszytometrie	44
6	Ergebnisse	45
6.1	Statine inhibieren die HL5B-induzierte Zellaktivierung.....	45
6.2	Die Wirkung der Statine ist Mevalonat-unabhängig	48

6.3	Statine wirken auf der Zelloberfläche	50
6.4	Rolle von LBPA in der durch Statine -vermittelten Inhibition	53
6.5	HL5B-induzierte Zellaktivierung und Wirkstoffe, die die Cholesterinverteilung modulieren	56
6.6	Statine inhibieren die rJGG9-induzierte Zellaktivierung	59
6.7	Wirkung von Statinen in HUVEC.....	60
7	Diskussion.....	62
7.1	Simvastatin und Pravastatin hemmen die Hochregulierung von TNF α mRNA durch Lipid- bindende sowie Kofaktor-bindende aPL in Monozyten und Endothelzellen.....	62
7.2	Simvastatin und Pravastatin hemmen die Hochregulierung von TF mRNA und die Aktivierung des zellgebundenen TF durch Lipid-bindende aPL in Monozyten	63
7.3	Simvastatin hemmt Expression von TNF α mRNA in Monozyten Mevalonat-unabhängig....	64
7.4	Simvastatin wirkt auf der Zelloberfläche der Monozyten.....	65
7.5	Simvastatin hemmt kompetitiv die Bindung von Lipid-bindenden aPL an seinen Ligand EPCR/LBPA-Komplex.....	66
7.6	Der Einfluss von Cholesterinverteilung in der Zelle und Zellemembran auf die Zellaktivierung durch Lipid-bindende aPL.....	69
7.7	Simvastatin hemmt die Expression von TF mRNA in Endothelzellen sowohl Mevalonat- abhängig als auch Mevalonat-unabhängig.....	70
7.8	Behandlung mit Statinen in Antiphospholipid-Syndrom.....	72
7.9	Fazit und Ausblick.....	75
8	Abkürzungsverzeichnis.....	77
9	Literaturverzeichnis	81

1 Zusammenfassung

Statine werden häufig eingesetzt, um einen erhöhten Cholesterinspiegel zu senken und dadurch die Entstehung und Progression der Atherosklerose zu hemmen. In zahlreichen Studien wurde zudem berichtet, dass Statine auch entzündliche Prozesse bei Autoimmunerkrankungen wie dem Antiphospholipid-Syndrom (APS), Lupus erythematoses und multiple Sklerose eindämmen. Obwohl große Interventionsstudientudien noch fehlen, gibt es einige kleinere Studien, die zeigen, dass Statine das Thromboserisiko sowie die Schwangerschaftsmorbidität bei Patienten mit APS verringern können. Diese Beobachtungen werden durch Daten aus Tiermodellen sowie *in-vitro*-Studien gestützt. Der Schlüsselmechanismus hinter der entzündungshemmenden Wirkung der Statine scheint der Mangel an Zwischenprodukten der Cholesterinbiosynthese zu sein, die für Proteinprenylierung von Proteinen erforderlich sind. Die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase führt zu einer verminderten Produktion von Cholesterinbiosynthese-Zwischenprodukte, vor allem der Isoprenoide Farnesyl und Geranylgeranyl. Diese dienen unter anderem als Lipidanker für kleine GTPasen wie Rho, Ras und Rac. Die Reduktion ihrer Synthese beeinflusst somit die intrazelluläre Signalübertragung, den Vesikeltransport sowie Zellmigration und -wachstum. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Simvastatin und Pravastatin die Hochregulierung von TF- und TNF α -mRNA durch Lipid-bindende aPL und Kofaktor-bindende β 2GPI-aPL in Monozyten und Endothelzellen hemmen. Dieser Effekt trat innerhalb von Sekunden ein und war in Monozyten unabhängig von der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase, die den Hauptwirkungsmechanismus der Statine darstellt und die meisten pleiotropen Effekte der Statine erklärt. Die Induktion der Expression von TNF α wurde durch Simvastatin in einer Konzentration im unteren Nanomolbereich (10 nmol/l) vollständig gehemmt. Zudem konnte Simvastatin auch die Aktivierung von TF durch die Lipid-bindenden aPL und dadurch die prokoagulante Wirkung von aPL inhibieren. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Simvastatin mit einem neu entdeckten Oberflächen-Antigen für Lipid-bindende aPL – dem Komplex aus Endothelialelem-Protein-C-Rezeptor (EPCR) und dem Phospholipid Lysobisphosphatidsäure (LBPA) – interagiert und kompetitiv die Bindung von Lipid-bindenden aPL hemmt. Im Gegensatz zu Monozyten wirkte Simvastatin in Endothelzellen offenbar sowohl über Hemmung der Bindung von aPL an EPCR/LBPA als auch Mevalonat-abhängig. Die vorliegende Arbeit beschreibt einen neuen, bisher unbekanntem molekularen Mechanismus hinter der antikoagulanten und anti-inflammatorischen Wirkung der Statine in APS und trägt somit zum Verständnis der pleiotropen Effekte der Statine im Rahmen eines APS bei.

Statins are cholesterol-lowering drugs commonly used to prevent atherosclerotic cardiovascular disease and stroke. In addition to beneficial cardiovascular effect, statins seems to reduce inflammation in patients with autoimmune diseases such as antiphospholipid syndrome (APS), lupus erythematosus, and multiple sclerosis. Although large epidemiological studies are still lacking, there are several publications showing that statins reduce thrombosis risk and pregnancy morbidity in patients with APS - which are supported by the results from animal models and in vitro studies. The key mechanism behind the anti-inflammatory effect of statins appears to be the lack of intermediates of cholesterol biosynthesis. We show that simvastatin and pravastatin inhibit the upregulation of TF and TNF α mRNA by lipidreactive, cofactor-independent anti-cardiolipin aPL as well as by cofactor-dependent β 2GPI-aPL in monocytes and endothelial cells. The inhibitory effect of simvastatin occurred within seconds and was in monocytes independent of inhibition of HMG-CoA reductase, which is the main mechanism of action of statins and explains most of the pleiotropic effects of statins. The aPL-driven induction of TNF α expression was completely inhibited by simvastatin at low nanomolar concentration (10 nmol/L). In addition, simvastatin was also able to inhibit the activation of TF by lipid-reactive aPL and inhibit the procoagulant effect of aPL. Our results suggest that simvastatin interacts with a newly discovered surface antigen for lipid-reactive aPL- the complex of endothelial protein C receptor (EPCR) and the phospholipid lysobisphosphatidic acid (LBPA) - and competitively inhibits the binding of lipid-reactive aPL. In contrast to monocytes, simvastatin acted in endothelial cells both via inhibition of binding of aPL to EPCR/LBPA and in a mevalonate-dependent manner. This work describes a new, previously unknown molecular mechanism behind the anticoagulant and anti-inflammatory effects of statins in APS and contributes to the understanding of the pleiotropic effects of statins in APS.

2 Einleitung

2.1 Historie des Antiphospholipid-Syndroms

Das Antiphospholipid-Syndrom (APS) ist eine Autoimmunerkrankung, bei der zirkulierende Autoantikörper durch noch nicht vollständig geklärte Mechanismen das Thromboserisiko erhöhen. Diese Autoantikörper, zusammen als Antiphospholipid-Antikörper (aPL) bezeichnet, wurden erstmals 1905 von Paul von Wassermann zufälligerweise in einem Syphilis-Suchtest (Wassermann-Test) erfasst [1]. Schon bald nach der Entdeckung des Wassermann-Tests ist aufgefallen, dass dieser Syphilis-Test nur geringe Spezifität aufweist und häufig falsch positive Ergebnisse liefert. Später, in den vierziger Jahren, wurde der Zusammenhang zwischen falsch positiven Ergebnissen und diversen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise systemischem Lupus erythematodes (SLE), beobachtet [2]. Anders als ursprünglich angenommen, hat der Wassermann-Test keine Antikörper gegen *Treponema pallidum*, sondern Antikörper gegen negativ geladene Phospholipide detektiert. Das neue Antigen, das für falsch positive Ergebnisse im Wassermann-Test ursächlich war, wurde von C. Pangborn aus Ochsenherzen extrahiert und trägt deswegen den Namen Cardiolipin [3]. Zudem hat sich gezeigt, dass die im Wasserman-Test falsch positiven SLE-Patienten häufig verlängerte Gerinnungszeiten in vitro aufwiesen. Es wurde vermutet, dass die Gerinnungstests vom sogenannten „Lupus-Antikoagulans“ (LA) gehemmt werden und dass das LA dementsprechend zu Hämorrhagien in vivo führt [4]. Kurze Zeit später hat sich aber herausgestellt, dass dieses LA-Phänomen eher mit thrombotischen statt hämorrhagischen Diathesen einhergeht [5]. 1977 haben Manoharan et al. gezeigt, dass das LA-Phänomen auch in Abwesenheit von SLE oder anderen Kollagenosen auftreten kann [6]. Ein paar Jahre später (1983) wurde eine Assoziation zwischen LA und Schwangerschaftsverlusten berichtet [7]. In den Neunzigerjahren hat sich der Begriff Antiphospholipid-Syndrom durchgesetzt [8], wobei das primäre APS Patienten ohne eine Kollagenose in der Vorgeschichte bezeichnete [9]. Ebenfalls zu dieser Zeit wurden erste Fälle mit Multiorganversagen und positiven aPL beschrieben. Diese seltene Form des APS wurde Katastrophales APS (CAPS) genannt [10, 11].

2.2 Klassifikation des Antiphospholipid Syndroms

Die Klassifikation des APS basiert auf Sapporo-Kriterien, die 1999 festgelegt [12] und später 2006 als sog. Sydney-Kriterien [13] überarbeitet wurden. Das APS gilt als diagnostiziert, wenn mindestens ein klinisches und ein labormedizinisches Kriterium (Tab. 1) erfüllt sind. Im Vergleich zu Sapporo-Kriterien gibt es in den aktuellen Sydney-Klassifikationskriterien zwei wesentliche Veränderungen. Der Nachweis von Anti- β 2-Glykoprotein I-Antikörpern ($\alpha\beta$ 2GPI)

wurde als Laborkriterium für APS eingestuft und die Kontrolluntersuchung nach einem positiven Testergebnis sollte im Zeitabstand von mindestens 12 Wochen (statt bisher 6 Wochen) erfolgen. Zudem sollten zwischen Auftreten von klinischen Symptomen und dem Nachweis von aPL nicht mehr als 5 Jahre liegen [13].

Tab. 1: Sydney-Kriterien zur Klassifizierung des APS [13]

Klinische Kriterien

1. Vaskuläre Thrombosen

Eine oder mehrere klinische Episoden einer arteriellen oder venösen Thrombose in jedem Gewebe oder Organ, bildgebend oder histopathologisch nach objektiven validierten Kriterien bestätigt, ohne Vorliegen histologischer Zeichen einer Gefäßwandentzündung bei histopathologischer Untersuchung

2. Schwangerschaftskomplikationen

- a. Eine oder mehrere unerklärte Fehlgeburten eines morphologisch normalen Fetus in oder nach der 10. Schwangerschaftswoche (SSW)
 - b. Eine oder mehrere Frühgeburten eines morphologisch normalen Neugeborenen vor der 34. SSW aufgrund einer Eklampsie, schwerer Präeklampsie oder Plazentainsuffizienz
 - c. Drei oder mehrere ungeklärte aufeinanderfolgende Spontanaborte vor der 10. SSW ohne anatomische oder hormonelle Auffälligkeiten bei der Mutter oder genetische Ursachen bei den Eltern
-

Laborkriterien

1. **Positives Lupus-Antikoagulans**, zweimal oder mehrmals im Abstand von mindestens 12 Wochen, detektiert gemäß den Leitlinien von International Society on Thrombosis and Haemostasis

 2. **Anticardiolipin-Antikörper** des IgG und/oder IgM Isotyps, in mittlerem oder hohem Titer (z.B. ≥ 40 GPL/MPL-Einheiten oder größer als 99. Perzentil), mindestens zweimal im Abstand von mindestens 12 Wochen mit einem standardisierten ELISA im Serum oder Plasma gemessen

 3. **Anti- $\beta 2$ -Glykoprotein 1-Antikörper** des IgG und/oder IgM Isotyps, in einer Titerhöhe oberhalb des 99. Perzentils, mindestens zweimal im Abstand von mindestens 12 Wochen mit einem standardisierten ELISA im Serum oder Plasma gemessen
-

Die Diagnose des APS gilt als bestätigt, wenn mindestens eines der klinischen und eines der labormedizinischen Kriterien erfüllt sind

2.3 Symptome des APS

Das klinische Bild des APS ist charakterisiert durch venöse und arterielle Thrombosen, Schwangerschaftskomplikationen und eine moderate Thrombozytopenie [14]. Das Vorliegen von aPL kann ein sehr breites Symptomspektrum hervorrufen; von asymptomatischen Verläufen, über so genannte criteria- und non-criteria Symptome bis hin zum Multiorganversagen. Als criteria Symptome werden Symptome bezeichnet, die zu den klinischen Sapporo Kriterien zählen. Zu den häufigsten criteria-Symptomen gehören tiefe Beinvenenthrombosen 39%, habituelle Aborte vor der 10. Schwangerschaftswoche (35%) und Schlaganfälle (20%). Zu den häufigsten non-criteria Symptomen zählen Arthralgie (39%), Thrombozytopenie (30%), Livedo reticularis (24%) und Migräne (20%) [15]. Alle weiteren Symptome sind in der Tab. 2 aufgelistet. Im Bericht des vierzehnten Internationalen Kongress über aPL in Rio De Janeiro wurde empfohlen künftig die Klassifikationskriterien für APS durch Thrombozytopenie, Herzklappenerkrankung, renale Mikroangiopathie, Chorea und longitudinale Myelitis zu ergänzen [16]. Obwohl aPL das Risiko für Thrombosen und Schwangerschaftskomplikationen erhöhen, bleibt ein Großteil von aPL positiven Menschen asymptomatisch. Alleine ein positives Ergebnis im Test für aPL reicht daher nicht aus, um die Diagnose des APS zu stellen. Bisher wurde nicht vollständig geklärt, welche aPL als pathologisch angesehen werden sollen und warum einige Patienten schwere Verläufe entwickeln.

Tab. 2: Häufigkeit der Symptome bei Patienten mit primärem und sekundärem APS [15]

Symptome mit der Prävalenz \geq 30%		Ulcus cruris	6%
Tiefe Beinvenenthrombosen	39%	Amaurosis fugax	5%
Arthralgie	39%	Eklampsie	4%
Aborte von 10. SSW	35%	Arterielle Thrombosen in Beinen	4%
Thrombozytopenie	30%	Pseudovaskuläre Läsionen	4%
Symptome mit der Prävalenz \geq 20%		Venöse Thrombosen in Armen	3%
Arthritis	27%	Digitale Gangrän	3%
Livedo reticularis	24%	Arterielle Thrombosen in Armen	3%
Migräne	20%	Multiinfarktdemenz	3%
Schlaganfall	20%	Angina pectoris	3%
Symptome mit der Prävalenz \geq 10%		Myokardiopathie	3%
Abort nach oder in 10. SSW	17%	Herzklappenvegetationen	3%
Lungenembolie	14%	Renale Thrombosen/ Infarkt	3%
Schädigung der Herzklappen	12%	Retinaarterie- und -venenthrombose	3%
Thrombophlebitis	12%	Pulmonare Hypertensie	2%

Einleitung

Transiente ischämische Attacken	11%	Osteonekrose	2%
Hämolytische Anämie	10%	Kutane Nekrosen	2%
Präeklampsie	10%	Thrombosen der vena subclavia	2%
Symptome mit der Prävalenz < 10%		Gastrointestinale Manifestation (oesophageale und mesenteriale Ischemie)	2%
Epilepsie	7%		
Myokardinfarkt	6%	Chorea	1%

2.4 Katastrophales APS

Das katastrophale Antiphospholipid-Syndrom (CAPS) ist eine seltene (< 1% der APS-Patienten) aber sehr schwere Form des APS mit hoher Letalität. CAPS ist gekennzeichnet durch multiple Thrombosen, meistens in kleinen Gefäßen, Multiorganversagen und signifikant erhöhte aPL-Titer [17]. Häufig geht dem CAPS eine Infektion voraus. Anlässlich des 10. Internationalen Kongresses über aPL in Italien entstanden Klassifizierungskriterien für CAPS, die in der Tab. 3 zusammengefasst sind [18].

Tab. 3: Diagnostische Kriterien für CAPS

1) Beteiligung von 3 ≤ Organen, Systemen und/oder Geweben
2) Gleichzeitige Entwicklung der Symptome oder Entwicklung der Symptome innerhalb einer Woche
3) Histologische Bestätigung der Thrombosen in kleinen Gefäßen
4) Nachweis von aPL (aCL oder LA) *
Diagnose des CAPS gilt als gesichert, wenn alle vier Kriterien erfüllt sind. CAPS gilt als wahrscheinlich, wenn 3 von 4 Kriterien erfüllt sind (oder bei der Beteiligung von nur 2 Organen/ Systemen und/oder Geweben und Erfüllung von Kriterien Nr. 2,3 und 4).
* falls kein Nachweis von aPL oder/und LA vor CAPS vorliegt, muss das Ergebnis laut Sapporo-Kriterien für APS durch eine Kontrolluntersuchung bestätigt werden

2.5 Therapie des APS

2.5.1 Primäre Thromboseprophylaxe

Die Behandlung des APS besteht aus medikamentösen sowie nicht-medikamentösen Maßnahmen zur Vorbeugung und Behandlung von Thrombosen. Im Rahmen der primären und sekundären Prophylaxe empfiehlt es sich, Thromboserisikofaktoren zu minimieren. Zu den häufigsten Risikofaktoren zählen: Rauchen, Dyslipidämie, Diabetes Mellitus, arterielle Hypertonie, Übergewicht, längere Bettlägerigkeit, hormonale Kontrazeption und

postmenopausale hormonelle Therapie. Zusätzlich können bei Patienten weitere Risikofaktoren wie Schwangerschaft, Systemischer Lupus erythematodes oder Rheumatoide Arthritis vorliegen. Ob bei aPL-positiven Patienten zusätzlich zur Behandlung der Risikofaktoren eine primäre medikamentöse Thromboseprophylaxe notwendig ist, wird kontrovers diskutiert. 2014 erschien eine Metaanalyse von 10 Beobachtungsstudien und einer randomisierten Kontrollstudie (1208 Patienten und insgesamt 139 arteriellen oder venösen Ereignissen) zur primären Thromboseprophylaxe mit niedrig dosierter Acetylsalicylsäure (ASS) bei Patienten mit aPL. Die Studie zeigte einen signifikanten protektiven Effekt von ASS in Vergleich zu unbehandelten Patienten (Odd Ratio 0,5 [95 % CI: 0,27 – 0,93]). Die Analyse der Subgruppen zeigte ebenso einen protektiven Effekt von Aspirin bei: asymptomatischen aPL positiven Patienten (OR 0,5 [95 % CI: 0,25 – 0,99]), SLE- Patienten (OR 0,55 [95 % CI: 0,31 – 0,99]) und schwangeren Patientinnen mit SLE (OR 0,5 [95 % CI: 0,10 – 0,62]). Des Weiteren hat die Subgruppen-Analyse einen protektiven Effekt bei arteriellen (OR: 0.48 [95%CI: 0.28-0.82]) aber nicht bei venösen (OR: 0.58 [95% CI: 0.32-1.06]) Thrombosen gezeigt. Die Interpretation der Ergebnisse war jedoch aufgrund der Heterogenität der primären Studien limitiert. Das Risiko unter der Therapie mit ASS eine Thrombose zu erleiden, war nur bei retrospektiven aber nicht bei prospektiven Studien geringer [19]. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine neuere Studie der gleichen Forschungsgruppe, in der insgesamt 5 von 11 in der vorherigen Meta-Analyse eingeschlossenen Studien auf Patientenebene analysiert wurden [20]. Obwohl die Vorteile der vorbeugenden medikamentösen Therapie mit niedrig dosierter ASS bisher nicht ausreichend durch Studien belegt wurden, sollte diese Behandlung bei asymptomatischen aPL-positiven Patienten, mit oder ohne SLE, und bei Patienten mit vorherigen APS-assoziierten Schwangerschaftskomplikationen, mit zweifacher oder dreifacher aPL-Positivität, persistierendem LA oder persistierenden hohen aPL-Titern nach Nutzen-Risiko-Abwägung in Betracht gezogen werden. Hierbei sollten das individuelle Thrombose-Risiko sowie Blutungsgefahr und Refluxkrankheit als Nebenwirkungen der Therapie berücksichtigt werden [21]. Intensivierte Therapie mit niedrig dosierter ASS und Warfarin scheint nicht von Vorteil zu sein. In einer prospektiven Studie mit 166 Patienten wurde nach der Beobachtungszeit von 5 Jahren kein Unterschied in der Inzidenz von Thrombosen zwischen den beiden Gruppen, dafür aber 11 abnormale Blutungsereignisse in der Gruppe mit niedrig dosierter ASS und Warfarin (mit einem INR-Zielwert von 1,5) in Vergleich zu keinen Blutungen unter niedrig dosierter ASS beobachtet [22].

2.5.2 Therapie und sekundäre Prophylaxe der Thrombosen

Zur Prophylaxe und Therapie der thrombotischen Komplikationen bei APS werden in den allermeisten Fällen Antikoagulantien und Antiaggregantien eingesetzt. Eine immunmodulierende Therapie kommt trotz der Tatsache, dass APS durch Autoantikörper verursacht wird, viel seltener zum Einsatz. Medikamente, die gezielt mit aPL konkurrieren oder ihren Effekt neutralisieren, könnten künftig die Standardtherapie unterstützen oder sogar ersetzen.

Zur Therapie und Sekundärprophylaxe venöser Thrombose/-n in APS werden Vitamin K Antagonisten (VKA) mit einem INR-Zielbereich von 2,0 – 3,0 eingesetzt. Die Empfehlung beruht auf 2 randomisierten kontrollierten Studien, die erwiesen, dass eine Therapie mit VKA mit einer INR von 3,0 bis 4,0 keine Vorteile gegenüber einer Therapie mit einer INR zwischen 2,0 und 3,0 bringt. Insgesamt wurden 223 Patienten für ungefähr 3 Jahre beobachtet. In dieser Zeit erlitten 12 von 110 Patienten unter intensivierter Antikoagulation eine erneute Thrombose, unter der Standardtherapie waren es nur 5 von 113 [23, 24].

Zur Standardtherapie und Sekundärprophylaxe arterieller Thrombose/-n bei persistierenden aPL gehört die Behandlung mit VKA mit einem INR-Zielbereich von 2,0 bis 3,0, mit oder ohne LDA (low dose aspirin), oder eine intensiviertere VKA-Therapie mit einem INR-Zielbereich von 3,0 bis 4,0 [25]. Bisher gibt es keine Studien an großen Kohorten, die eine Überlegenheit einer der Standardtherapieoptionen gegenüber den anderen eindeutig beweisen konnte. Beim Versagen der Therapie mit VKA kann die Umstellung auf niedermolekulares Heparin (LMWH) erwogen werden.

Sekundärprophylaxe mit direkten oralen Antikoagulantien (DOAK) - Mittel der ersten Wahl bei venöser Thromboembolien für die Allgemeinbevölkerung [26] - scheint verlockend, da sie kein Monitoring des Gerinnungsstatus erfordert. Allerdings zeigte sich bei zwei kürzlich veröffentlichten, ähnlich aufgebauten Phase-III-Studien (536 und 190 Patienten), dass die Patienten während der Beobachtungszeit von 1,6 und 3 Jahren mehr thrombotische Ereignisse unter 20 mg Rivaroxaban (7,5%; 3,9%), als unter VKA mit einer Ziel-INR von 2,5 (0%; 2,1%) in der Vergleichsgruppe erlitten haben. Vor allem bei der Vorbeugung von arteriellen Thrombosen war Rivaroxaban weniger wirksam als VKA. Eine der Studien wurde vorzeitig abgebrochen [27, 28]. Demnach sollten DOAK vor allem nach arteriellen Thrombosen (Schlaganfall, Herzinfarkt, pAVK), sowie bei dreifach-positiven APS-Patienten und nach wiederholten Thrombosen vermieden werden [21]. Bei dreifach-positiven Patienten sind alle drei Messwerte (LA, aCL und β 2GPI-aPL) positiv. In zweifach positiven Laborbefunden sind

zwei von drei (meist LA negativ) und in einfach positiven nur einer von drei Messwerten positiv [29]. Die dreifache aPL-Positivität geht mit dem höchsten Thromboserisiko einher. Die einfach positiven Patienten haben das geringste Risiko [30, 31].

2.6 Pathophysiologie des Antiphospholipid-Syndroms

2.6.1 Antiphospholipid-Antikörper

Antiphospholipid-Antikörper (aPL) sind eine heterogene Gruppe von Autoantikörpern, die gegen Phospholipide und/oder Proteinen mit Affinität für Phospholipide (Kofaktoren) gerichtet sind. Diagnostik des APS basiert auf dem Nachweis von drei aPL: anti- β 2GPI, anti-CL und Lupus-Antikoagulans [13]. Alle anderen, mit APS assoziierten Antikörper werden als „non-criteria“ aPL bezeichnet. Nach Zielantigen werden aPL in drei Gruppen eingeteilt (siehe Tab.4). Bekannte Zielantigenen sind in der Tab.5 aufgelistet [32]. Zudem wurden bei APS-Patienten Antikörper gegen Gerinnungsfaktoren X [33], XII [34] sowie Protein C und Protein S gefunden [35].

Tab. 4: Subtypen der Anti-Phospholipid- Antikörper

Typ 1 Kofaktor-unabhängige aPL	aPL binden an Phospholipide in Abwesenheit jeglicher Kofaktoren
Typ 2 Kofaktor-abhängige aPL	aPL binden an Phospholipide nur in Anwesenheit von entsprechenden Protein-Kofaktoren
Typ 3 aPL gegen Kofaktoren	aPL binden direkt an Kofaktoren

Tab. 5: Ziel-Antigene der Antiphospholipid-Antikörper

Phospholipide	<ul style="list-style-type: none">– Cardiolipin– Phosphatidylserin– Phosphatidylinositol– Phosphatidylethanolamin– Lysobisphosphatid-Säure
Protein-Kofaktoren	<ul style="list-style-type: none">– Beta-2-Glykoprotein I– Prothrombin– Annexin II– Annexin V

2.6.2 Entstehung der Antiphospholipid-Antikörper

aPL sind eine heterogene Gruppe von Antikörper mit unterschiedlichen Eigenschaften und klinischer Bedeutung. Nicht alle aPL scheinen zu persistieren oder pathogene Eigenschaften zu haben. Einerseits entstehen beispielweise bei Syphilis aPL, die nicht mit Thrombosen oder habituellen Aborten assoziiert sind. Andererseits gibt es aPL, die eindeutig als pathologisch betrachtet werden. Die passive Immunisierung der Versuchstiere mit aPL, die aus den Seren von Patienten mit primärem APS gewonnen wurden, kann Thrombosen und fetale Resorptionen bei Tieren verursachen [36]. Nach der Immunisierung entwickelten die Mäuse selbst pathologische aPL, deren Titer über mehrere Monate konstant hoch blieben [37]. Obwohl sich das Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen in den letzten Jahren dramatisch verändert hat, ist relativ wenig über dem Ursprung des aPL und Auslösemechanismen für die Entstehung von pathologischen aPL bekannt.

Es gibt zwei Hinweise darauf, dass aPL durch Infektionen ausgelöst werden: Koinzidenz von aPL mit Infektionskrankheiten und strukturelle Ähnlichkeit von Pathogenstrukturen zu Wirtsmolekülen. Es ist allgemein bekannt, dass aPL mit unterschiedlicher Prävalenz bei zahlreichen viralen und bakteriellen Infektionen auftreten. *HIV*, *HBV*, *HCV*, *CMV*, *EBV*, *Parvovirus B19*, *Helicobacter pylori*, Streptokokken, Staphylokokken, *Salmonella*, *E. coli*, *Treponema pallidum*, *Micobacterium tuberculosis* und *M. leprae* sind nur einige Erreger [38, 39]. Die molekulare Mimikry, also die strukturelle Ähnlichkeit zwischen Strukturen von Pathogenen und den körpereigenen Molekülen, gilt dabei als Hauptmechanismus. Es wurden mehrere Analogien zwischen den Aminosäuresequenzen von β 2-Glykoprotein I und mikrobiellen Peptiden entdeckt. Entsprechende Antikörper gegen diese mikrobiellen Peptide könnten daher auch eine Autoimmunantwort auslösen. Um dies zu beweisen, wurden naive Mäuse entweder mit Pathogenen, die strukturellen Homologien zu β 2GPI besaßen, oder mit kurzen synthetischen, homologen Peptiden immunisiert. In beiden Versuchsgruppen haben immunisierte Mäuse aPL gebildet. [38, 40]. Passive Immunisierung von naiven Mäusen mit Antikörper gegen die kurzen Peptide hat zu APS-Symptomen wie erhöhter Fetalverlust geführt [41].

Eine weitere Hypothese schlägt vor, dass pathogene aPL aus natürlichen Antikörpern durch somatische Mutationen beim Kontakt mit einem fremden Antigen entstehen [42-44]. Natürliche Antikörper sind Antikörper, die nicht infolge vorangegangener Infektion oder Impfung entstehen und hauptsächlich gegen hoch konservierten Strukturmotiven von mikrobiellen Erregern, wie z.B. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs), gerichtet sind. Die

Spezifität und Affinität der natürlichen Antikörper ist in der Regel niedrig. Daher können sie auch an eine Reihe von ähnlichen körpereigenen Molekülen binden.

Auch das Mikrobiom und Oberflächen von apoptotischen Zellen könnten potenzielle immunogene Moleküle für aPL bieten [45, 46]. Aus den Versuchen mit keimfrei aufgezogenen Tieren, Modulation der Darmflora durch Probiotika und Antibiotika oder fäkaler Mikrobiota-Transplantation geht hervor, dass das Mikrobiom zur Entstehung mancher Autoimmunerkrankungen beiträgt [47-51]. Vieira et al. zeigten bei Mäusen, die spontan SLE und APS entwickeln, dass die Bildung von β 2GPI-Antikörpern und Thromben durch eine orale Gabe von Breitband-Antibiotika verhindert werden kann [45]. Bei der Apoptose werden negativ geladene Phospholipide zur Zelloberfläche transportiert, die auf der Plasmamembran lebensfähiger Zellen normalerweise nicht vorhanden sind. Dies ermöglicht die Interaktion der Phospholipide aus dem Zellinneren mit phospholipid-bindenden Proteinen wie beta-2-Glykoprotein I, wodurch ein neues Epitop für aPL entsteht könnte [52].

Es bleibt unklar, weswegen die meisten aPL-positiven Menschen keine APS-Symptome aufweisen. Eine Erklärung dafür bietet so genannte Second-Hit Theorie [53, 54]. Laut dieser Theorie stellt die Entwicklung von aPL nach antigenem Stimulus den first hit dar. Die entwickelten aPL erhöhen zwar die prokoagulante Aktivität führen jedoch noch nicht zur Thrombenbildung. Als Auslöser für Thrombosen wird ein weiterer Faktor – der second hit – benötigt. Potentielle Triggerfaktoren für einen second hit sind z.B. Infektionen, Malignome oder Operationen. So zeigte sich zum Beispiel im Mausmodell, dass die Thrombusbildung nach Immunisierung mit aPL von APS-Patienten (first hit) durch eine Verletzung der Gefäßwand (second hit) initiiert wurde [55].

2.6.3 Lupus-Antikoagulans

Unter Lupus-Antikoagulans (LA) versteht man aPL, die in vitro die Gerinnungszeit in Phospholipid-abhängigen Gerinnungstesten verlängern. Der Name resultiert aus dem Auftreten einer durch einen Inhibitor verlängerten aPTT bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses. Dieses Phänomen wurden erstmal 1952 von Conley and Hartmann beschrieben [56]. Eine verlängerte aPTT zeigt normalerweise eine verminderte Gerinnungsbereitschaft des Blutes an. Ursprünglich wurde daher vermutet, dass die LA-positiven Patienten zu Blutungen neigen [57]. Erst einige Jahre später wurden das LA in Zusammenhang mit Thrombosen gebracht [58]. Diese scheinbar paradoxe Verlängerung der aPTT-Gerinnungszeit in vitro, ist darauf zurückzuführen, dass die Gerinnungsfaktoren mit LA um Bindungsstellen auf Phospholipiden konkurrieren. Laut der Richtlinie der ISTH (International Society on

Thrombosis und Hemostasis) werden zwei funktionelle Screeningteste für Nachweis von LA empfohlen: Russel's Viper Venom Time (dRVVT) und lupussensitive aPTT [59]. Beide Teste enthalten einen verminderten Gehalt an negativ geladenen Phospholipiden. Bei einer Verlängerung der Gerinnungszeit in einem oder beiden Testverfahren sollte das LA als positiv betrachtet werden. Ein positives Ergebnis in Screeningtest/-en soll durch einen Plasmatauschversuch oder einen Bestätigungstest mit Überschuss an Phospholipiden bestätigt werden, um die Abhängigkeit des Inhibitors von Phospholipiden nachzuweisen und einen eventuellen Gerinnungsfaktor-Mangel auszuschließen. Gegen welche Antigene die aPL gerichtet sind, kann mithilfe der LA-Teste nicht nachgewiesen werden. Es handelt sich ausschließlich um funktionelle Teste, die zeigen, in welchem Maße die Gerinnung durch aPL gestört wird. Trotzdem gehört der Nachweis von LA zu wichtigen Testverfahren in der Diagnostik des APS. Mehrere Studien haben bestätigt, dass LA besser mit Thromboserisiko korreliert als α CL und $\alpha\beta$ 2GPI [60, 61].

2.6.4 Beta-2-Glykoprotein I

Das Serumprotein β 2-Glykoprotein I (β 2GPI) ist eines der Hauptantigene der kofaktor-abhängigen aPL. Das Glykoprotein setzt sich aus 326 Aminosäuren, aufgeteilt in fünf Domänen, zusammen [62]. Kristallisationsversuche und elektronenmikroskopische Bilder haben gezeigt, dass β 2GPI in mindestens zwei Konformationen vorliegt: im Serum in einer zirkulären Konformation, bei der die fünfte Domäne mit der ersten Domäne interagiert, und in einer offenen Form [63, 64]. Wenn β 2GPI an Phospholipide in Zellmembranen bindet, öffnet sich das Molekül und nimmt eine „Hockeyschläger“-Konformation ein. Durch die Konformationsänderung kommt es zu einer Demaskierung der sonst unzugänglichen Epitope, die von aPL erkannt werden [64]. Die physiologische Funktion von β 2GPI ist noch nicht vollständig verstanden. β 2GPI interagiert mit Phospholipiden und anderen Molekülen und spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der angeborenen Immunität, der Neutralisation von freien Radikalen und Hämostase [65]. Die β 2GPI-Defizienz bei Menschen hat keinen klaren Phänotyp. Bei β 2GPI-defizienten Personen wurden keine Auffälligkeiten in der Blutgerinnung sowie kein erhöhtes Thromboserisiko festgestellt [66, 67]. In einem Mausmodell führte die Deletion des Gens für β 2GPI zu verstärkter Autoimmunität [68]. β 2GPI kann mittels seiner fünften Domäne, die positiv geladene Aminosäuren enthält, negativ geladene Phospholipide wie Phosphatidylserin (PS) oder Cardiolipin binden [69, 70]. Während der Apoptose ändert sich die Zusammensetzung der Zellmembran. Eine der gut charakterisierten Änderungen ist die Exposition von PS auf der Außenseite der Membran [71, 72]. In einem Mausexperiment konnte gezeigt werden, dass die Bindung von β 2GPI an PS die Clearance der apoptischen Zellen durch

Phagozytose fördert. In dieser Studie wurden Liposomen, die PS enthielten, effektiver beseitigt, wenn das β 2GPI an den Liposomen gebunden war [73]. Auch bei der Clearance und Neutralisation von LPS scheint β 2GPI eine Rolle zu spielen. β 2GPI bindet an LPS und erhöht dessen Clearance aus der Zirkulation [74]. Außerdem kann β 2GPI mit Faktor H interagieren und hemmend auf den alternativen Weg des Komplementsystems wirken [75]. Eine weitere Studie gibt Hinweise darauf, dass neutrophile Granulozyten das β 2GPI in kleinere positiv geladene Peptide mit antimikrobieller Wirkung spalten können [76]. Weiter spielt β 2GPI eine Rolle bei der Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Ähnlich wie Glutathion besitzt das β 2GPI freie (reduzierte) Thiolgruppen und wirkt somit als Antioxidans bei oxidativem Stress. Eine retrospektive Studie zeigte, dass die Konzentration von oxidiertem β 2GPI und die Gesamtkonzentration von β 2GPI in APS-Patienten höher als bei Gesunden oder Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen sind [77]. Zudem wurde von der gleichen Arbeitsgruppe gezeigt, dass freie Thiolreste von β 2GPI die Endothelzellen vor Zellschädigungen durch ROS schützen [78]. Aus den Ergebnissen wurde eine Hypothese formuliert, dass oxidiertes β 2GPI an der Pathogenese des APS beteiligt ist und künftig als Thrombose-Biomarker bei APS eingesetzt werden könnte [77]. Des Weiteren wird die plasmatische Hämostase durch β 2GPI über zahlreiche Mechanismen beeinflusst [65]. So bindet β 2GPI an Annexin V oder aktiviertes Protein C und hemmt ihre antikoagulative Aktivität [79, 80]. β 2GPI kann aber auch die Aktivierung von Protein C hemmen. In einer in vitro Studie wurde die Interaktion von Protein C mit dem Thrombomodulin-Thrombin-Komplex durch β 2GPI gehemmt [80]. Der Thrombomodulin-Thrombin-Komplex ist ein starker Aktivator des Proteins C. Ebenfalls wurden viele gerinnungshemmende Effekte von β 2GPI beschrieben. β 2GPI kann die Bindung von Faktor XI und Protein C an den Apolipoprotein E Rezeptor 2 an der Thrombozyten-Zellmembran kompetitiv inhibieren [81, 82]. Zudem bindet β 2GPI an Faktor XI und schützt ihn vor Aktivierung durch Thrombin und Faktor XIIa [83]. β 2GPI kann außerdem indirekt die Fibrinolyse beeinflussen, indem es die Deaktivierung von t-PA durch PAI-1 hemmt und so die Fibrinspaltung herabreguliert [84].

2.6.5 Zelloberflächenantigene in APS

Unter der Annahme, dass aPL zelluläre Effekte über die Bindung von Zelloberflächenstrukturen auslösen, wurde die Charakterisierung von Antigenen der aPL, die in der Zellmembran lokalisiert sind, eines der Hauptziele der APS-Forschung. Obwohl bisher viele Oberflächenproteine in Zusammenhang mit APS gebracht wurden, blieben Zielantigene mancher aPL unbekannt (2022). Die Haupt-Oberflächenantigene für Kofaktor-abhängige aPL stellen Toll-like Rezeptor (TLR) 2, TLR 4, Annexin II, Annexin V und Apolipoprotein E

Rezeptor 2 (ApoER2) dar [85]. 2021 wurde von Müller-Calleja et al. ein neues Oberflächenantigen für Kofaktor-unabhängige aPL entdeckt – das Phospholipid Lysobisphosphatid-Säure (LBPA) präsentiert durch den Endothel-Protein-C-Rezeptor (EPCR) [86].

Die Bindung von aPL an ein Oberflächenmolekül ist der erste Schritt an der immunvermittelten Thrombogenese, gefolgt von der Signaltransduktion ins Zellinnere, Aktivierung von Signalkaskaden und anschließender Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die dann in den Zellkern wandern und die Genexpression von Zytokinen (z.B. IL-1, IL-6 und IL-8), von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1, ICAM-1 und E-Selectin) sowie von TF auslösen [87]. Die aPL-induzierte Aktivierung erfolgt über verschiedene Signalwege. Häufig werden p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK)-Signalwege, Nuclear factor kappa B (NF- κ B)-Signalwege [88-91], PI3K/Akt (Phosphatidylinositol 3-Kinase) - und mTOR (mechanistic Target of Rapamycin)-abhängige-Signalwege [92] mit dem APS in Verbindung gebracht.

2.6.5.1 Annexin A2

Annexin A2 (ANX2) gehört zur Gruppe der Ca^{2+} -abhängigen Phospholipid-bindenden Proteine an der Zelloberfläche von Monozyten, Endothelzellen sowie vielen Tumorzellen und beteiligt sich an membran-assoziierten Prozessen wie Endozytose, Exocytose, Adhäsion, Verbindung des Aktin-Zytoskeletts mit der Plasmamembran sowie Vesikeltransport [93]. Es wird postuliert, dass ANX2 ein Rezeptor für Plasminogen und gewebespezifischen Plasminogenaktivator (tPA) ist und als Kofaktor bei der Plasminogenaktivierung durch tPA fungiert, indem es Plasminogen und tPA in räumliche Nähe bringt [94-96]. ANX2-Knockout-Mäuse weisen eine verminderte Fibrinolyse und Fibrinanlagerungen in den kleinen Gefäßen der Niere, Lunge, Leber und der Milz auf [97]. Auf der anderen Seite gibt es Studien, die zeigen, dass ANX2 kein Rezeptor für Plasminogen und tPA, sondern für S100A10, das eigentliche Plasminogen- und tPA-bindende Protein, ist [98, 99]. Der Verlust des S100A10-Gens in S100A10-knockout-Mäusen führt zum gleichen Phänotyp wie bei ANX2-Knockout Mäusen [100]. ANX2 ist ins Visier der APS-Forschung geraten, als sich zeigte, dass ANX2 mit hoher Affinität β 2GPI bindet [101]. Die Bindung der α 2GPI/ β 2GPI-Komplexe an die Zelloberfläche erhöht auf eine ANX2-abhängige Weise die TF- und VCAM-1-Produktion in Endothelzellen sowie die TF-Synthese in Monozyten [102, 103]. Neben β 2GPI-Antikörpern können auch ANX2-Antikörper die ANX2-vermittelte Zellaktivierung induzieren. Cesarman-Maus et al. haben gezeigt, dass monoklonale ANX2-Autoantikörper die TF-Expression induzieren und die Fibrinolyse in Endothelzellen hemmen können. ANX2-Antikörper wurden bei APS-Patienten gefunden und sind assoziiert mit Thrombosen im Rahmen eines APS [104]. Der genaue Mechanismus der Zellaktivierung

durch ANX2/ β 2GPI-aPL ist noch nicht vollständig geklärt. ANX2 ist kein Transmembranprotein, weswegen eine Interaktion mit einem weiteren Protein, das die Signaltransduktion vermittelt, für die Zellaktivierung erforderlich ist [105]. Es wird vermutet, dass ANX2 indirekt oder direkt mit TLR4 interagiert. Mithilfe von Trennsäulen mit immobilisiertem ANX2 konnte TLR4 aus Endothelzellen isoliert werden [106]. Zudem wurde von Allen et al. gezeigt, dass ANX2 im Komplex mit TLR4, Calcineurin und Nukleolin auf der Oberfläche von Endothelzellen persistiert und die NF- κ B-abhängige Aktivierung auf β 2GPI-aPL vermittelt [107].

2.6.5.2 Annexin A5

Annexin A5 (ANX5) ist ein weiteres Mitglied der Annexin-Proteinfamilie und ist, wie Annexin A2, an der Regulation der Blutgerinnung beteiligt. ANX5 bindet Ca^{2+} -abhängig an die negativ geladenen Phospholipide der Zellmembran [108] und wirkt als ein Schild zwischen Endothel und Blut, der die anionischen Phospholipide vor einer Komplexbildung mit zirkulierenden Gerinnungsfaktoren abschirmt. Mehrere Studien haben gezeigt, dass aPL die Bildung regelmäßiger, kristallähnlicher Strukturen von ANX5 an der Zelloberfläche stören und so zur Entstehung der Thrombosen und Schwangerschaftskomplikationen beitragen. Die Ergebnisse dieser Studien basieren auf einem Gerinnungsassay [109, 110], bei dem die gemessene Gerinnungszeit in die antikoagulatorische Aktivität von ANX5 umgerechnet wird. In der Anwesenheit von aPL wird die ANX5- antikoagulatorische Aktivität vermindert, was als ANX5-Resistenz bezeichnet wird. In einer Studie von 70 Patientinnen mit schwangerschaftsassoziertem APS und 50 Patientinnen mit thrombotischem APS wurde ein signifikanter Unterschied in ANX5-Resistenz im Vergleich zu gesunden Probanden beobachtet [111]. Es gibt Hinweise darauf, dass die Resistenz nicht durch Anti-ANX5-Antikörper, sondern durch β 2GPI-aPL gegen Domäne I verursacht ist [111, 112].

2.6.5.3 TLRs

Toll-like Rezeptoren (TLRs) spielen eine zentrale Rolle bei der angeborenen Immunität. Sie erkennen sog. PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster) und DAMPs (Damage- also Schaden-assoziierte molekulare Muster). TLRs werden vor allem von antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen, aber auch von Nicht-Immunzellen wie Fibroblasten oder Endothelzellen exprimiert. Bei Menschen sind 10 TLRs bekannt (TLR1-TLR10). TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR10 befinden sich an der Zelloberfläche, TLR3, TLR7, TLR8, und TLR9 in Endosomen. Auf der Zelloberfläche lokalisierte TLRs erkennen verschiedene mikrobielle Membranbestandteile wie Lipide,

Lipoprotein und Proteine, darunter z.B. LPS, Peptidoglykan oder Flagellin. Endosomale TLRs erkennen virale und bakterielle Nukleinsäuren, wie virale einzel- und doppelsträngige RNA (ssRNA, dsRNA), insbesondere unmethylierte DNA-Sequenzen, die reich an Cytosin und Guanin oder endogene RNA aus beschädigten Zellen sind. Bei der Interaktion von mikrobiellen Keimen mit TLRs werden Signalkaskaden gestartet, die die Synthese von Zytokinen wie TNF α , IL-6 oder IL-1 β anregen [113, 114]. Im Zusammenhang mit APS wurde vor allem die Rolle von TLR4, TLR2, TLR7 und TLR8 untersucht [85]. Pierangeli et al. konnten in einem Mausmodell zeigen, dass die Thrombusbildung nach intraperitonealer Applikation von IgG-Fractionen aus APS-Patienten in TLR4 Knock-out Mäusen stark reduziert ist. [115]. TLR4 wird im diesen Kontext am wahrscheinlichsten durch anti- β 2GI-Antikörper aktiviert [116]. Für die TLR2-vermittelte Zellaktivierung durch aPL wird eine Kolokalisation mit TLR1 sowie TLR6 und anschließende Endozytose benötigt [117]. Prinz et al. zeigten, dass Lipid-bindende aPL hingegen die Translokation von TLR7 und TLR8 ins Endosom induzieren, wobei der Transport über die Plasmamembran führt. Im Ergebnis werden Monozyten und plasmazytoide dendritische Zellen auf diese Weise für TLR7/8-Agonisten sensibilisiert [118].

2.6.5.4 Apolipoprotein E Rezeptor 2

Apolipoprotein E Rezeptor (apoER2), bekannt als auch low density-lipoprotein (LDL) receptor- related protein 8 (LRP8) ist, wie der Name schon verrät, ein Rezeptor für das Apolipoprotein E (ApoE), ein Proteinbestandteil von Chylomikronen, sowie VLDL und HDL. Die Bindung von ApoE an apoER2 vermittelt die zelluläre Aufnahme dieser Lipoproteine. Weniger bekannt ist Reelin als zweiter Ligand für apoER2. Reelin ist ein extrazelluläres Glykoprotein, der die neuronale Migration des sich entwickelnden Gehirns steuert. Neben seiner Rolle in der frühen Entwicklung beteiligt sich Reelin an der Langzeitpotenzierung, einem wichtigen Prozess für Lernen und Gedächtnis. Deswegen wird vermutet, dass apoER2 in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit involviert ist. Für die Pathogenese des APS ist relevant, dass apoER2 von Monozyten, Endothelzellen und Thrombozyten exprimiert wird und durch β 2GPI/ α β 2GPI-Komplexe aktiviert werden kann. Chieko et al. zeigten, dass nach der Bindung von β 2GPI/ α β 2GPI-Komplexen an apoER2 die Aktivität der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und entsprechend die Stickstoffmonoxid- (NO) Synthese in Endothelzellen vermindert werden. Eine verminderte NO-Synthese führt zu endothelialer Dysfunktion und Thrombozytenaggregation. NO wirkt wegen seiner vasodilatativen Eigenschaften protektiv gegenüber Thrombosen. Zudem hat die gleiche Arbeitsgruppe eine erhöhte Migration und Adhäsion der Monozyten an Endothelzellen beobachtet. Im Mausmodell wurde die aPL-induzierte Blutgerinnselbildung in apoER2-

defizienten Mäusen signifikant reduziert [119, 120]. Eine deutliche Expression von apoER2 wurde in humanen Trophoblastzellen der Plazenta, sowie in murinen Trophoblasten nachgewiesen. Die Interaktion von β 2GPI/ α 2GPI mit apoER2 hat die Proliferation der Trophoblastzellen *in vitro* gehemmt. *In vivo* wurde bei Mäusen eine gesteigerte Rate fetaler Resorption und intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) beobachtet [121]. Dies lässt vermuten, dass die Interaktion von β 2GPI/ α 2GPI-Komplexen mit apoER2 auch bei Menschen für die Abortneigung bei APS verantwortlich sein könnte.

2.6.5.5 LBPA-EPCR

Kofaktor-unabhängige Lipid-bindende aCL wurden lange für nicht-pathologisch und nicht-thrombogen gehalten. Diese Behauptung folgte aus der Tatsache, dass Lipid-bindende aCL häufig bei viralen Erkrankungen gefunden werden. Es wurde sogar vorgeschlagen, die Kofaktor-Abhängigkeit als Maß zur Abschätzung des Risikos für Thrombosen heranzuziehen [122]. Später konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die Lipid-bindenden aCL eine Immunzellaktivierung auslösen und Thrombogenese fördern können [123]. Schlüsselschritt für die zelluläre Antwort auf Kofaktor-unabhängige aCL ist das endosomale Reduktions-Oxidations (Redox)-Signaling [124].

2021 entdeckten Müller-Calleja et al. einen dafür entscheidenden Phospholipid-Protein-Antigenkomplex bestehend aus Lysobisphosphatidsäure (LBPA) und Endothelalem-Protein C-Rezeptor (EPCR) [86]. Binden die aCL an diesen EPCR-LBPA-Komplex, werden sie durch wahrscheinlich ADP-Ribosylierungsfaktor-6 (Arf6) -abhängige Endozytose in die Zelle aufgenommen [125], woraufhin die endosomale Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase (NOX) 2 aktiviert wird. Die aktive NOX2 produziert Superoxid, das anschließend durch die Superoxid-Dismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt wird. Über redox-sensitive Transkriptionsfaktoren aktiviert H_2O_2 die Produktion von entzündlichen Molekülen wie NF- κ B, TLR7/8, TF und family pyrin domain containing 3 (NLRP3). Das NLRP3-Inflammasome ist ein Proteinkomplex des angeborenen Immunsystems und kann durch eine Vielzahl an Stimuli, unter anderem virale PAMPs, aktiviert werden. Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt zu proteolytischer Spaltung von Prä-IL-1 β zu aktivem IL-1 β [126]. Zusätzlich resultiert die endosomale NOX2 Aktivierung in der Translokation von TLR7/8 Molekülen aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) über die Plasmamembran in das Endosom wodurch sowohl Monozyten als auch plasmazytoide dendritische Zellen für TLR7/8-agonisten sensibilisiert werden [118]. Erhöhte TLR7/8-Expression in Monozyten und Translokation ins Endosom verstärken zusätzlich die angeborene Immunantwort auf virale Antigene, woraufhin pro-inflammatorischen Zytokine wie IFN α ,

TNF α und IL-1 β vermehrt synthetisiert werden. Auf diese Weise entsteht ein Teufelskreis, der zu einer verstärkten Autoimmunreaktion führt. Die verstärkte TLR7-Expression trägt wesentlich zur Induktion der Autoimmunität bei [127]. Zudem initiiert der TF aus aktivierten Monozyten die extrinsische Aktivierung der Gerinnungskaskade. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Lipid-bindenden Antikörper thrombogene Eigenschaften aufweisen und die NOX-defizienten Mäuse vor Thrombosen geschützt werden [128]. Müller-Calleja et al konnten zudem zeigen, dass bei sehr vielen APS-Patienten NOX2 aktivierende aPL-Antikörper vorliegen [126].

Neben dem EPCR-LBPA-Komplex sind für aCL-Internalisierung Korezeptoren notwendig. An ruhenden Monozyten liegt TF im Komplex mit aktivierten Faktor Xa und VIIa vor. Der gesamte TF-Xa-VIIa-Komplex wird von TFPI (Tissue factor pathway inhibitor) inhibiert [129]. Nach der Interaktion von aCL mit EPCR-LBPA löst sich der TFPI aus dem TF-FVIIa-FXa-TFPI-Komplex und der freiwerdende FXa kann Prothrombin zu Thrombin spalten. Anschließend aktiviert Thrombin den Protease-aktivierten Rezeptor (PAR) 1, der dann PAR 2 aktiviert. PAR2 spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen und dem endosomalem Signaling [130]. Dysregulation von PARs wurde bei mehreren chronischen Autoimmunkrankheiten beobachtet [131-133]. Für die Aufnahme von aCL in die Zelle wird außer den Gerinnungsfaktoren auch die Komplementaktivierung durch den Fc-Teil der Antikörper benötigt. aCL F(ab)₂-Fragmente können nicht internalisiert werden und bleiben an der Zelloberfläche [134].

2.7 Statine

Statine sind eine Gruppe von Medikamenten mit cholesterinsenkender Wirkung. Sie werden zur Behandlung der Hypercholesterinämie/-lipidämie in der primären sowie sekundären Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt [135-140]. Zu den Statinen gehören lipophile Vertreter wie Simvastatin, Atorvastatin, Lovastatin und Fluvastatin und Vertreter mit überwiegend hydrophilen Eigenschaften wie Pravastatin oder Rosuvastatin [141, 142]. Die lipidsenkenden Effekte der Statine beruhen auf der kompetitiven Inhibition der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) - eines der Schlüsselenzyme der Cholesterinsynthese. Infolge der verringerten Cholesterin-Synthese exprimieren Zellen mehr LDL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche sodass die Aufnahme des LDL-Cholesterins aus dem Blut steigt [143]. Darüber hinaus zeichnen sich die Statine durch viele sog. pleiotrope Effekte aus. Pleiotrope Effekte sind Wirkungen von Medikamenten, die unabhängig von ihrer Hauptwirkung sind. Bei Statinen versteht man darunter alle Effekte außer der Cholesterinsenkung. Insbesondere handelt es sich dabei um immunmodulierende Effekte. Eine der ersten Studien, die pleiotrope Effekte von Statinen beobachtet hat, war eine Studie von

Kobashigawa et al. an Patienten nach Herztransplantation. Diese Studie zeigte einen positiven Einfluss von Pravastatin auf das Gesamtüberleben und die Abstoßungsrate. Die Aktivität der natürlichen Killerzellen war in der Versuchsgruppe deutlich geringer als bei der Kontrollgruppe [144]. Eine zwei Jahre später veröffentlichte Studie zeigte einen positiven Einfluss von Simvastatin auf das Gesamtüberleben und Transplantatvaskulopathie nach Herztransplantation [145]. Zu gleichen Ergebnissen kamen auch tierexperimentelle Studien, in denen Statine unabhängig vom Cholesterinspiegel das Transplantatüberleben verlängerten [146-148]. Diese Beobachtungen lenkten die Aufmerksamkeit auf die möglichen, entzündungshemmenden Effekte von Statinen.

2.7.1 Cholesterinbiosynthese

Die Cholesterinsynthese lässt sich in 3 Stufen einteilen: Synthese von Isopreneinheiten, Kondensation von Isopreneinheiten zu Squalen und Zyklisierung und Umwandlung von Squalen zu Cholesterin. Der erste Schritt der Synthese von Isopreneinheiten ist die Kondensation von zwei Acetyl-CoA (Koenzym A) - Molekülen durch Thiolase zu Acetoacetyl-CoA. Anschließend kondensiert Acetoacetyl-CoA mit einem weiteren Acetyl-CoA-Molekül zu 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Die Reaktion wird durch HMG-CoA-Synthase katalysiert. HMG-CoA wird unter Verbrauch von NADH durch die HMG-CoA-Reduktase zu Mevalonat reduziert. Dieser Reaktionsschritt wird kompetitiv durch Statine gehemmt. Mevalonat wird unter ATP-Verbrauch zu Mevalonat-5-PP (Pyrophosphat) phosphoryliert und durch eine Decarboxylierung aktiviert, sodass ein aktives Isopren (Isopentenyl-PP und sein Isomer) entsteht. Mehrere aktive Isopreneinheiten (5C) kondensieren unter Abspaltung von Pyrophosphatgruppen zu Squalen (30C). Bei der Kondensationsreaktion werden Zwischenprodukte Geranyl-PP (10C) und Farnesyl-PP (15C) gebildet. Ein lineares Molekül von Squalen wird zu Lanosterin zyklisiert und durch weitere Reaktionen (Demethylierung, Entstehung einer Doppelbindung und Verschiebung einer Doppelbindung) in Cholesterin (C27) umgewandelt [149, 150].

2.7.2 Pleiotrope Effekte der Statine und Atherosklerose

Die meisten pleiotropen Effekte der Statine resultieren vermutlich aus der Verminderung von: Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylpyrophosphat (GPP), die Zwischenprodukte der Cholesterinsynthese sind und u.a. für die posttranslationale Modifikation von kleinen GTPasen wie Ras, Rho und Cdc42 erforderlich sind. Diese bedeutende Protein-Familie ist an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt. GTPasen regulieren die Signalübertragung, die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts und der Mikrotubuli sowie Zellwachstum, -differenzierung, -adhäsion, -migration, und -sekretion [151].

Einer der gut beschriebenen pleiotropen Effekte der Statine ist die Inhibierung des Rho/ROCK-Signalwegs [152]. Die Inhibierung der Isoprenylierung von Rho und seinem nachgeschalteten Zielprotein ROCK (Rho-assoziierte Proteinkinase) führt zur Relaxation der glatten Muskulatur der Blutgefäße [153]. Rho induziert ebenfalls die Expression des Peptids, Endothelin-1, was durch Statine gehemmt werden kann [154]. Des Weiteren kann durch Hemmung des Rho/RACK-Signalwegs die eNOS aktiviert werden. Das von eNOS produzierte Stickstoffmonoxid (NO) übt zahlreiche gefäßschützende Effekte aus und gilt als protektiver Faktor bei Atherosklerose. Außerdem ist der Rho/ROCK Signalweg an der Angiogenese [155] und Pathogenese der Hypertonie [156], kardialer Hypertrophie [157, 158], perivaskulärer Fibrose [159] und pulmonalen Hypertonie [155] beteiligt. Experimente mit direkten ROCK-Inhibitoren deuten auf weitere potenzielle positive Effekte von Statinen hin. Direkte ROCK-Inhibitoren wie Fasudil konnten den zerebralen Vasospasmus bei Patienten nach subarachnoidaler Blutung reduzieren [160]. Ein weiterer direkter ROCK-Inhibitor Y-27632 hemmte im Mausmodell die Entstehung der Atherosklerose nach Gefäßverletzung [158].

Atherosklerose wird auch als chronische entzündliche Erkrankung angesehen, bei deren Pathogenese oxidativer Stress eine bedeutsame Rolle spielt [161]. Oxidativer Stress ist durch eine hohe Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) charakterisiert, die in atherosklerotischen Plaques hauptsächlich von NADPH-Oxidasen (NOX) produziert werden [162]. Die Aktivität von NOX kann unter anderem durch eine kleine GTPase (Rac) [163] und oxidiertes LDL (oxLDL) gesteigert werden, welche beide von Statinen vermindert werden können. Weiter reduzieren Statine die Aufnahme von oxLDL in Monozyten/Schaumzellen und Endothelzellen durch Verringerung der Expression von Scavenger-Rezeptoren CD36 und LOX-1 (lectin-like oxLDL receptor 1) [164, 165]. Der Haupteffekt der Statine, die LDL-Cholesterinsenkung, trägt ebenso zur Verminderung von oxLDL bei [166]. ROS und oxLDL verschieben die intrazelluläre Redox-Balance und verstärken dadurch die Expression von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren, etwa NF- κ B, einer der Hauptregulatoren der Immunantwort, und PPAR- γ (Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor gamma) [167].

PPAR- γ wird stark in Makrophagen/Schaumzellen exprimiert. Die Aktivierung von PPAR- γ durch Statine erhöht die Transkription von ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) [168]. ABCA1 ist ein Membrantransportprotein, das an dem Efflux von Phospholipiden und Cholesterin aus den Zellen beteiligt ist und protektiv gegen Atherosklerose wirkt [169]. Bei einer Mutation im ABCA1-codierenden Gen im Rahmen der Tangier-Krankheit wird die Freisetzung des Cholesterins gestört, was zu einem HDL-Mangel führt [170].

Es ist allgemein bekannt, dass Stickstoffmonoxid (NO) einen protektiven, anti-atherosklerotischen Effekt hat. Es vermittelt die Vasodilatation und inhibiert die Thrombozytenaggregation, Leukozytenadhesion und Proliferation glatter Gefäßmuskulatur [171]. Die NO-Produktion durch die eNOS kann von Statinen auf Cholesterin-abhängige und Cholesterin-unabhängige Weise erhöht werden. Zu Cholesterin-anhängiger Wirkung zählt die LDL-Cholesterinsenkung, die über Verminderung der Gefäßentzündung zur Verbesserung der Endothelfunktion und dadurch zur verstärkten NO-Synthese führt [172]. Zu Cholesterin-unabhängigen Effekten gehören die Verlängerung der RNA-Halbwertszeit der eNOS (vermittelt durch Rho) [173], die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs [174] sowie die Hemmung der Expression von Caveolin-1 - ein Membranprotein, das die eNOS in Caveolae bindet und inaktiviert [175]. Der PI3K/Akt/eNOS- Signalweg wird wahrscheinlich durch Rho aktiviert [176]. Darüber hinaus erhöhen Statine die Expression der Hämoxigenase-1 (HO-1) [177]. HO-1 ist ein intrazelluläres Enzym, das Häm in Biliverdin und Bilirubin umwandelt. Außerdem wird HO-1 als Reaktion auf verschiedene Stressoren wie ROS, UV-Strahlung oder Zytokine exprimiert [178]. Eine Überexpression an HO-1 inhibierte die Atheroskleroseprogression in Mäusen mit Hypercholesterinämie [179, 180].

Instabile Plaques mit einer dünnen fibrösen Kappe und verringertem Kollagen sind anfällig für Erosion und Ruptur. Die Plaqueruptur wird u. a. durch die Freisetzung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) aus Monozyten in die extrazelluläre Matrix und den Abbau von Kollagen durch diese proteolytischen Enzyme gefördert. Die Sekretion des Prostaglandins E2 – Hauptprodukt der Cyclooxygenase-2 (COX-2) – erhöht die Expression der MMPs. Statine können die Plaquestabilität verbessern, indem sie die MMPs [181, 182] und COX-2 [183, 184] hemmen.

Tab. 6: Antithrombotische Wirkungen von Statinen

-
- Relaxation der glatten Muskulatur
 - Inhibition der ET-1 Expression
 - eNOS-Induktion und Steigerung der NO-Synthese
 - Inhibierung der NADPH-Oxidase und Verminderung der ROS-Synthese
 - Inhibierung der Aufnahme von LDL-Partikeln in Monozyten/Makrophagen
 - Erhöhung der PPAR- γ -Expression
 - Erhöhung des Effluxes von Phospholipiden und Cholesterin aus der Zelle
 - Inhibition der PAI-1 Expression
 - Induktion der HO-1-Expression
 - Erhöhung der Plaquestabilität
 - Verminderung der Expression von Matrix-Metalloproteasen
 - Senkung der COX-2-Aktivität
-

2.7.3 Pleiotrope Effekte der Statine und Immunmodulation

Entzündliche Prozesse spielen eine wichtige Rolle sowohl in der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten als auch im Rahmen der Atherosklerose. Die meisten immunologischen pleiotropen Effekte von Statinen wurden in Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen und T-Zellen nachgewiesen und sind häufig durch kleine GTPasen und/oder NF- κ B vermittelt. Kwak et al. haben gezeigt, dass verschiedene Statine die Expression von MHC II auf IFN- γ -Induktion in humanen Monozyten und Endothelzellen inhibieren [185]. Dieser Effekt resultierte aus der verminderten Expression Transaktivators der Klasse II (CIITA) - dem Schlüsselregulator der MHC-II-Expression, und beschränkte sich auf nicht-professionelle Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Die konstitutive Expression von MHC II in professionellen APC, wie B-Lymphozyten und dendritische Zellen, wurde nicht inhibiert. MHC-vermittelte Antigenpräsentation umfasst Endozytose, Verarbeitung des Antigens in der Zelle und die Präsentation durch MHC II auf der Zelloberfläche, wofür das Zytoskelett und kleine GTPasen essentiell sind [186]. Es wird daher spekuliert, dass Statine auch die konstitutionelle MHC II Präsentation stören könnten [151, 187]. MHC-II ist ein starker Aktivator von T-Lymphozyten, die als Antwort IL-2 freisetzen [185]. Daher hemmen Statine durch verringerte MHC II-Expression, indirekt, auch die T-Zell-Aktivierung. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass Statine den Shift von pro-entzündlichen T-Helfer-Zellen (Th) Typ 1 zu anti-inflammatorischen Th2 bewirken, was zu verminderter Sekretion von Th1-Zytokinen wie IL-2, IL-12, INF γ und TNF α und vermehrter Sekretion von eher endzündungshemmenden Th2-

Zytokinen, wie IL-4, IL-5, IL10 und TNF- β führte [187, 188]. Ein weiterer pleiotropher Effekt ist die Verminderung der Expression des NF- κ B. Die Hemmung dieses für die Immunantwort essenziellen Transkriptionsfaktors konnte durch Mevalonat aufgehoben werden [189-191], was darauf hinweist, dass sie durch die verminderte Isoprenylierung verursacht wurde. Zudem hemmen Statine die Transkription von Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM, V-CAM, E-Selectin und P-Selectin [192] sowie Chemokine wie das Monozyten-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1) [193]. Eine erhöhte Konzentration des C-reaktiven Proteins (CRP) im Blut ist ein Marker für entzündliche Prozesse und geht mit einem erhöhten Risiko für Herzinfarkt, Schlaganfall und periphere arterielle Verschlusskrankheit einher. Bei einer großen Studie zur Primärprävention von kardiovaskulären Erkrankungen hat sich gezeigt, dass Statine unabhängig von ihrem Haupteffekt den CRP-Spiegel senken. [194, 195].

Obwohl die allermeisten pleiotropen Wirkungen von Statinen höchstwahrscheinlich durch Hemmung der Isoprenylierung von kleinen GTPasen verursacht sind, wurde auch ein Mevalonat-unabhängiger Effekt beschrieben. Weitz-Schmidt et al. zeigte, dass Lovastatin direkt an das Lymphozyten-Funktions-assoziierte Antigen-1 (LFA-1) bindet und seine Interaktion mit ICAM-1 stört. So reduzierte Lovastatin die Adhäsion von Lymphozyten an Endothelzellen und die Kostimulation der T-Lymphozyten [196].

Tab. 7: Entzündungshemmende Wirkungen von Statinen

-
- Hemmung der INF- γ abhängiger MHC-II-Expression durch CIITA
 - Hemmung der T-Zell-Aktivierung und der Freisetzung von IL-2
 - Shift von pro-entzündlichen TH1 zu anti-entzündlichen Th2
 - Hemmung der NF- κ B-Expression
 - Verminderung der Expression von Adhäsionsmolekülen: ICAM-1, VCAM-1, E- und P-Selektin
 - Verminderung der Expression von MCP-1
 - Senkung des CRP-Spiegels
 - Störung der Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1
-

2.7.4 Pleiotrope Effekte der Statine und Koagulation

Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass Statine hemmend auf die Gerinnungskaskade wirken, sehr wahrscheinlich durch Inhibierung des PAI-1 (Gewebeplasminogenaktivator-Inhibitor-1) und des TF. Eine Metaanalyse von 16 randomisierten kontrollierten Studien ergab, dass die PAI-1-Konzentration im Serum von Patienten unter Statintherapie signifikant niedriger ist [197]. Dieser Effekt könnte der Modulation der Isoprenylierung von GTPase-Proteinen zugeschrieben werden. Ergebnissen aus in vitro-Studien zufolge wurde die PAI-1-Inhibierung

durch die verstärkte Aktivierung von PI3K/Akt-Signalwegen vermittelt [198] und konnte durch Geranylpyrophosphat aufgehoben werden [199]. Darüber hinaus können Statine in vitro die TF-Expression in Monozyten/Makrophagen [182, 190] und Endothelzellen [189, 200] inhibieren. Übereinstimmend damit weisen die Patienten, die nach Herztransplantation zusätzlich zur immunsuppressiven Therapie mit Statinen behandelt wurden, eine erniedrigte TF-Aktivität in Monozyten des peripheren Blutes auf [201]. Auch die Thrombozytenaggregation kann wahrscheinlich durch Statine gehemmt werden. Eine Statintherapie bei hypercholesterinämischen Patienten senkte das Cholesterin/Phospholipid-Verhältnis in Thrombozyten und die verminderte Plättchenaggregation. Daran sind vermutlich zwei Mechanismen beteiligt: LDL-Cholesterinsenkung und direkte Bindung von Statinen an Membranlipide der Thrombozyten, wodurch die Eigenschaften der Thrombozytenmembran geändert werden [202, 203]. In vitro Versuche mit Lipidmizellen legen nahe, dass lipophile Statine in die Lipidmembran eindringen und die Membranelastizität und -fluidität sowie Unordnung der Acylketten erhöhen können [149].

Tab. 8: Antikoagulante Wirkungen von Statinen

-
- Abfall der PAI-1-Serumkonzentration
 - Verminderung der TF-Expression
 - Hemmung der Thrombozytenaggregation
-

3 Zielsetzung

Statine senken den Cholesterinspiegel im Blut und hemmen dadurch das Entstehen und die Progression der Atherosklerose. Für die therapeutische Wirksamkeit der Statine ist jedoch nicht nur die Plasmacholesterin-Senkung verantwortlich. Ein wesentlicher Teil der anti-atherosklerotischen Effekte der Statine ist durch eine nicht-Cholesterin-senkende Wirkung sog. pleiotrope Effekte vermittelt. Statine verbessern beispielweise die Endothelfunktion durch Aktivierung der eNOS [204], hemmen die Aufnahme von oxLDL-Partikeln in Makrophagen [164, 165] und schützen vor Plaqueruptur [181], indem sie die Plaquestabilität erhöhen. Weiter beeinflussen Statine auch das Immunsystem (CRP-Senkung [194], Hemmung der T-Zellaktivierung [185, 196] und der Expression von MHC-II [185] sowie Adhäsionsmoleküle [192]) und die Blutgerinnung (Hemmung der Thrombozytenaggregation [203] und Synthese von TF [182, 205, 206]). Vor allem aufgrund ihrer anti-inflammatorischen Wirkungen rücken Statine seit Jahrzehnten immer mehr in Fokus der Forschung, mit dem Ziel, die therapeutischen Indikationen der Statine künftig um immunbedingte Krankheiten zu erweitern. In-vitro und in vivo Studien legen nahe, dass Statine die Krankheitsaktivität beim APS [206-210], bei SLE, bei der Rheumatoider Arthritis, und der multiplen Sklerose reduzieren [211].

Ziel dieser Doktorarbeit ist es, die Auswirkungen von Statinen auf die zellulären Effekte der beiden wichtigsten aPL-Subtypen (d. h. Lipid-bindende aPL und anti-2GPI aPL) und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Lipid-bindenden aPL in unterschiedlichen (für das APS relevante Zelltypen) zu untersuchen. Theoretisch sind mehrere Wirkmechanismen denkbar. Die meisten pleiotropen Effekte der Statine sind auf einen Mangel an Zwischenprodukten der Cholesterinbiosynthese zurückzuführen [212]. Es wurde aber auch beschrieben, dass Statine ganz unabhängig von der Inhibition der HMG-CoA-Reduktase allosterisch Rezeptor-Ligand-Bindungen modulieren [196]. Außerdem beeinflussen Statine die endosomale und lysosomale Lipidhomöostase, den intrazellulären Lipidverkehr und die Lipid-Zusammensetzung der Zellmembran, die Rezeptorfunktionen und Signalprozesse wichtig sind [213-216].

4 Materialien

4.1 Verbrauchsmaterialien

Material	Modell	Hersteller
Combitips	Combitips® advanced 10 ml, 5 ml, 1 ml, 0,5 ml	Eppendorf
Dialyseschlauch	Nadir® Zellulosehydrat 62,8 mm breit	Roth
Deckgläschen	24 x 32 mm	Menzel-Gläser
Glasflaschen	100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l	Schott Duran
FACS-Röhrchen	Rundbodenröhrchen aus Polystyrol 5ml	Falcon a Corning Brand
Kügelchen für Koagulometer	KC-4	Amelung
Küvetten für Koagulometer	Micro Cuvettes	Syco med
MACS Säulen	LS colums	Miltenyi Biotech
Monovetten	Citrat-Monovette	Sarstedt
Säule für Aufreinigung von Antikörpern	NAb™ Protein G Spin Column 5 ml	Thermo Scientific
Parafilm	Parafilm® M	Roth
PCR-Platten	96 PCR-Platte Halbrand flach	Sarstedt
Pipettenspitzen	0,1-10 µl TXL-10	Axygen
Pipettenspitzen	200 µl und 1000 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen	10/20 µl XL Graduated Filter Tip	Starlab
Pipettenspitzen	100 µl Bevelled Filter Tip	Starlab
Pipettenspitzen	1000 µl Filter Tip	Starlab
Polypropylen-Röhrchen	Cellstar® Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One
PCR-Einzelgefäß	Multiply-Pro, 0,2 ml	Sarstedt
PCR-Kette	PCR-8er-Kette Multiply-µStrip	Sarstedt
PCR- Verschlussfolien	Clear Seal Strong	Peqlab
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes Biopur	Eppendorf
Stabpipetten	CellstarR Serologische Pipetten 5 ml, 10ml, 25 ml	Greiner Bio-One
Ultrafiltrationseinheit	Vivaspin® 20, Vivaspin® 6 PES Membran 100000 und 50000 MWCO	Sartorius
Well-Platten	Nuclon™ Delta 24 Wells	ThermoFisher
Zellkulturflaschen	rot 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner Bio-One
Zellkulturflaschen	orange 75 cm ²	Corning Life Sciences
Rollerflasche	TC-behandelte Oberfläche, Easy Grip mit Belüftungsschraubverschluss, 2l	VWR
Chamber-Slides	Kammerobjektträger 15 µ-Slide 8 well	IBIDI

Materialien

Material	Modell	Hersteller
Zellsieb	Cell Strainer 70 µm und 100 µm	Falcon a Corning Brand

4.2 Reagenzien und Lösungen

Substanz	Hersteller
Ammoniumsulfat	Roth
Ampuwa Plastipur	Fresenius
BD FACS-Clean	Becton, Dickinson and Company
BD FACS-Flow	Becton, Dickinson and Company
BD Shutdown Solution	Becton, Dickinson and Company
β-Mercaptoethanol	Roth
18:1 BMP (S,R) [LBPA (S,R)]	Avanti Polar Lipids
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck
CD14 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec
CD115 MicroBead Kit, mouse	Miltenyi Biotec
DL-Mevalonsäurelacton	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Applichem
Fc-Rezeptor Blocker Azide-free	Innovex biosciences, Wako Chemicals
Glycin	Roth
Isopropanol	Roth
Isotonische Kochsalzlosung 0,9 %	Serag Wiessner GmbH & Co KG
Lipopolysaccharid (LPS) from Salmonella abortus equi	Enzo Life Sciences
LysoTracker Red DND-99	Life Technologies
Methyl-β-Cyclodextrin	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Merck
Niflumic Acid	Sigma-Aldrich
NucBlue	Invitrogen
Pravastatin	Sigma-Aldrich
RecomciPlasTin 2G	HemosIL
Simvastatin	Sigma-Aldrich
Terralin® liquid	Schülke
Terralin® protect	Schülke
Tris	Roth
Trypanblau	Biochrom
U18666A	Cayman Chemical Company

Materialien

4.3 Puffer

Puffer	Herrsteller
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)	Sigma-Aldrich
Ficoll	Lonza
Gesättigte Ammoniumsulfatlösung	500 g Ammoniumsulfat 850 mL aqua dest
Bindepuffer AK Aufreinigung	20 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,2)
Elutionspuffer AK Aufreinigung	0,1 M Glycin (pH 2,7)
MACS-Puffer	DPBS 0,5 % FCS 0,4 % EDTA
Neutralisationspuffer AK Aufreinigung	1 M Tris (pH 8,5)
Storage-Lösung	0,1 g Natriumazid
Red Blood Cell Lysing Buffer Hybri-Max	Sigma-Aldrich

4.4 Medien und Mediensupplemente

Medium/Supplement	Hersteller
Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) inkl. Endothelial Cell Growth Supplement	Promocell
FCS Südamerika	Life Technologies
GlutaMAX TM 100x	Gibco
IMDM	Sigma-Aldrich
Medium 199 mit Earle's Salzen (M199)	Bio&Sell
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (NEAA) 100x	Gibco
Natriumpyruvat 100 mM	Merck
Penicillin-Streptomycin 100x	Gibco
RPMI-1640	Sigma-Aldrich
RPMI-1640	Sigma-Aldrich

Komplett Medium	Zusammensetzung
ECGM Komplett Medium	ECGM inkl. Supplement 10 % FCS
IMDM Komplett Medium	IMDM 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin-Streptomycin
M199 Komplett Medium	M199 20 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin-Streptomycin
RPMI Komplett Medium	RPMI-1640 10 % FCS

Materialien

Komplett Medium	Zusammensetzung
	1 % L-Glutamin 1 % NEAA 1 % Natiumpyruvat

4.5 Kits

Kit	Hersteller
Blue S'Green qPCR Mix	Biozym
cDNA Synthesis Kit	Biozym
LAL chromogenic endotoxin assay kit, ToxinSensor™	GenScript
Pierce™ F(ab') ₂ Preparation Kit	Thermo Fisher Scientific
Pierce™ FITC Antibody Labeling Kit	Thermo Fisher Scientific
RNeasy Mini Kit	Qiagen

4.6 Primer

Gen-spezifischer Primer	Forward Primer	Reverse Primer
β-Aktin	GGCATCCTCACCTGAAGTA	GGGGTGTGAAGGTCTCAA
hTNFα	CTTCTCCTTCCTGATCGTGG	GCTGGTTATCTCTCAGCTCCA
hTNFα	AACATCCAACCTCCCAAACG	GACCCTAAGCCCCAATTCTC
hTF	GGGCTGACTTCAATCCATGT	GCTGCCAGAATAACAATGT

4.7 Antikörper

Antikörper	Isotyp	Markierung	Hersteller
HL5B	human IgG2b	keine	Eigenes Labor
HL5B	human IgG2b	FITC	Eigenes Labor
Kontroll-IgG	human IgG	keine	Eigenes Labor
Kontroll-IgG	human IgG	FITC	Eigenes Labor
rJGG9	human IgG1	keine	Yumab
Anti-EPCR 1650	mouse anti-mouse IgG	Alexa Fluor 647	AG Ruf
Anti-EPCR-LBPA 1682	Mouse anti-mouse IgG	Alexa Fluor 647	AG Ruf

4.8 Versuchstiere

Bezeichnung	Eigenschaften
C57BL/6	Wildtyp-Maus

Die Wildtyp-Mäuse wurde zur Gewinnung von murinen Monozyten aus der Milz verwendet. Die dafür eingesetzten Tiere wurden in der Zentralen Tierversuchseinrichtung der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz entsprechend des Tierschutzgesetzes gehalten.

4.9 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	V-75	Systemec

Materialien

Gerät	Modell	Hersteller
Brutschrank	CB150	Binder
Brutschrank	CB170	Binder
Durchflusszytometer	D FACS Canto Flow Cytometer	Becton, Dickinson and Company
Flaschenroller	Bench-Top Small Bottle Roller Apparatus	Wheaton
Hybridisierungssofen	Perfect Blot	Peqlab Biotechnologie GmbH
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr Premium	Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	-86C ULT Freezer	Thermo Forma
Gefrierschrank (-80°C)	TDE Series	Thermo Scientific
Geschirrspülmaschine	Miele professional G7883	Miele
Heat Sealer zum Verschließen von PCR-Platten	Heat Sealer	Eppendorf
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Konfokales Mikroskop	LSM 710 NLO	Zeiss
Kühlschrank	Economic Cooler	Bosch
Kühlschrank	Liebherr Profi Line	Liebherr
Kühlschrank	Thermo Cryotechnics CC1200	Thermo Scientific
Kugelcoagulometer	KC 4 A micro	Amelung
Magnetischer Zellenseparator	MACS Multistand + Midi MACS	Miltenyi Biotech
Magnetrührer	MR Hei-Standard	Heidolph
Mikroskop	Leica DMIL	Leica
Multipette	Multipette plus	Eppendorf
Multipette	Multipette M4	Eppendorf
Nanodrop	ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann
pH-Meter	Five Easy	Mettler Toledo
Pipette	0,5-10 µL	Eppendorf
Pipette	10-100 µL	Eppendorf
Pipette	100-1000 µL	Eppendorf
qPCR-Thermocycler	CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad
Schüttler (über Kopf)	VWR Tube Rotator	VWR
Sterilwerkbank	HS18	Heraeus
Thermocycler	Flex Cycler	Analytic Jena AG
Vortexmischer	Reagenzglas-Vortex-Schüttler	VWR
Vortexmischer	Vortex-T Genie2	Scientific Industries
Waage	MC1 Analytic AC 210S	Sartorius
Waage	MC1 Laboratory LC 2200S	Sartorius
Wasserbad	SW23	Julabo
Wasserdeionisierungs-anlage	Purelab Flex ELGA	Veolia
Zahlkammer	Neubauer, Tiefe 0,1 mm	Marienfeld
Zentrifuge	Centrifuge 5425 R	Eppendorf
Zentrifuge	GS-15R	Beckman
Zentrifuge	Micro Star 17R	VWR
Zentrifuge	Rotina 420 R	Hettich
Zentrifuge	Mikro 200	Hettich
Zentrifuge	Sprout Mini-Zentrifuge	Biozym

4.10 Software

Verwendungszweck	Software	Hersteller
Bildverarbeitung	Powerpoint 2016	Microsoft Corporation
Bildverarbeitung	Lsmix Confocal Microscopy Software 3.2.0	Zeiss
Literaturverzeichnis	EndNote 20	Clarivate Analytics
Datenanalyse	Excel 2016	Microsoft Corporation
Durchflusszytometrie	FACS Diva Software	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	FlowJo V10	FlowJo, LLC
Software für qRT-PCR	Bio-Rad CFX Manager und Maestro	Bio-Rad
Statistische Auswertung, Graphiken	GraphPad Prism 8 und 9	GraphPad Software
Textverarbeitung	Word 2016	Microsoft Corporation

5 Methoden

5.1 Zellbiologische Methoden

5.1.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden mit sterilen Materialien und unter einer Laminar-Flow Werkbank durchgeführt. Die Zellkulturen wurden in Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und unter mykoplasmenfreien Bedingungen kultiviert. Morphologie und Dichte der Zellen wurde regelmäßig im Mikroskop untersucht. Je nach Dichte wurden die Zellen alle 2 bis 4 Tage passagiert. In dieser Arbeit wurde mit der humanen monozytären Zelllinie, Monomac 1 (MM1), primären humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells - HUVEC), B-Zell-Hybridomazellen sowie mit primären murinen und humanen Monozyten gearbeitet. MM1 Zellen wurden im Jahr 1985 aus dem Blut eines 64-jährigen männlichen Patienten mit akuter monozytärer Leukämie isoliert. Morphologische, funktionelle und phänotypische Eigenschaften der MM1 Zellen ähneln sehr den Eigenschaften von reifen Monozyten, weswegen sie als Modell-Zelllinie für Studien gut geeignet sind [217]. Darüber hinaus verfügen sie über Vorteile, die für Kultivierung permanenter Zelllinien aus Tumorzellen charakteristisch sind, wie z.B. höhere Teilungsfähigkeit und Wachstum in Suspensio. MM1 wurden in RPMI Komplett Medium (siehe Kapitel 4.4.) kultiviert. HUVEC sind primäre, adhärenente Zellen, die in M199 Komplett Medium, ergänzt im Verhältnis 3:1 mit Endothelial Cell Growth Medium und mit 20% fetalem Kälberserum (FCS), in für adhärenente Zellen geeigneten Kulturflaschen kultiviert wurden. Primäre murine und humane Monozyten wurden nach der Isolierung in Multiwellplatten in RPMI Komplett Medium gehalten. Sämtliche Zellkulturen wurden regelmäßig auf Freiheit von Mykoplasmen untersucht. Die B-Zell-Hybridomzellen produzierten den in dieser Arbeit verwendeten Lipid-reaktiven monoklonalen aCL, HL5B. HL5B Antikörper wurden aus B-Zellen des peripheren Bluts eines APS-Patienten hergestellt und charakterisiert [218-220]. Zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurden die Hybridomzellen nach dem Auftauen in Rollerkulturflaschen in IMDM Komplett Medium kultiviert. Die Antikörper wurden aus dem Mediumüberstand gereinigt.

5.1.2 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in FCS mit 10% DMSO aufgenommen und in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Proben wurden in einen mit Isopropanol gefüllt Einfrierbehälter gestellt und über Nacht in einem -80°C Gefrierschrank gelagert. Dieser Einfrierbehälter sorgte für langsames Einfrieren der Proben (ca. -1°C/min). Am nächsten Tag wurden die gefrorenen Proben für die Langzeit-Lagerung in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff verbracht.

Eingefrorene Proben wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend in 10 ml lauwarms Kulturmiedium überführt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm wurde der Überstand entnommen und das entstandene Pellet in Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurden in eine Kulturflasche überführt und in den Inkubator gestellt.

5.1.3 Manuelle Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl pro ml haben wir die Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Zählkammer eignet sich gut zum Zählen von Leukozyten, Erythrozyten oder Thrombozyten. Für die Leukozyten-Zählung werden die 4 großen Quadrate in den Ecken des Zählnetzes verwendet, die jeweils in 16 kleinere Quadrate unterteilt sind. Jedes große Eckquadrat hat eine Fläche von 1mm² und Tiefe von 0,1 mm, was einem Volumen von 0,1 mm³ oder 0,1 µl entspricht. Um die Zellzahl pro ml zu berechnen, haben wir folgende Formel verwendet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Zellzahl in allen vier Quadraten}}{4 \times \text{Eckquadratvolumen(ml)} \times \text{Verdünnung}} \frac{1}{x}$$

Vor der Auszählung wurde eine Probe aus der Kulturflasche entnommen und mit 0,4% Trypanblau-Lösung angefärbt. Da die Zellsuspension dabei verdünnt wurde, muss diese Verdünnung bei der Bestimmung der Zellzahl pro ml berücksichtigt werden. Die Trypanblau-Färbung dient nicht nur zur Zählung, sondern liefert auch wichtige Informationen über Vitalität der Zellen. Die Membran der toten Zellen wird für den Farbstoff leicht durchlässig, sodass die toten Zellen im Lichtmikroskop als dunkle Punkte erscheinen. Die lebenden Zellen bleiben hingegen hell.

5.1.4 Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aus Buffy-Coat

Zur Isolierung von Monozyten wurden Leukozytenkonzentrate, sog. Buffy-Coats, aus der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz verwendet. Diese entstehen als Nebenprodukt durch die Zentrifugation aus einer Vollblutspende bei Herstellung von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten, aus denen die Leukozyten zur besseren Verträglichkeit der Blutprodukte entfernt werden müssen. Außer Leukozyten können Buffy-Coats auch kleine Mengen Erythrozyten und Thrombozyten enthalten. Zur Aufreinigung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurde die Buffy-Coats mit PBS-Puffer im Verhältnis 1:2 verdünnt. In 50 ml Falcons wurde je 15 ml Ficoll gegeben. Anschließend

wurde der verdünnte Buffy-Coat langsam in Falcons mit Ficoll überführt, damit es nicht zu einer Durchmischung beider Flüssigkeiten kommt und der Buffy-Coat eine Schicht über dem Ficoll bildet. Die Röhrchen wurden 30 min bei 1700 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Bei der Dichtegradientenzentrifugation sinken die neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten zu Boden der Zentrifugationsröhrchen. PBMCs setzen sich als weißer Ring zwischen Ficoll und Plasma ab. Dieser Zellring wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt

5.1.5 Isolierung von primären menschlichen Monozyten aus PBMC mittels magnetischer Zellsortierung (MACS)

Außer Monozyten beinhaltet die PBMC-Fraktion auch weitere mononukleäre Blutzellen wie Lymphozyten, NK-Zellen und dendritische Zellen. Um Monozyten zu gewinnen, werden die PBMCs für 15 min bei 4°C mit einem für Monozyten und Makrophagen spezifischen anti-CD14-Antikörper, der an Magnet-Partikel gekoppelt ist, inkubiert. Anschließend wurden die PBMCs auf eine Säule pipettiert, die in einem Magnetständer fixiert wurde. Beim Durchlauf der Zellsuspension durch die Säule, werden die mit magnetischen Partikeln markierten Monozyten in der Säule zurückgehalten, während unmarkierte Zellen ins Abfallröhrchen fallen. Nach Entfernen der Säulen aus dem Magnetständer wird die markierte Zellpopulation durch Durchspülen der Säule mit MACS-Puffer gewonnen. Für Stimulationsversuche wurden die primären Monozyten in RPMI-1640 Medium aufgenommen, gezählt und in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml ausplattiert.

5.1.6 Präparation der Milz für Isolierung von Mausmonozyten

Mausmonozyten wurden aus Milzen unbehandelter Mäuse isoliert. Nach Tötung der Maus durch zervikale Dislokation wurde die Haare über dem Abdomen entfernt und die Haut mit 70% Ethanol desinfiziert. Mit einer Schere wurde zunächst Haut und anschließend darunterliegendes Peritoneum eröffnet. Nach Öffnen der Bauchhöhle wurde die Milz mit einer stumpfen Pinzette von umliegendem Gewebe befreit. Die Milzgefäße wurden mit der Schere durchgetrennt und die Milz wurde steril entnommen.

5.1.7 Isolierung von Mausmonozyten mittels MACS

Die entnommene Milz wurde anschließend über einem dichten Sieb mechanisch zerkleinert. Um möglichst viel Material zu gewinnen, wurde das Sieb mehrmals mit MACS-Puffer gespült. Erythrozyten in der Zellsuspension wurden mit 1 ml vorgewärmtem Red Cell Lysis Puffer lysiert. Nach Inkubation mit Lysepuffer für 5 min wurden die Zellen in MACS-Puffer aufgenommen und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Aus der Zellsuspension wurden die Mausmonozyten mit der MACS Methode (wie in 4.1.5 beschrieben) isoliert. Für die Isolierung

der murinen Monozyten wurde das CD115 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec) verwendet, bei dem die Zellen zunächst mit einem Fc-Blocker und im Anschluss mit anti-CD115-biotinylierten Antikörper inkubiert wurden. Nach Zugabe von Anti-Biotin-Beads konnte die Aufreinigung über die Magnetsäulen wie oben beschrieben erfolgen. Nach der Isolierung wurden die Mausmonozyten in RPMI-1640 Medium aufgenommen, gezählt und in gewünschter Dichte ausplattiert.

5.2 Aufreinigung monoklonaler Antiphospholipid- und Kontroll-IgG-Antikörper

Die aPL HL5B sowie Kontroll-IgG wurden aus dem Mediumüberstand von einer Antikörperproduzierenden Hybridomzelllinie isoliert. In einem ersten Schritt wurden Proteine im Medium durch eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung ausgefällt. Nach einstündigem Rühren bei 4°C wurden die ausgefällten Proteine bei 4500 rpm bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das entstandene Pellet in 10 ml Binding-Puffer resuspendiert. Resuspendierte Pellets wurden in einen Dialyseschlauch überführt und in ein Gefäß mit 1,5 l Binding-Puffer gegeben. Bei der Dialyse über Nacht auf einem Rührer im Kühlschrank konnte Ammoniumsulfat aus den Dialyseschlauch durch die Poren der semipermeablen Dialysenmembran in die Lösung mit niedriger Konzentration diffundieren und somit von den hochmolekularen Antikörpern abgetrennt werden. Die eigentliche Aufreinigung der Antikörper erfolgte mit NAb Protein G Spin Columns von Thermo Scientific. In den Säulen befindet sich ein Granulat mit bakteriellem Protein G, das mit hoher Affinität an humanes IgG bindet. Vor Gebrauch wurden die Säulen durch mehrmaliges Waschen mit Binding-Puffer aquilibriert. Anschließend wurden die Proben auf Trennsäulen gegeben und in einem End-Over-End-Schüttler für 10 min gemischt. Die Trennsäulen wurden auf 50 ml Falcons gesetzt und für 1 min bei 21000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule dreimal mit 10 ml Bindings-Puffer gewaschen. Nach der Entfernung der ungebundenen Partikel aus der Säule wurden die Antikörper mit 5 ml Elutionspuffer (pH 2,7) durch Zentrifugation für eine Minute bei 2100 rpm eluiert. Um die Antikörper für möglichst kurze Zeit dem sauren Milieu auszusetzen, wurden in die Auffanggefäße jeweils 500 µl Neutralisationspuffer vorgelegt. Die IgG-Konzentration wurde im Nanodrop gemessen. Mithilfe von Santorius Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren wurden die Antikörperfraktionen in PBS umpuffert, bei Bedarf aufkonzentriert und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

5.3 Endotoxintest

Zur Bestimmung der Endotoxin-Konzentration der aufgereinigten Antikörperpräparationen wurde das ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit von GenScript verwendet. In

diesem Test wird ein Limulus Amebocyte Lysate (LAL), ein Extrakt aus den Blutzellen von Pfeilschwanzkrebsen, *Limulus polyphemus*, eingesetzt. Das Endotoxin aus den Lipopolysacchariden der Zellwand gramnegativer Bakterien katalysiert die Umwandlung von Faktor C (eines Proenzym im LAL) in seine aktive Form. Aktivierter Faktor C spaltet ein synthetisches, farbloses Substrat in ein gelbes Endprodukt. Die Intensität der Gelbfärbung wird photometrisch bestimmt und mit einer Standardkurve verglichen. Als Standard diente ein im Kit enthaltenes E.coli Endotoxin. Die untere Nachweisgrenze des Test liegt bei 0.005 EU (endotoxin units)/ml. Die Testdurchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Antikörper-Präparationen mit einer Endotoxin-Konzentration größer 0,1 EU/ml wurden verworfen.

5.4 Stimulations- und Inhibitionsversuche

Zellen für Stimulations-/Inhibitionsversuchen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml, bzw. 125.000 Zellen/ml bei HUVEC, in eine 24-Well Zellkulturplatte ausgesät. Die dazu erforderliche Menge an Zellsuspension wurde aus einer Kulturflasche in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden gezählt (wie in 5.1.3. beschrieben) und anschließend für 5 min bei 1500 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in frischem Medium resuspendiert und ausgesät.

Die eigentliche Stimulation erfolgte 12-24 Stunden nach dem Ausplattieren. Eine Ausnahme stellte die Stimulationsversuche mit rJGG9 Antikörper dar, bei denen die Stimulation 8 Stunden nach dem Ausplattieren durchgeführt wurde. LPS oder TNF α dienten als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde ein unspezifischer humaner monoklonaler IgG Antikörper verwendet, der ebenfalls wie oben beschrieben in unserem Labor hergestellt wurde. Alle Stimulantien und Inhibitoren außer Mevalonat wurden 15 bis 30 min vor Stimulation mit aPL zu den Zellen zugegeben. Mevalonat wurde gleichzeitig mit aPL zu den Zellen zugegeben. Nach 2 h (bei HUVEC), 3 h (bei MM1, primären humanen sowie murinen Monozyten) oder 15 h (im Falle der Stimulation mit rJGG9) Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt und die Zellen entweder unmittelbar weiterverarbeitet oder bei -80°C eingefroren.

Alle Reagenzien konnten direkt ins Medium zugegeben werden. Simvastatin musste vor Stimulation durch Hydrolyse seines Lactonrings aktiviert werden. Die Aktivierung erfolgt in vivo durch die CYP3A4 Isoform des CYP-450 Systems, in vitro durch Zugabe von Ethanol und Natriumhydroxid.

Tab. 9: Konzentration der eingesetzten Substanzen in 1 ml Zellsuspension

Antiphospholipid Antikörper	
HL5B	0,4 µg/ml
rJGG9	1 µg/ml
Positivkontrollen	
LPS	0,1 µg/ml
TNFα	0,05 µg/ml
Negativkontrolle	
Kontroll-IgG	0,4 µg/ml
Stimulantien/Inhibitoren	
LBPA	10 µM
Methyl-β-cyclodextrin	1 mM
Mevalonat	6 mM
Pravastatin	5 µg/ml
Simvastatin	1 ng - 10 µg/ml
U18666	5 µM

5.5 Molekularbiologische Methoden

5.5.1 RNA-Isolierung

Damit die Menge an mRNA bestimmt werden kann, muss die RNA zunächst aufgereinigt werden. Zur RNA-Reinigung wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Das Testkit enthält ein Säulensystem mit einer Silicagel-Membran und Reagenzien, die dafür sorgen, dass die RNA an die Silicagel-Membran bindet und andere Moleküle mit ähnlichen chemischen Eigenschaften ausgewaschen werden. Die Durchführung der RNA-Aufreinigung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Im ersten Schritt wurde zu den Zellen 300 µl RLT-Puffer zugegeben. Vor Gebrauch wurde dem RLT-Puffer β-Mercaptoethanol zugesetzt. β-Mercaptoethanol spaltet Disulfidbrücken in Proteinen und verstärkt so den denaturierenden Effekt von Guanidinisothiocyanat, womit die RNasen, die bei der Zellyse gleichzeitig mit der RNA aus den Zellen freigegeben werden, vollständig deaktiviert werden. Vor der ersten Zentrifugation wurde zu den lysierten Zellen noch 300 µl 70%iges Ethanol pipettiert, wodurch unter anderem die Bindung der RNA an die Silicagel-Membran unterstützt wird. Das entstandene Gemisch wurde auf eine Säule pipettiert und für 15 s bei 10 000 rpm zentrifugiert. Die im Sammelröhrchen aufgefangene Flüssigkeit (Durchfluss) wurde nach jeder Zentrifugation verworfen. Anschließend wurden die Säulen mit 700 µl RW1-Puffer gewaschen und wieder für 15 s bei 10 000 rpm zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden die Säulen zweimal mit RPE-Waschpuffer gewaschen. Vor dem ersten Gebrauch wurde der RPE-Puffer

mit 100%igem Ethanol im Verhältnis 1:4 verdünnt. Nach dem zweiten Waschen mit RPE-Puffer wurde die Säule für 2 min statt 15 s zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Die Säulen wurden anschließend auf neue Sammelröhrchen aufgesetzt und ohne Zugabe eines Puffers für 1 min bei Maximalumdrehungen zentrifugiert, um eine vollständige Trocknung der Membran zu erzielen. Überreste des Ethanols in der Säule stören das Ablösen der RNA von der Silicagel-Membran, was zu einer niedrigen RNA-Konzentration im Eluat führen würde. Im letzten Schritt wurden die Säulen in 1,5 ml Reaktionsgefäße platziert. Zum Auswaschen der RNA wurde 50 µl RNase freies Wasser auf die Säulen pipettiert. Durch erneute Zentrifugation für 1 min bei 10 000 rpm wurde die aufgereinigte RNA eluiert und im Reaktionsgefäß gesammelt.

5.5.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgte nach Herstellerangaben mit dem cDNA Synthesis Kit von Biozym. Genaue Angaben zum Reaktionsansatz befinden sich in der Tab 10. Der Testkit beinhaltet reverse Transkriptase, 2 Typen Primer (Oligo-(dT)-Primer und Hexamer-Primer) und alle vier Nukleoside (dNTP Mix), aus denen die cDNA komplementär zur RNA synthetisiert wird. Zudem enthält der Kit einen Reaktionspuffer und RNase-Inhibitoren. Oligo-(dT)-Primer sind 12- 18 Basen lange einzelsträngige Sequenzen von Desoxythymidin, die an den Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA binden. Hexamer-Primer sind kurze einzelsträngige Sequenzen mit einer zufälligen Basenkombination. Mit Random-Hexamer-Primer sind vor allem 5'-Bereiche der RNA von längeren Genen besser abgedeckt als mit Oligo-(dT)-Primer. Aus Reagenzien wurde immer frisch vor der Transkription Mastermix angesetzt. Der Ansatz wird zunächst für 10 min bei 30°C und anschließend für 40 min bei 52°C im Thermozykler inkubiert. Die reverse Transkription wird durch 5-minütige Inkubation bei 99°C beendet. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei 4°C gelagert, danach bei -20°C.

Tab. 10: Zusammensetzung des Ansatzes für reverse Transkription von RNA in cDNA je Probe

5× cDNA Synthesis Buffer	2 µl
dNTP Mix (je 10 mM)	1 µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl
Hexamer Primer (25 µM)	0,5 µl
Oligo (dT)12–18 (10 µM)	0,25 µl
RNase Inhibitor, 40 U/µl	0,25 µl
RNA-Template	5,5 µl

5.5.3 Real-time qPCR

Die qPCR bietet im Vergleich zu herkömmlichen PCR zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung. Dazu wird dem PCR-Ansatz ein Fluoreszenzfarbstoff, in unserem Fall SYBR Green, zugesetzt. SYBR Green binden an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA, wodurch seine Fluoreszenz stark erhöht wird. Die Fluoreszenz wird nach jedem PCR-Zyklus gemessen. Somit kann die Zunahme der DNA-Amplifikate in Echtzeit „real time“ beobachtet werden. Ab einer bestimmten Anzahl PCR-Zyklen beginnt die Fluoreszenz im „amplification plot“, exponentiell zu steigen, wobei sie einen konstanten Schwellenwert überschreitet. Die Anzahl der Zyklen, die nötig waren, um die Schwellenwertlinie zu erreichen, wird als Ct-Wert bezeichnet. Der Ct-Wert stellt ein Maß für die Ausgangskonzentration (Startmenge) einer DNA-/ RNA-Zielsequenz dar. Je kleiner der Ct-Wert ist, desto größer war die Startkopienzahl der Ziel-DNA/ -RNA. Ct-Werte wurden mithilfe des Bio-Rad CFX Manager/ Maestro Software ausgewertet. Über die sog. $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode lässt sich die DNA/ RNA-Startmenge relativ quantifizieren [221]. Bei der relativen Quantifizierung wird die relative Genexpression der experimentell behandelten Probe mit der Genexpression einer unbehandelten Kontrollprobe verglichen. Die relative Genexpression wird als Differenz zwischen dem Ct-Wert des Zielgens und dem Ct-Wert eines Referenzgens berechnet. Die Formel für Berechnung des relativen Genexpressionsunterschieds lautet, unter der Voraussetzung, dass sich die Menge der DNA in jedem Zyklus verdoppelt, wie folgt:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{Zielgen}) - \text{Ct} (\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{behandelte Probe}) - \Delta\text{Ct} (\text{Kontrollprobe})$$

$$\text{Relativer Genexpressionsunterschied} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Die Ergebnisse beziehen sich auf Expression des Referenzgens β -Aktin. Als Referenzgene eignen sich Gene, deren Expression sich gering, im Idealfall gar nicht, in Abhängigkeit vom Zelltyp und Zellzyklus ändert. Diesen Ansprüchen werden House-keeping-Gene gerecht. Die House-keeping-Gene werden konstitutiv, oft ubiquitär exprimiert und ermöglichen grundlegende Zellfunktionen wie Glukosemetabolismus oder sind, wie β -Aktin, ein Bestandteil des Zytoskeletts.

Am Ende der PCR-Reaktion wird eine Schmelzkurve des Produktes aufgenommen. Während der PCR können unspezifische Produkte oder Primer-Dimere entstehen. Da SYBR Green unspezifisch an alle entstandene dsDNA im Ansatz bindet, wird nach der abgelaufenen PCR, die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei steigt die Temperatur im Reagenziengefäß

kontinuierlich von 60°C auf 95°C an. Wird die Schmelztemperatur des Produkts erreicht, werden die doppelsträngigen Amplifikate in die einzelsträngigen aufgetrennt und die Fluoreszenz nimmt dementsprechend ab. Somit kann überprüft werden, ob in allen Proben spezifische Amplifikate entstanden sind.

Die qPCR-Reaktion wurde nach Herstellerangaben mit dem cDNA Synthese Kit von Biozym in einer 96-Well PCR-Platte in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt (siehe Tab. 11 und. 12).

Tab. 11: Zusammensetzung des Ansatzes für qPCR

S'Green BlueMix	10,0 µl
dH ₂ O	7,4 µl
Forward Primer	0,8 µl
Reverse Primer	0,8 µl
cDNA	1,0 µl

Tab. 12: qPCR-Protokoll

Initiale Denaturierung	2 min, 95°C	
Denaturierung	5 s, 95°C	Zyklus wird 40x wiederholt
Anealing und Elongation	25 s, 63°C	
Schmelzkurvenaufnahme	65- 95°C	

5.6 Konfokalmikroskopie

5.6.1 Prinzip der Konfokalmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Bilder wurden mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop Zeiss LSM 710 NLO und dazugehöriger Software aufgenommen. Bei der konfokalen Mikroskopie kann das Streulicht minimiert werden, wodurch eine bessere Auflösung der Aufnahmen erreicht wird. Im Gegensatz zur normalen Fluoreszenzmikroskopie wird das Präparat nicht im Ganzen beleuchtet, sondern das von der Lichtquelle erzeugte Licht wird durch eine Linse im Brennpunkt, d.h. in einer Ebene des Präparats fokussiert. Da die Fluoreszenz nur in einem Ausschnitt des Präparats (im Brennpunkt) angeregt wird, wird die Entstehung von Streulicht reduziert. Zudem befindet sich vor dem Detektor eine Lochblende, sodass nur das Licht aus der Fokusebene durch die Blende geht und den Detektor erreicht. Das restliche Licht wird durch die Blende absorbiert.

5.6.2 Lebendfärbung der Zellen für konfokale Mikroskopie

Für die Versuche wurden 1×10^6 MM1 Zellen pro Probe in 15 ml Falcon vorgelegt und bei 1700 rpm für 3 min zentrifugiert. Das alte Medium wurde abgesaugt, das Pellet in Fc-Rezeptor Block aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die unspezifische Bindung der stimulierenden Antikörper an Fc-Rezeptoren an der Oberfläche der Monozyten zu verhindern. Die Zellen wurden wieder bei 1700 rpm zentrifugiert, in farblosem RPMI Medium resuspendiert und für Stimulationsversuche auf Falcons verteilt. Vor Stimulation mit aPL wurden die Zellen mit Statinen und LBPA in den entsprechenden Wells für 30 min bei 37°C inkubiert. Statine sowie LBPA waren nicht fluoreszenzmarkiert. Nach Stimulation erfolgte die Zugabe von markierten Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen. Dafür wurden die Proben entweder mit FITC-markierten Kontroll-IgG- oder FITC-markiertem HL5B-Antikörper stimuliert, mit LysoTracker (Marker für saure Organellen wie Endo- und Lysosomen) und NucBlue (Markierung des Zellkerns) angefärbt und für 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal in farblosem RPMI Medium gewaschen und bis zum Mikroskopieren auf Eis gelagert. Zum Mikroskopieren wurden die Zellen in Chamber Slides pipettiert.

5.6.3 FITC-Markierung von Antikörpern für konfokale Mikroskopie

Für konfokale Mikroskopie wurden Antikörper HL5B und Kontroll-IgG mit dem Fluorophor Fluorescein isothiocyanat (FITC) markiert. FITC reagiert mit primären und sekundären Aminresten eines Proteins. Je mehr solche Aminreste ein Protein besitzt, desto mehr FITC-Moleküle können an das Protein gekoppelt werden und desto höher ist das Fluoreszenzsignal. Die Markierung der Antikörper erfolgte nach den Herstellervorgaben mit dem Pierce FITC Antibody Labeling Kit von Thermo Scientific. Hierfür wurden HL5B und Kontroll-IgG mit einem Amin-freien Puffer auf eine Konzentration vom 2 mg/ml verdünnt und mit dem FITC-Reagenz für 60 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde der ungebundene Fluoreszenzfarbstoff mit Hilfe einer Zentrifugensäule entfernt und die Konzentration und den Markierungsgrad des Proteins berechnet. Die markierten Antikörper wurden aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

5.6.4 Präparation von F(ab)₂-Fragmenten

Zur Präparation der F(ab)₂-Fragmenten des monoklonalen IgG-Antikörpers HL5B wurde das Pierce F(ab)₂-Präparationskit von Thermo Scientific verwendet. Die Herstellung und Aufreinigung von F(ab)₂-Fragmenten wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieses Kit enthält proteolytisches Enzym Pepsin und eine Zentrifugationssäule zur Aufreinigung der

erzeugten F(ab)₂-Fragmente. Pepsin kommt im Magensaft vor und kann im saurem Milieu u.a. Antikörper in ein F(ab)₂-Fragment und mehrere Fc-Fragmentstücke aufspalten. Nach 6-7 stündiger Inkubation mit Pepsin wurden die Proben mit einer Thermo Scientific NAb Protein A Plus Säule aufgereinigt, die ein Agarosegranulat beschichtet mit Protein A enthält. Protein A ist ein Protein in der Zellwand von Bakterien, das spezifisch an den Fc-Teil vor allem von IgG Antikörper bindet. Somit bleiben Fc-Fragmentstücke und ganze, unverdaute Immunglobuline bei der Aufreinigung in der Säule gebunden.

5.7 Koagulometrie

5.7.1 Prinzip der Koagulometrie

Mit koagulometrischem Messverfahren wird die Gerinnungszeit nach der Zugabe von Aktivatoren gemessen. Eine kleine Stahlkugel, die in einer Küvette liegt, wird von einem Magneten, der sich außerhalb der Küvette befindet, angezogen und beim Rotieren der Küvette um die senkrechte Achse, durch den Magneten an einer Stelle festgehalten. Nach Zugabe aller Reagenzien wird die Gerinnung gestartet. Durch Fibrinbildung erhöht sich die Viskosität der Lösung. Das Kügelchen kann sich im geronnenen Plasma nicht mehr frei bewegen und wird mit durch die Rotation der Küvette mitgenommen. Sobald das Kügelchen die Stelle, an der ein magnetischer Sensor anliegt, verlässt und anfängt sich mitzudrehen, wird die Zeit gestoppt. Aus der Gerinnungszeit lassen sich Rückschlüsse auf die Konzentration und Aktivität der Gerinnungsfaktoren ziehen. Die Messung läuft in der Regel bei 37°C ab.

5.7.2 Clotting Assay

In einem Clotting Assay, am Kugelkoagulometer, wurde der Effekt von Statinen auf die aPL-induzierte TF-Aktivierung auf der Zelloberfläche von Monozyten untersucht. Tissue Factor ist der Initiator des extrinsischen Gerinnungswegs und wird hauptsächlich von subendothelialen Zellen, wie Fibroblasten oder glatten Muskelzellen der Gefäßwand, exprimiert. Bei einer Störung der Gefäßwandintegrität kommt TF in Kontakt mit den im Blut enthaltenen Gerinnungsfaktoren, wodurch die Aktivierung des extrinsischen Gerinnungswegs ausgelöst wird. Inaktiver TF befindet sich jedoch auch auf der Oberfläche der Monozyten und kann durch aPL aktiviert werden.

Um die Aktivierung von TF zu messen, wurden Monozyten für 15 min bei 37° mit monoklonalen aPL (HL5B, 400 ng/ml) oder mit Kontroll-IgG stimuliert. Ausgewählten Proben wurde 15 min vor der Stimulation 10 µmol/l Simvastatin zugesetzt. Nach Stimulation wurden die Zellen in PBS gewaschen und in einer Konzentration von 2x10⁶ Zellen/ml in PBS

resuspendiert. Kurz vor der Messung wurden die Monozytensuspensionen mit vorgewärmtem Citrat-Plasma im Verhältnis 1:1 gemischt. Das Citrat-Plasma wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 4000 rpm aus dem Citrat-Blut von freiwilligen, gesunden Spendern gewonnen. Zugabe einer vorgewärmten CaCl_2 -Lösung (30 mM) aktiviert die Gerinnung. Die Zeit zum Nachweis eines Fibrinmangels wird automatisch gemessen. Die gemessenen Gerinnungszeiten wurden mit der Standardkurve verglichen und in prokoagulante Aktivität umgerechnet. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde eine bis zu 10 000-fache Verdünnung von rekombinantem humanem TF (HemosIL RecomciPlasTin 2G) in PBS gewählt.

5.8 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

5.8.1 Prinzip der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine schnelle Methode zur Zellcharakterisierung. Die Zellen aus einer Zellsuspension werden hydrodynamisch durch einen Hüllstrom in einen Messkanal fokussiert, so dass sie ihn einzeln und nacheinander passieren. Dort werden die einzelnen Zellen mit einem Laser angestrahlt und erzeugen dabei ein Streulicht. Das erzeugte Streulicht wird in Vorwärtsrichtung und Seitwärtsrichtung detektiert. Die Menge des Vorwärtsstreulichts (FSC, Forward Scatter), gemessenem in flachem Winkel, korreliert mit dem Zellvolumen. Seitenstreulicht (SSC, side scatter), gemessen im rechten Winkel, hängt von Granularität und Menge der Vesikel der Zelle sowie von der Größe und Struktur des Zellkerns ab. Wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern angefärbt, kann gleichzeitig auch Fluoreszenz gemessen werden. Mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen bestimmte Zelloberflächenantigene (z.B. CD-Markern) lassen sich die Subpopulationen innerhalb einer größeren Gruppe besser identifizieren. Es können zugleich mehrere Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Emissionsspektren benutzt werden, wenn sie das gleiche Anregungsspektrum besitzen bzw. wenn Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge zur Anregung zur Verfügung stehen. Emissionsmaxima eingesetzter Farbstoffen sollten sich möglichst wenig überlappen. Eine Datenanalyse-Technik, die als „Gating“ bezeichnet wird, ermöglicht, die Zellen, die nicht relevant sind, von der weiteren Analyse auszuschließen, was die Spezifität der Datenanalyse erhöht. Basierend auf der Vorwärts- und Seitwärtsstreusignale (Größe und Komplexität von Zellen) kann im sog. Dot-Plot-Diagramm eine oder mehrere Subpopulationen von Zellen (z.B. Lymphozyten) zur weiteren Analyse ausgewählt „gated“ werden. Diese Subpopulation der Zellen kann daraufhin nach der Fluoreszenzintensität weiter z.B. in CD4- und CD8-T-Lymphozyten unterteilt werden.

5.8.2 Anfärben der Mausmonozyten für Durchflusszytometrie

Mausmonozyten wurden aus Milzen von unbehandelten Mäuse, wie in 4.1.5 und 4.1.6. beschrieben, mittels der MACS-Technik isoliert. Unmittelbar nach der Isolierung wurden die Mausmonozyten mit 20 µg/ml anti-ECPR/LBPA Antikörper 1682 oder anti-ECPR 1650 angefärbt. Diese primären, monoklonalen Antikörper wurden mit einem roten Fluorophor, Alexa Flour 647, mit Emissionsmaximum bei 647 nm, gekoppelt. Anti-ECPR 1650 bindet an EPCR. Anti-ECPR/LBPA Antikörper 1682 kann hingegen nur an den EPCR binden, wenn dieser mit LBPA beladen ist. Beide Antikörper wurden von der Arbeitsgruppe Ruf (The Scripps Research Institute, Ja Jolla/USA) mittels Hybridomatechnik hergestellt. Nach Inkubation für 30 min bei 4°C wurde die Zellsuspension dreimal mit PBS gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen und im Anschluss im Durchflusszytometer analysiert. Die Messergebnisse wurden mit Hilfe der FACS Diva Software graphisch in einem Streudiagramm veranschaulicht.

6 Ergebnisse

Für die Untersuchung der Effekten von Statinen beim APS wurde ein Vertreter mit lipophilen (Simvastatin) und ein Vertreter mit hydrophilen (Pravastatin) Eigenschaften gewählt. Beide Statine sind kommerziell erhältlich. Zur Stimulation der Zellen wurden die humanen monoklonalen aPL HL5B und rJGG9 eingesetzt. HL5B gehören zu einer Gruppe von Kofaktor-unabhängigen aPL mit hoher Affinität für Cardiolipin und wurde aus B-Zellen eines 51-Jahre alten Patienten mit rezidivierenden zerebralen Mikrothrombosen und primärem APS isoliert [222]. JGG9 gehört zu den aPL, die direkt gegen β 2GPI gerichtet sind und wurde aus einer 49-jährigen Patientin mit SLE und sekundärem APS isoliert [219]. HL5B ist vom IgG-Isotyp, während rJGG9 zunächst vom IgM Isotyp war, aber in einem weiteren Schritt rekombinant als IgG Antikörper (rJGG9) hergestellt wurde. HL5B repräsentiert somit die Gruppe von Kofaktor-unabhängigen Lipid-reaktiven Antikörpern und rJGG9 die Gruppe der β 2GPI-Antikörper. Die Effekte von Statinen auf die aPL-induzierte Zellaktivierung wurden an Monozyten und Endothelzellen untersucht, weil diese Zelltypen an der Pathogenese des APS beteiligt sind.

6.1 Statine inhibieren die HL5B-induzierte Zellaktivierung

Um die anti-entzündlichen Eigenschaften von Statinen beim APS zu untersuchen, wurden MM1 Zellen oder primäre Monozyten mit Statinen vorbehandelt und anschließend mit den monoklonalen pro-entzündlichen aPL HL5B oder rJGG9 stimuliert. Als Antwort auf die Stimulation mit HL5B oder rJGG9 produzieren die Zellen vermehrt $\text{TNF}\alpha$ und/oder TF. Die Expression dieser Proteine wurde auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR bestimmt und diente als Maß für die Beurteilung des Aktivierungszustands der Zellen. Da die Hochregulierung der Genexpression durch HL5B und rJGG9 unterschiedlich schnell verläuft, wurden für die Experimente verschiedene Stimulationszeiten gewählt. Bei der Induktion der $\text{TNF}\alpha$ -Expression durch HL5B betrug die Stimulationszeit 3 Stunden, bei Induktion von TF-Expression eine Stunde und bei der Induktion der $\text{TNF}\alpha$ -Expression durch rJGG9 15 Stunden. Wegen begrenzter Verfügbarkeit von primären humanen und murinen Monozyten wurde in den meisten Versuchen mit der humanen monozytären Zelllinie MM1 gearbeitet. Diese Zelllinie ist für die Experimente mit aPL in der Arbeitsgruppe gut etabliert und verhält sich genauso wie primäre Zellen.

Zunächst wurde untersucht, ob und welchen Einfluss Statine auf die aPL-induzierte Zellaktivierung haben. Hierfür wurden Monozyten 15 min mit Simvastatin oder Pravastatin vorinkubiert und unmittelbar danach mit HL5B stimuliert. Es hat sich gezeigt, dass Statine die HL5B-induzierte $\text{TNF}\alpha$ -mRNA Expression vollständig (Abb. 1) und die TF-Expression nahezu

vollständig (Abb. 2A) inhibieren können. Die Statine selbst induzierten keine TNF α - oder TF-Expression.

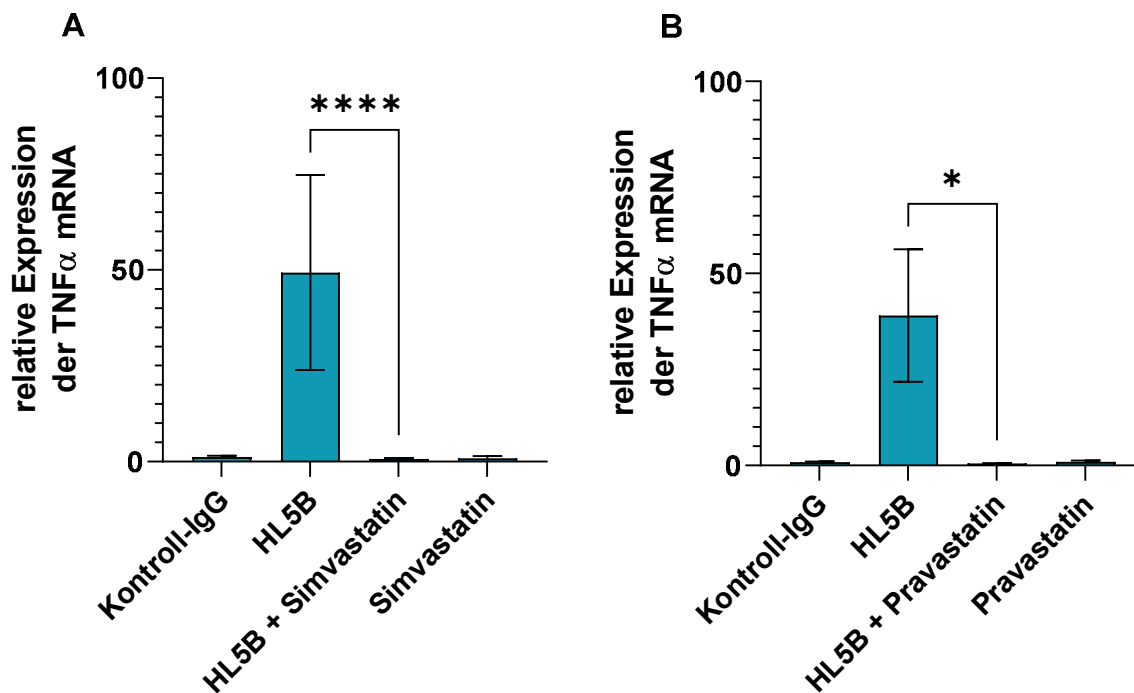


Abb. 1: Einfluss von Statinen auf die HL5B-induzierte Monozytenaktivierung. Humane MM1 Zellen wurden nach 15 min Präinkubation mit Simvastatin (A) oder Pravastatin (B), (jeweils 10 μ mol/l) für 3 h mit aPL HL5B (0,4 μ g/ml) im Brutschrank inkubiert. Die relative TNF α -Expression wurde auf unstimulierte Zellen und β -Actin Expression normalisiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von 8 (A) oder 4 (B) unabhängigen Experimenten. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-test überprüft. Die statistische Signifikanz wurde mit einem unpaired t-test getestet. **** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$

Nachdem die Hemmung der aPL-induzierten TF-mRNA Expression durch Statine nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob auch die HL5B-induzierte TF-Aktivierung an der Zelloberfläche der Monozyten durch Statine gehemmt werden kann. Um dies zu überprüfen, wurde ein Clotting-Assay am Kugelkoagulometer durchgeführt. Auf der Oberfläche von ruhenden Monozyten befindet sich ein Komplex aus TF, FVIIa und FXa, der durch TFPI stabilisiert und inhibiert wird. Nach der Interaktion von HL5B mit EPCR-LBPA wird der TF aktiviert [86, 134], gefolgt von Freisetzung von TFPI aus TF-FVIIa-FXa-TFPI-Komplex und Thrombinbildung durch „extrinsische“ Faktoren [125]. Unser Clotting-Assay ähnelt der Thromboplastinzeit-Bestimmung (Quick-Wert), mit dem Unterschied, dass zur Induktion der Gerinnung kein TF (Thromboplastin) zugesetzt wird. Die Quelle des TF stellen die Monozyten selbst dar. Wird TF durch HL5B aktiviert kommt es im Clotting-Assay zur Verkürzung der Gerinnungszeiten und die prokoagulante Aktivität wird erhöht. Wie erwartet,

Ergebnisse

zeigte HL5B eine deutlich höhere prokoagulate Aktivität im Vergleich zum Kontroll-IgG. Der prokoagulante Effekt von HL5B konnte durch Präinkubation mit Simvastatin komplett blockiert werden.

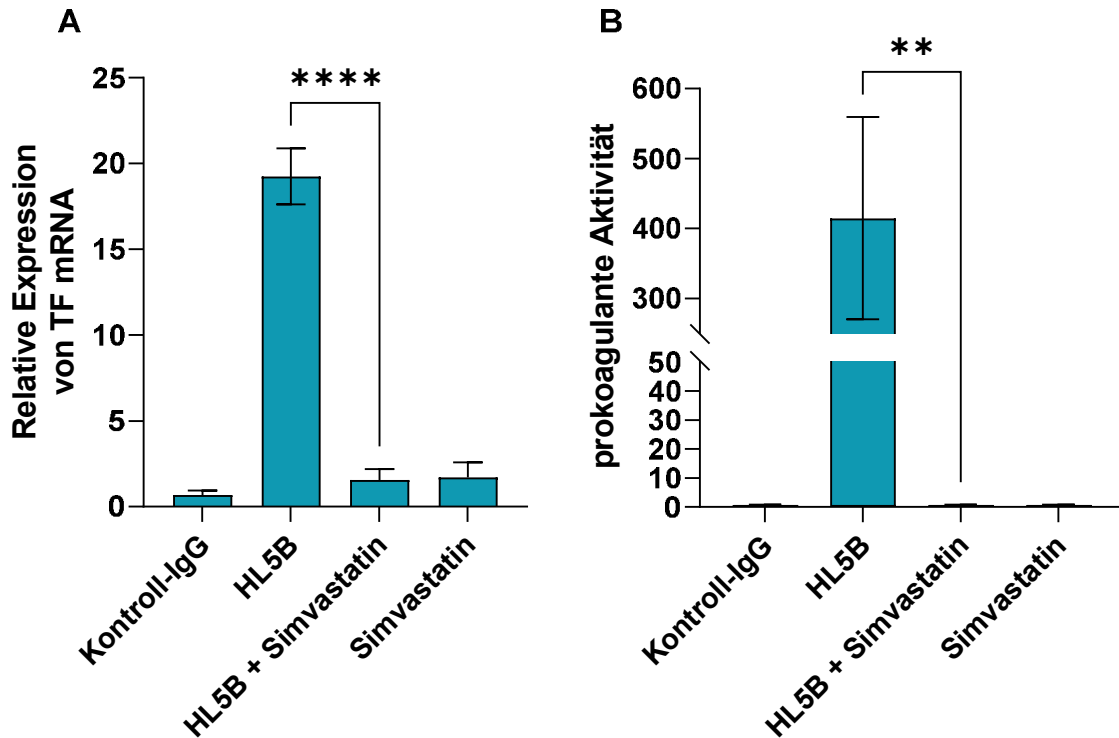


Abb. 2: Einfluss von Simvastatin auf aPL-induzierte TF-Expression (A) und -Aktivierung (B). (A) Humane MM1 Zellen wurden nach 15 min Präinkubation mit Simvastatin (12 nmol/l) für 1 h mit HL5B (0,4 µg/ml) bei 37°C inkubiert. Die relative TF-Expression wurde auf unstimulierte Zellen und β -Actin Expression normalisiert. (B) Auf den ruhenden Monozyten liegt TF in seiner inaktiven Form vor und kann durch aPL aktiviert werden, wodurch dieser in der Lage ist den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade zu aktivieren. Präinkubation mit Simvastatin verhinderte bei MM1 die aPL-induzierte TF-Aktivierung und dadurch die verstärkte Thrombinbildung im Gerinnungstest. MM1 Zellen wurden mit Simvastatin (10 µmol/l) und mit HL5B für je 15 min inkubiert. Kurz vor der Bestimmung der Gerinnungszeiten am Kugelkoagulometer wurde den Monozyten Citrat-Plasma von freiwilligen gesunden Spendern und CaCl_2 zugesetzt. Die gemessenen Gerinnungszeiten wurden basierend auf einer Verdünnungsreihe mit rekombinatem TF in prokoagulante Aktivität (Einheiten pro 10^6 Zellen) umgerechnet. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von je 3 unabhängigen Experimenten. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-test überprüft. Die statistische Signifikanz wurde mit einem unpaired t-test getestet. **** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$

In unseren Zellexperimenten wurde bisher mit einer im Vergleich zur in vivo-Situation sehr hohen Simvastatin-Konzentration (10 µmol/l) gearbeitet. Statin-Konzentrationen im Micromol-Bereich werden häufig in Studien eingesetzt, obwohl die mittlere Plasmakonzentration, bei therapeutischen Dosen, nur 1-15 nmol/l beträgt. Deswegen wurde als Nächstes untersucht, ob der beobachtete, anti-inflammatorische Effekt von Simvastatin auch im therapeutischen

Ergebnisse

Konzentrationsbereich noch nachzuweisen ist. Hierfür wurde Simvastatin mit Wasser verdünnt und 15 Minuten vor der Stimulation mit HL5B zur Zellsuspension (1×10^6 Zellen/ml) zugegeben. Es hat sich gezeigt, dass bereits die Konzentration von ca. 10 nmol/l zur vollständigen Hemmung der TNF α Expression in MM1 Zellen ausreicht (Abb. 3A). Um den inhibitorischen Konzentrationsbereich weiter einzugrenzen, wurden primäre humane Monozyten aus Buffy-Coats von freiwilligen Spendern (1×10^6 Zellen/ml) mit Simvastatin in unterschiedlichen Konzentrationen vorinkubiert und anschließend mit HL5B stimuliert. Für dieses Experiment wurde ein engerer Simvastatin-Konzentrationsbereich gewählt. Bei primären Monozyten konnte Simvastatin die Hochregulierung der TNF α -mRNA durch HL5B (1 μ g/ml) ab einer Konzentration von ca. 9 nmol/l vollständig hemmen (Abb. 3B).

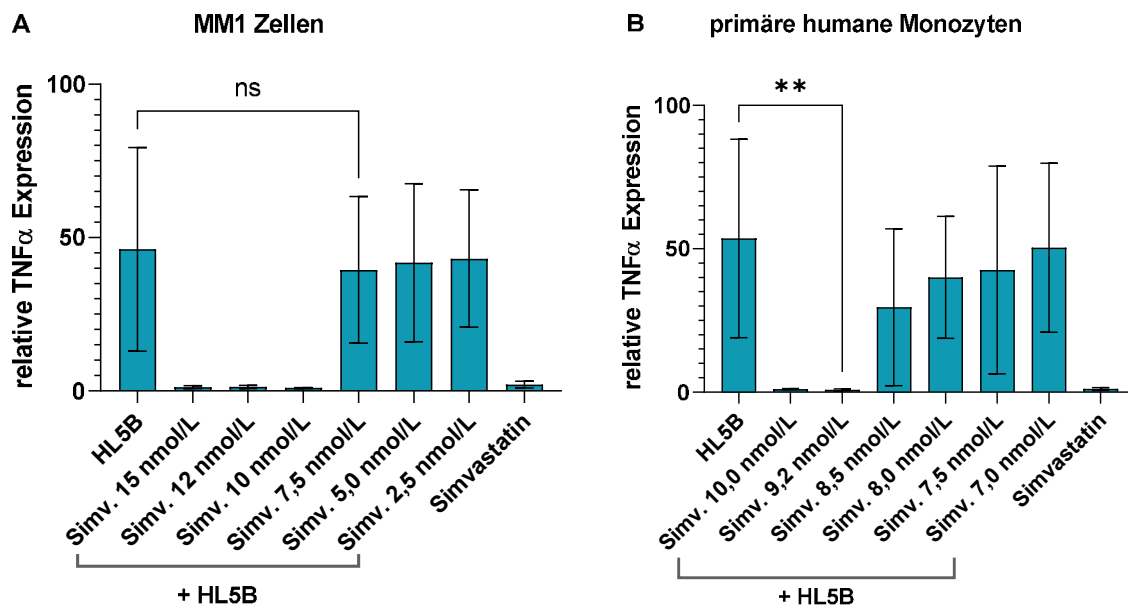


Abb. 3: Simvastatin-Konzentrationen im Nanomolbereich hemmen die HL5B-induzierte Monozytenaktivierung. MM1 Zellen (A) oder primäre humane Monozyten (B) wurden 15 min mit Simvastatin in unterschiedlichen Konzentrationen (2,5 – 15 nmol/l) und anschließend 3 h mit HL5B (1 μ g/ml) bei 37°C inkubiert. Die relative TNF α -Expression wurde auf unstimulierte Zellen und β -Actin normalisiert. Vor den Stimulationsversuchen wurden primäre Monozyten aus Buffy-Coats isoliert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-test überprüft. Die statistische Signifikanz wurde mit einem unpaired t-test getestet. ** $p < 0,01$, ns = nicht signifikant

6.2 Die Wirkung der Statine ist Mevalonat-unabhängig

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, wie Statine die aPL-induzierte Zellaktivierung inhibieren. Die allermeisten pleiotropen Effekte von Statinen resultieren aus dem Mangel an Zwischenprodukten der Cholesterinbiosynthese. Durch die kompetitive Inhibierung der HMG-CoA-Reduktase hemmen Statine nicht nur die Entstehung von Mevalonat, sondern unterbinden

auch die Synthese von Isoprenoiden, die in den nächsten Schritten der Cholesterinbiosynthese aus Mevalonat entstehen. Ein Mangel an Isoprenoiden führt zur verminderten Isoprenylierung, welche wesentlich die Funktionalität von Proteinen wie beispielsweise kleinen GTPAsen beeinflusst. Um zu bestätigen oder auszuschließen, dass die hier beobachteten Effekte der Statine auf die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase zurückzuführen waren, wurde nach halbstündiger Präinkubation mit Statinen Mevalonat in einer im Vergleich zu Simvastatin hohen Konzentration zu Beginn der Stimulation mit HL5B zur Zellsuspension zugegeben. Überraschenderweise konnte die Inhibierung der aPL-induzierten Monozytenaktivierung durch Zugabe von Mevalonat nicht wiederhergestellt werden (Abb. 4).

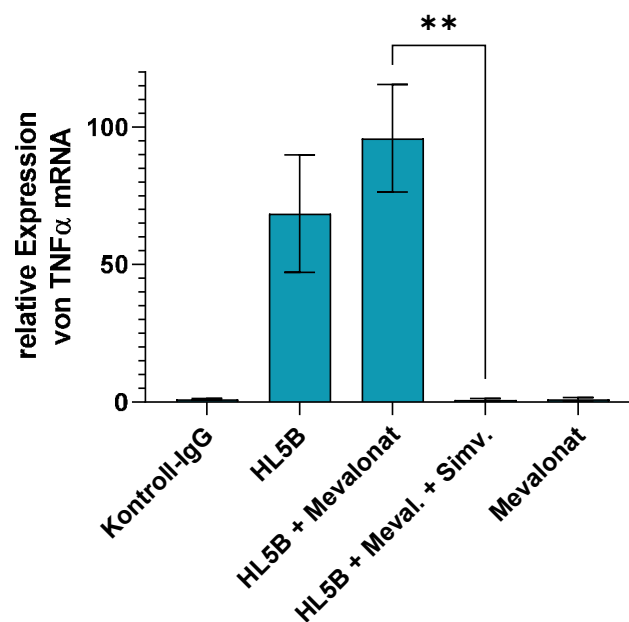


Abb. 4: Hemmung der HL5B-induzierten Zellaktivierung durch Statine ist Mevalonat-unabhängig. MM1 wurden für 30 min mit Simvastatin (10 μ mol/l) präinkubiert. Im Anschluss wurden den Zellen Mevalonat im Überschuss (6 mmol/l) zugesetzt und die Zellen wurden für 3 h mit HL5B aPL (1 μ g/ml) bei 37°C inkubiert. Die relative TNF α -Expression wurde auf unstimulierte Zellen und β -Actin normalisiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-test überprüft. Die statistische Signifikanz wurde mit einem unpaired t-test ermittelt. ** $p < 0,002$

In der Literatur wurde kürzlich ein Mevalonat-unabhängiger pleiotroper Effekt demonstriert. Weitz-Schmidt et al. konnten zeigen, dass Lovastatin direkt an Lymphozyten-Funktions-assoziiertes Antigen-1 (LFA-1) auf Lymphozyten bindet und die Interaktion mit ICAM-1 auf Endothelzellen verhindert [196]. Dies führte zur Hypothese, dass Statine auch in unseren Experimenten die aPL-induzierte Zellaktivierung durch eine direkte Interaktion stören. Möglich wären eine direkte Inhibierung der Antigen-Antikörper-Interaktion, der

Internalisierung von aPL in die Zelle oder die Hemmung der Signaltransduktion. Das Ziel der nächsten Experimente war, diese Hypothese zu überprüfen.

6.3 Statine wirken auf der Zelloberfläche

Um zu visualisieren, ob Statine die Bindung und/oder Internalisierung von aPL stören, wurden die Zellen im konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Nach Ablauf der Präinkubation mit Simvastatin wurden die MM1 Zellen mit FITC-markierten HL5B aPL oder FITC-markiertem Kontroll-IgG stimuliert. Für eine bessere Übersicht wurden Zellkerne mit NucBlue (blau) und saure Organellen wie späte Endosomen/Lysosomen mit Lyso-Tracker (rot) angefärbt. Simvastatin war unmarkiert. Um eine unspezifische Bindung des Fc-Teils der Immunglobuline an Fc-Rezeptoren der Monozyten zu verhindern, wurden die Zellen vor der Stimulation mit FcR-Blockierungsreagenz vorbehandelt. Unsere mikroskopischen Aufnahmen zeigen eine Übereinstimmung mit Ergebnissen von Müller-Calleja et al, die zeigten, dass HL5B aPL an EPCR/LBPA an der Zelloberfläche binden und anschließend durch Endozytose aufgenommen werden. Die gelbe Fluoreszenz in Abb. 5 entstand durch eine Kollokalisierung von grün gefärbten aPL HL5B und rot gefärbten sauren Organellen, was auf die Internalisierung und anschließende Akkumulation von HL5B in den Endosomen schließen lässt. Im Gegensatz dazu wurde bei den mit Simvastatin vorbehandelten Zellen keine Internalisierung und keine Bindung an die Zelloberfläche beobachtet, was dafür spricht, dass Simvastatin nicht nur die Internalisierung, sondern auch die Antigen-Antikörper-Bindung an der Zelloberfläche inhibiert.

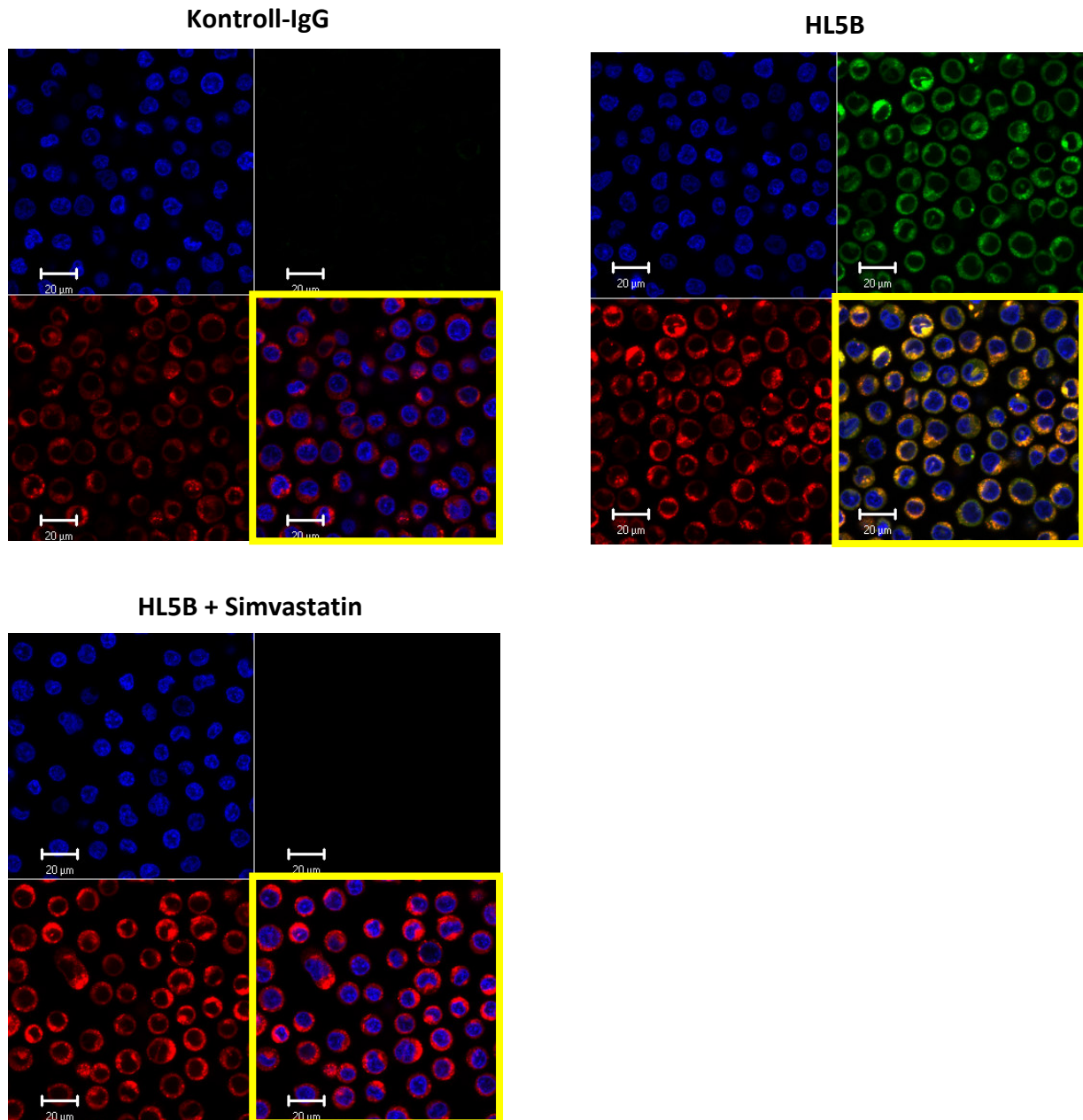


Abb. 5: Inhibition der Internalisierung von HL5B durch Statine. MM1 Zellen wurden für 30 min mit Simvastatin vorinkubiert und anschließend für 30 mit FITC-markiertem HL5B (grün) oder Kontroll-IgG inkubiert. Zellkerne wurden mit NucBlue (blau) und saure Organellen mit LysoTracker (rot) angefärbt. Simvastatin war unmarkiert. In der rechten unteren Ecke jeder Abbildung befindet sich ein Fusionsbild, das durch Überlagerung von den drei restlichen Bildern entstanden ist. Alle Bilder wurden am konfokalen Mikroskop unter gleichen Bedingungen aufgenommen. Die Daten sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente. Balken = 20 μm.

Einen weiteren Beleg dafür, dass Simvastatin an der Zelloberfläche wirkt, bietet auch das nächste Experiment. Abb. 6 zeigt, dass die inhibitorische Wirkung von Statinen auf aPL innerhalb von Sekunden eintritt. Die aPL-induzierte TNF α -Expression konnte sogar durch die

Ergebnisse

Zugabe von Simvastatin kurz nach dem Beginn der Stimulation mit HL5B aPL gehemmt werden.

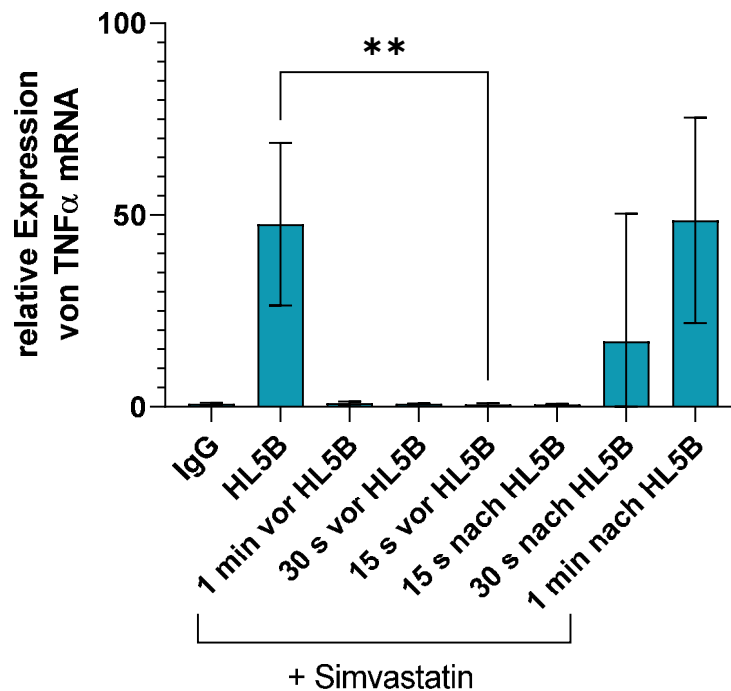


Abb. 6: Wirkungsgeschwindigkeit von Simvastatin in Monozyten. Humane MM1 Zellen wurden für 3 Stunden mit HL5B (0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bei 37°C inkubiert. 1 min, 30 s und 15 s vor oder nach der Stimulation mit HL5B wurde zu der Zellsuspension (1 Mio. Zellen/ml) Simvastatin (12 nmol/l) zugegeben. Die relative TNF α -Expression wurde auf unstimulierte Zellen und β -Actin normalisiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-test überprüft. Die statistische Signifikanz wurde mit einem unpaired t-test ermittelt. ** $p < 0,002$

Um zu bestätigen, dass das in die Zellen aufgenommene Simvastatin keinen Einfluss auf die HL5B-induzierte Zellaktivierung hat und ausschließlich an der Zelloberfläche wirkt, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Monozyten wurden am Vortag der Stimulation ausgesät, damit ein Teil der Monozyten auf der Oberfläche der Zellkulturplatte adhären kann. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Simvastatin vorinkubiert. Nach Ablauf der Vorstimulationszeit wurde das alte Medium vorsichtig abgesaugt, damit die adhären Zellschicht intakt bleibt. Zu den adhären Zellen wurde frisches Medium zugeben. Das Medium wurde insgesamt entweder einmal oder zweimal gewechselt. Danach wurden die Zellen wie gewöhnlich mit HL5B stimuliert. Abb. 7 zeigt, dass der inhibierende Effekt von Simvastatin durch zweimaligen Mediumwechsel wieder aufgehoben werden kann, also reversibel ist. Unter der Voraussetzung, dass sich die Konzentration des in den Zellen

aufgenommenen Simvastatins durch den Mediumwechsel nicht wesentlich änderte, kann man daraus schließen, dass sich die entscheidenden Prozesse der Inhibition auf der Außenseite der Zellmembran abspielen. Die Abnahme der relativen TNF α -Expression nach dem Mediumwechsel, im Vergleich zu ungewaschenen Zellen, korrelierte grob mit der Zellzahl.

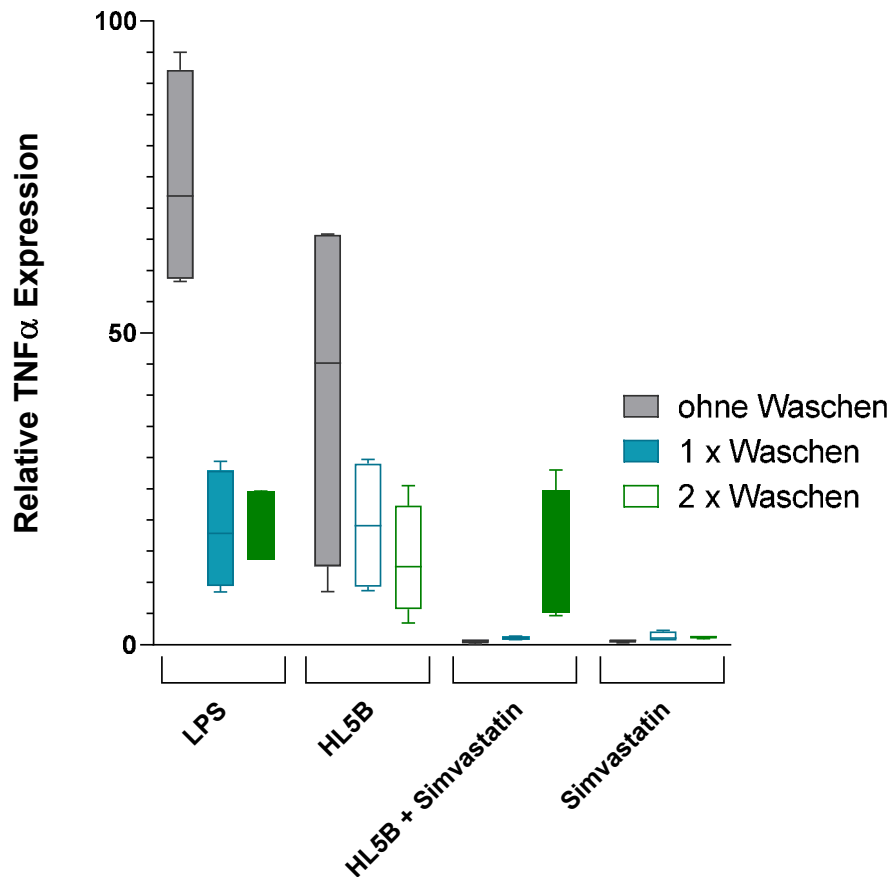


Abb. 7: Die inhibitorische Wirkung von Statinen auf die HL5B-induzierte Zellaktivierung kann durch Mediumwechsel aufgehoben werden. MM1 Zellen wurden am Vortag in einer Dichte von 1×10^6 /ml ausgesät. Über die Nacht adhärte ein Teil der Monozyten an die Oberfläche der Zellkulturplatte. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 15 min mit Simvastatin vorinkubiert. Im Anschluss wurden das alte Medium inklusive der nicht-adhärerten Monozyten abgesaugt und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Dieser Waschschrift wurde einmal bzw. zweimal durchgeführt. Adhärerte Monozyten, die nach dem Mediumwechsel an der Oberfläche gebunden blieben, wurden für 3 Stunden mit HL5B ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) bei 37°C inkubiert. LPS diente als positive Kontrolle und korrelierte grob mit der Zellzahl in der Suspension. Das Diagramm zeigt den Min-, Max-, und Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten.

6.4 Rolle von LBPA in der durch Statine -vermittelten Inhibition

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass Statine die Bindung und Internalisierung von HL5B blockieren (und nicht in die danach geschalteten Signalwege eingreifen), stellte sich die Frage nach dem zugrundeliegenden Mechanismus. Möglich wäre eine direkte Bindung von Statinen an EPCR/LBPA und eine kompetitive Hemmung der Antigen-Antikörper-Interaktion

Ergebnisse

oder Verdrängung von LBPA von der Bindungsstelle an dem EPCR. Um die Rolle von Statinen im Hinblick auf die Interaktion zwischen HL5B und EPCR/LBPA aufzuklären, wurden MM1 Zellen mit Simvastatin mit oder ohne LBPA präinkubiert und mit HL5B stimuliert. Wie Abb. 8 veranschaulicht, konnte die Wirkung von Simvastatin sowie Pravastatin durch LBPA aufgehoben werden. Beide Statine verhielten sich identisch. Aufgrund dessen wurde in den nächsten Experimenten nur mit Simvastatin gearbeitet.

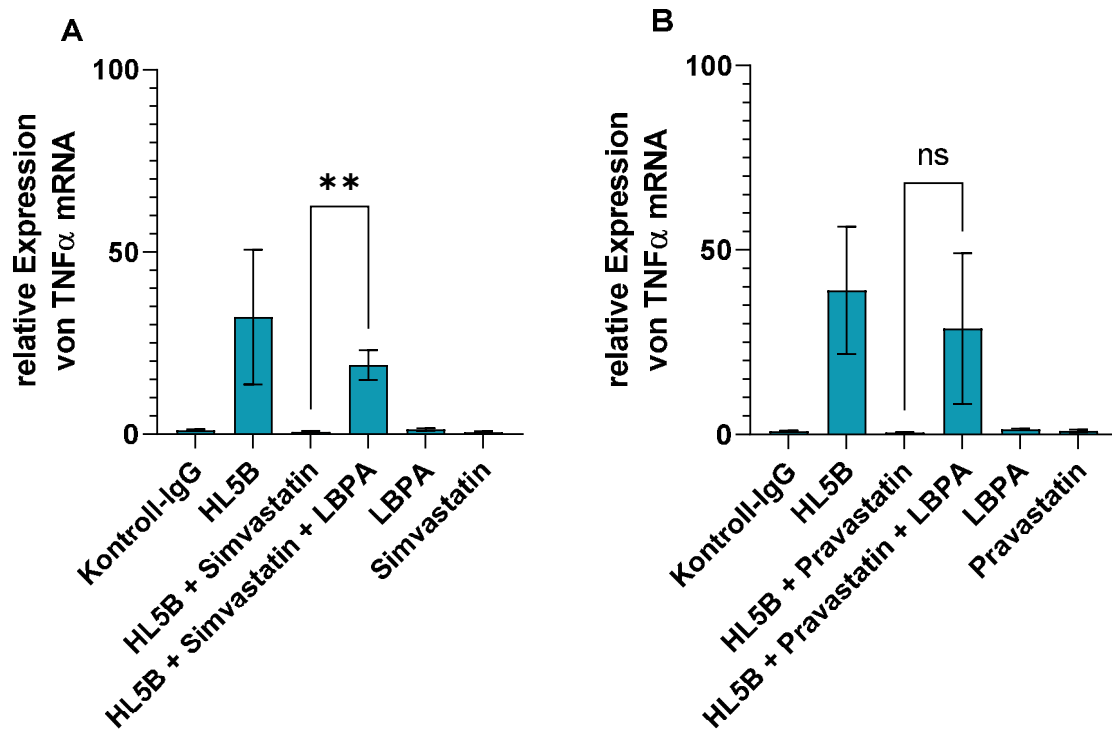


Abb. 8: Inhibierung der HL5B-induzierten Zellaktivierung durch Statine und Aufhebung des inhibierenden Effekts durch LBPA. Humane MM1 Zellen wurden nach 30 min Präinkubation mit LBPA und Simvastatin (A) oder Pravastatin (B) jeweils in der Konzentration von 10 μ mol/l für 3 Stunden mit HL5B aPL (1 μ g/ml) bei 37°C inkubiert. Die relative TNF α -Expression wurde auf unstimulierte Zellen und β -Actin normalisiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von jeweils 3 unabhängigen Versuchen. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-test überprüft. Die statistische Signifikanz wurde mit einem unpaired t-test ermittelt. ** $p < 0,01$, ns = nicht signifikant

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 9) bestätigten das Ergebnis des vorherigen Experiments. Nach Vorinkubation mit Simvastatin und LBPA und anschließender Stimulation mit HL5B zeigte sich eine deutliche Kolokalisation (gelb) des aPL (grün) und den sauren Organellen wie Lysosome und Endosome, die mit Lyso-Tracker (rot) angefärbt wurden. Die Zugabe von LBPA zu den MM1 Zellen führte zur Wiederherstellung der Internalisierung von

Ergebnisse

HL5B. HL5B konnten nach kombinierter Vorstimulation mit LBPA und Simvastatin gleich stark in den Endo-/Lysosomen akkumulieren wie in den Zellen ohne Inhibitor im Medium.

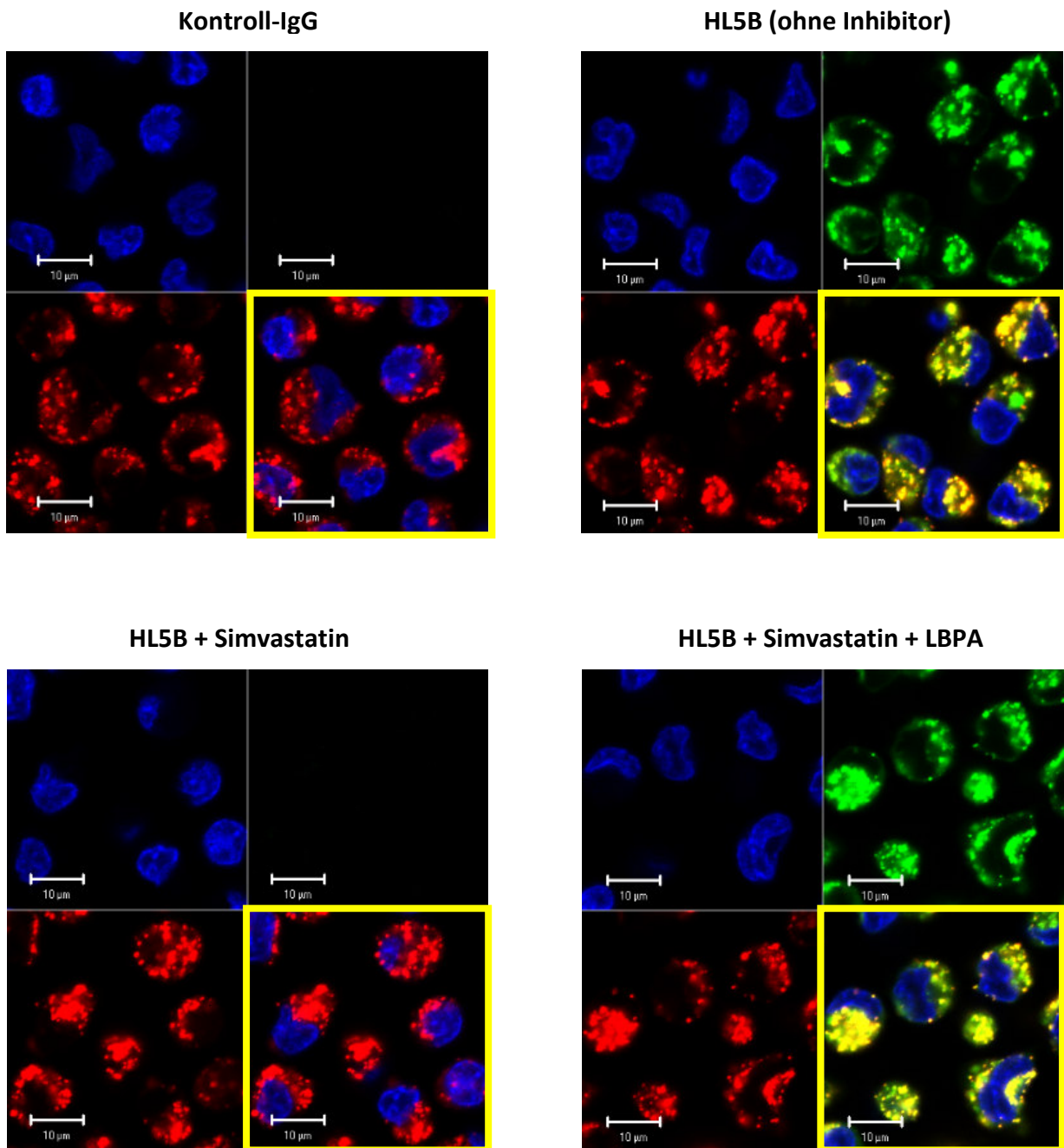


Abb. 9: Inhibition der Internalisierung von HL5B durch Statine und Aufhebung des inhibierenden Effekts durch Zugabe von LBPA. MM1 Zellen wurden für 30 min mit Simvastatin mit/ohne LBPA vorkubiert und anschließend für 30 min mit FITC-markierten HL5B (grün) oder Kontroll-IgG inkubiert. Zellkerne wurden mit NucBlue (blau) und saure Organelle mit LysoTracker (rot) angefärbt. Simvastatin und LBPA sind unmarkiert. In der rechten unteren Ecke jeder Abbildung befindet sich ein Fusionsbild, das durch Überlagerung der drei restlichen Bilder erstellt wurde. Alle Bilder wurden mit dem konfokalen Mikroskop unter gleichen Bedingungen aufgenommen. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse eines Experiments. Balken = 10 μm

Ergebnisse

Weiter wurde die Wirkung von Simvastatin auf die Antigen-Antikörper Interaktion in der Durchflusszytometrie untersucht. Hierfür wurden primäre Monozyten aus Wildtyp-Mäusen mit Simvastatin präinkubiert. Danach wurde der murine EPCR mit anti-EPCR 1650 und der EPCR/LBPA-Komplex mit anti-EPCR/LBPA 1682 markiert. Wie Abb. 10 veranschaulicht, wird die Bindung von anti-EPCR/LBPA 1682 an den EPCR/LBPA-Komplex inhibiert, wenn die Zellen mit Simvastatin vorbehandelt wurden (Abb. 10B). Die Bindung von anti-EPCR 1650 an den EPCR blieb unverändert (Abb. 10A). Daraus folgt, dass Simvastatin nicht die Anzahl an EPCR auf der Zelloberfläche reduziert, sondern möglicherweise entweder kompetitiv die Interaktion zwischen anti-EPCR/LBPA 1682 und EPCR/LBPA hemmt oder LBPA vom EPCR verdrängt.

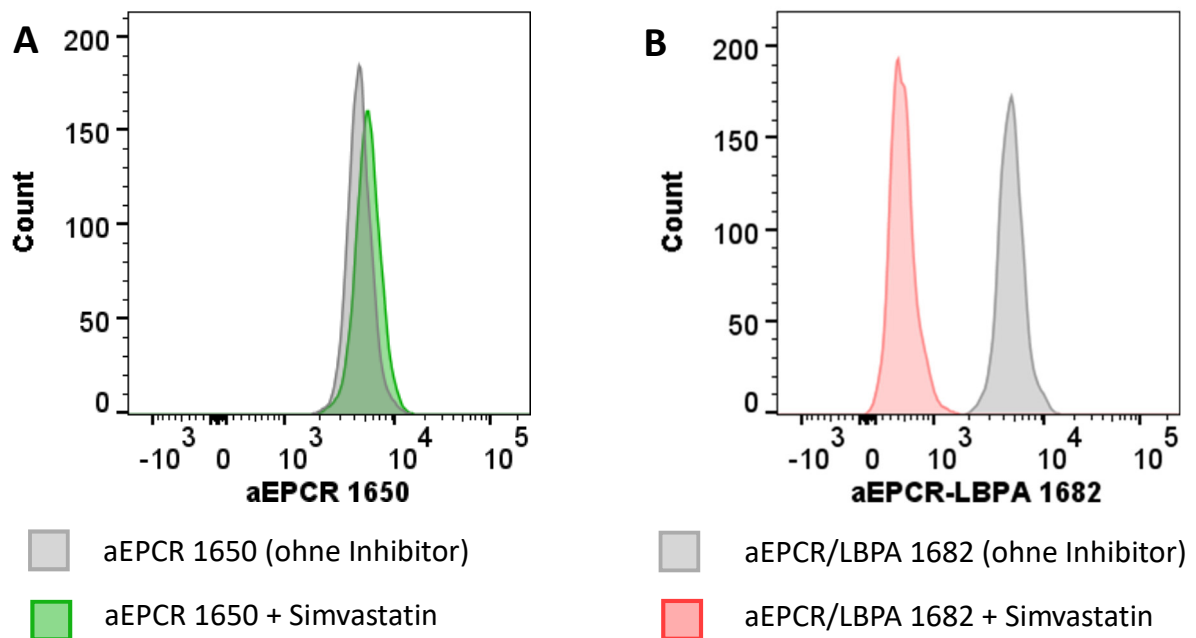


Abb. 10: Simvastatin stört die Bindung von anti-EPCR/LBPA-Antikörpern an den EPCR-LBPA-Komplex (B), aber nicht die Bindung von anti-EPCR-Antikörpern an EPCR (A). Murine Monozyten wurden für 15 min mit Simvastatin präinkubiert und im Anschluss für 30 min mit 20 µg/ml den fluoreszenzmarkierten Antikörpern anti-EPCR/LBPA 1682 oder anti-EPCR 1650 inkubiert. Die Fluoreszenz der Monozyten wurde mittels Durchflusszytometrie jeweils bei 647 nm gemessen. Die x-Achse des Histogramms repräsentiert die Fluoreszenzsignalintensität, die y-Achse zeigt die Zellzahl. Zelltrümmer und Zellaggregate wurden von der Analyse ausgeschlossen.

6.5 HL5B-induzierte Zellaktivierung und Wirkstoffe, die die Cholesterinverteilung modulieren

U18666A (3 β (2-diethylaminoethoxy)androsenon-HCl) ist ein kationisches, amphiphiles Steroid, das erstmals 1951 synthetisiert wurde [223] und maßgeblich zum besseren Verständnis

der Cholesterinsynthese, des Cholesterintransports und der Pathophysiologie der Niemann-Pick-Krankheit Typ C (NP-C) beigetragen hat [224]. U18666A inhibiert die Freisetzung von freiem Cholesterin aus Endo-/Lysosomen und verhindert dessen Transport zum ER und zur Zellmembran [225]. Die Veränderungen in der Cholesterinverteilung sind auf die Inhibierung des Niemann-Pick-C1-Proteins (NPC1) zurückzuführen [226]. NPC1 ist ein Transmembranprotein, das den Cholesterinefflux aus den Endo-/Lysosomen vermittelt. Mutationen im NPC1-Gen verursachen eine seltene autosomal-rezessiv vererbte neurodegenerative Speicherkrankheit NP-C [227]. Da das U18666A die NP-C imitieren kann, dienen U18666A-behandelte Zellen als Modellsystem, um weitere Erkenntnisse über dieser Krankheit zu gewinnen [228, 229] Abb. 11 zeigt, dass eine kurze Präinkubation mit dem Cholesterinsynthese- und -transportinhibitor U18666A eine vollständige Blockierung der HL5B-induzierten TNF α Expression bewirkte. Auch hier konnte die Inhibierung komplett durch Zugabe von LBPA aufgehoben werden. Dies spricht dafür, dass U18666A die induzierte TNF α Expression über einen ähnlichen Wirkmechanismus inhibiert, wie Simvastatin und Pravastatin. Die Hochregulierung von TNF α mRNA nach Zugabe von LBPA deutet darauf hin, dass die inhibierende Wirkung von U18666A nicht auf eine Cholesterin-Umverteilung zurückzuführen ist.

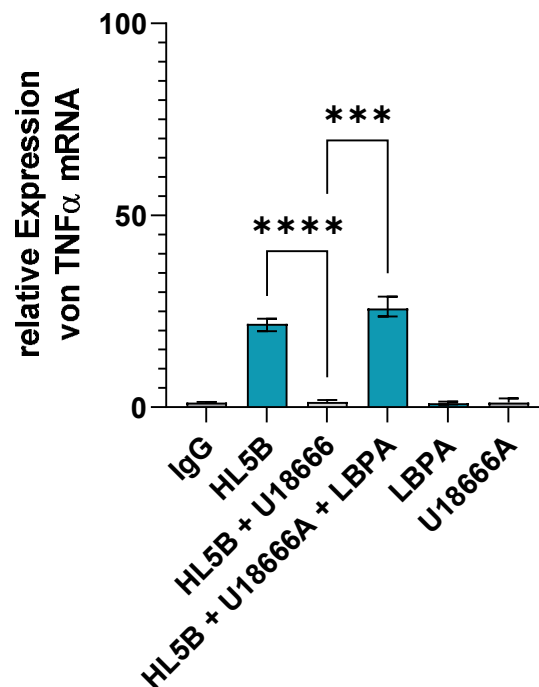


Abbildung 11: Der inhibierende Effekt von U18666A kann durch LBPA aufgehoben werden. MM1 Zellen wurden nach 30 min Präinkubation mit LBPA und U18666A für 3 h mit HL5B (1 μ g/ml) bei 37°C inkubiert. Die relative TNF α -Expression wurde auf unstimulierte Zellen und β -Actin normalisiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert und \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

Ergebnisse

Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-test überprüft. Die statistische Signifikanz wurde mit einem unpaired t-test ermittelt. *** $p = 0,001$; **** $p < 0,0001$

Cholesterin ist ein wichtiger Bestandteil der Plasmamembran. Die Rolle des Cholesteringehalts in der Plasmamembran wurde häufig in Zusammenhang mit physikalisch-chemischen Eigenschaften der Plasmamembran wie Fluidität und Permeabilität, mit zellulären Prozessen wie Signaltransduktion und Membrantransport und in Studien über Lipidrafts untersucht. Cholesterindepletion in der Plasmamembran kann auf unterschiedliche Weise erzielt werden; beispielsweise durch Inhibierung der *de-novo*-Cholesterinsynthese durch Statine oder viel schneller mit einer Cholesterin-bindenden Substanz, wie Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) [230]. M β CD ist ein hydrophiles Heptasaccharid mit einem hydrophoben Hohlraum und hoher Affinität zu Cholesterin [231]. M β CD entzieht der Plasmamembran das Cholesterin [232] und führt zur Zerstörung der Lipidrafts [233]. Um auszuschließen, dass Cholesterindepletion eine Rolle bei der Statin-induzierten Inhibierung spielt, wurden die MM1 Zellen mit M β CD mit oder ohne LBPA vorbehandelt und im Anschluss mit HL5B stimuliert. M β CD konnte die Zellaktivierung zwar vollständig unterdrücken, aber anders als bei Simvastatin, Pravastatin und U18666A konnte die durch HL5B induzierte TNF α -Hochregulation nicht mit LBPA wiederhergestellt werden (Abb. 12). M β CD zeigte in der eingesetzten Konzentration keine zytotoxischen Eigenschaften. Dies legt nahe, dass die Lipid Rafts zwar essenziell für das HL5B-Signaling sind, aber deren mögliche Veränderungen durch einen Statin-bedingten Cholesterinmangel keine wichtige Rolle bei dem beobachteten anti-inflammatorischen Effekt von Simva- und Pravastatin spielen.

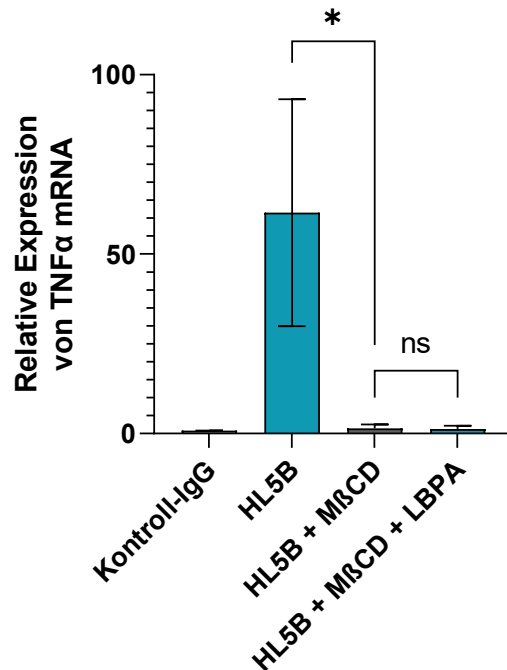


Abbildung 12: Der inhibierende Effekt von MβCD kann nicht durch LBPA aufgehoben werden. MM1 Zellen wurden nach 30 min Präinkubation mit MβCD und LBPA für 3 Stunden mit HL5B aPL (1 µg/ml) bei 37°C inkubiert. Die relative TNFα-Expression wurde auf unstimulierte Zellen und β-Actin normalisiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen. Die Normalverteilung der Daten wurde mit Shapiro-Wilk-test überprüft. Die statistische Signifikanz wurde mit unpaired t-test ermittelt. * $p < 0,05$

6.6 Statine inhibieren die rJGG9-induzierte Zellaktivierung

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass Statine die Aktivierung durch Cardiolipin-bindende aPL hemmen können, wurde der Effekt von Statinen auf die Zellaktivierung durch β2GPI-bindende aPL untersucht. Auch hier zeigte sich eine vollständige Inhibierung der TNFα Expression (Abb. 13). Die Ergebnisse der Versuche mit Pravastatin sind zwar statistisch nicht signifikant aber der Trend ist klar erkennbar. Für das Erzielen der statistischen Signifikanz wären weitere Wiederholungen des Experiments notwendig, die aus zeitlichen Gründen und dem mit rJGG9-Zellstimulation verbundenen hohen Aufwand nicht durchgeführt werden konnten. Der zugrundeliegende Mechanismus der Inhibierung der rJGG9-induzierten Zellaktivierung wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

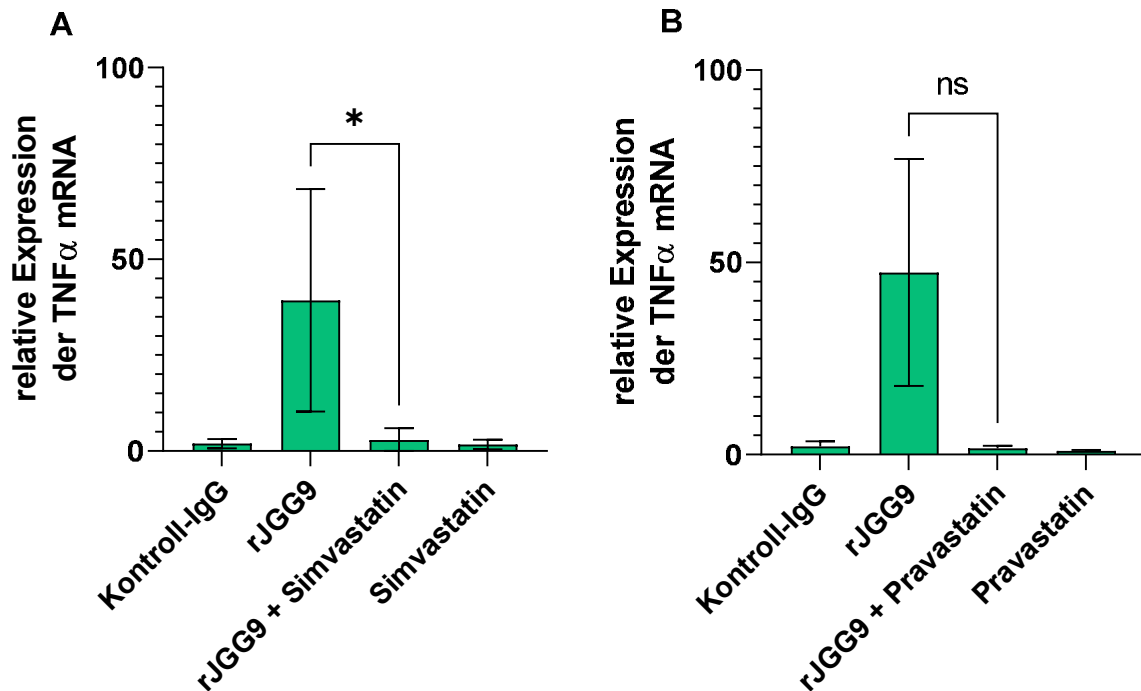


Abbildung 13: Einfluss von Statinen auf die rJGG9-induzierte Monozytenaktivierung. Humane MM1 Zellen wurden nach 30 min Präinkubation mit Simvastatin (A) oder Pravastatin (B) jeweils in der Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ für 15 Stunden mit rJGG9 aPL (1 $\mu\text{g/ml}$) bei 37°C inkubiert. Die Relative TNF α -Expression wurde auf unstimulierte Zellen und β -Actin normalisiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert und \pm Standardabweichung von je 3 unabhängigen Experimenten. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Shapiro-Wilk-test überprüft. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Test ermittelt. * $p < 0,05$

6.7 Wirkung von Statinen in HUVEC

In vorherigen Experimenten wurde die Statin-induzierte Inhibition und ihr Wirkmechanismus auf einem Zelltyp (MM1 Zellen, primäre humane Monozyten, Mausmonozyten) demonstriert. Um das Verhalten von Statinen bei weiteren Zelltypen aufzuklären, sollten im nächsten Schritt die Effekte der Statine bei einer primären Endothelzelllinie aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) untersucht werden. Abb. 14 zeigt, dass die HUVEC sich ähnlich wie Monozyten verhielten. Allerdings konnte die Statin-induzierte Inhibition der Zellaktivierung bei HUVEC durch Zugabe von Mevalonat aufgehoben werden. Die Schwierigkeiten bei der Haltung und Zucht dieser primären Zelllinie haben uns leider nicht ermöglicht, die Ergebnisse durch weitere Wiederholungsexperimente zu verifizieren.

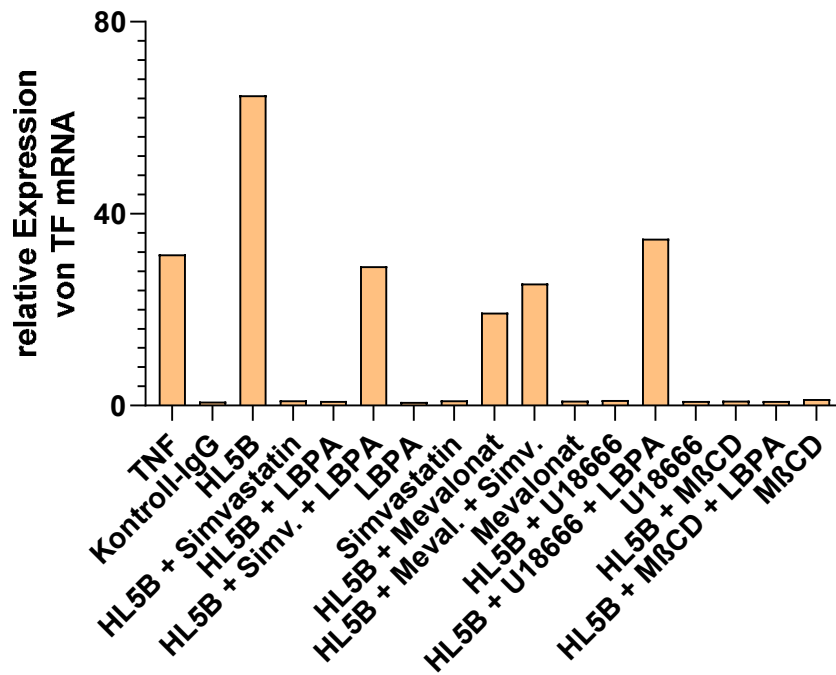


Abbildung 14: Einfluss von Statinen auf die HL5B-induzierte Aktivierung von humanen Endothelzellen. HUVEC-Zellen wurden nach 30 min Präinkubation mit Simvastatin, U18666A, MβCD, und LBPA für 1 Stunde mit HL5B aPL (1 µg/ml) bei 37°C inkubiert. Mevalonat wurde gleichzeitig mit HL5B zugegeben. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit TNF. Die relative TF-Expression wurde auf unstimulierte Zellen und β-Actin normalisiert. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse eines Experiments.

7 Diskussion

Statine zeichnen sich durch eine Reihe von pleiotropen Effekten aus. Neben der cholesterinsenkenden Wirkung haben Statine auch anti-atherosklerotische [154, 164-168, 173-175], anti-inflammatorische [188-196] und antikoagulante [182, 190, 197-202] Eigenschaften. In dieser Doktorarbeit wurden anti-inflammatorische und antikoagulante pleiotrope Effekte von Statinen in Monozyten und Endothelzellen nachgewiesen und teilweise der molekulare Mechanismus hinter diesen Effekten beschrieben.

7.1 Simvastatin und Pravastatin hemmen die Hochregulierung von TNF α mRNA durch Lipid-bindende sowie Kofaktor-bindende aPL in Monozyten und Endothelzellen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Simvastatin und Pravastatin die Induktion der TNF α mRNA durch monoklonale Lipid-bindende sowie Kofaktor-bindende aPL in Monozyten und die Induktion der TNF α mRNA durch monoklonale Lipid-bindende aPL in Endothelzellen vollständig hemmen. Die Wirkung der Statine war auch bei Konzentrationen, die im menschlichen Serum erreicht werden, noch nachweisbar. Obwohl die mittlere Konzentration von Statinen im menschlichen Serum (bei therapeutischen Dosen) nur 1-15 nmol/l beträgt [234], werden in den meisten in-vitro-Experimenten viel höheren Konzentrationen eingesetzt (>1 μ mol/l) [206, 207, 234]. Die Spitzenkonzentration ist zwar etwa 2-6-mal höher (6-50 nmol/l), aber diese Konzentration ist nur für eine sehr kurze Zeit (Minuten) vorhanden, während die in-vitro-Inkubationen mehrere Stunden dauern [234]. In dieser Arbeit wurde daher zunächst mit Simvastatin und Pravastatin in einer Konzentration von 10 μ mol/l gearbeitet und später wurden deutlich niedrigere Konzentrationen, im unteren nanomolaren Bereich, getestet. Unsere In-vitro-Experimente haben gezeigt, dass Simvastatin bis zu einer Konzentration von 10 nmol/l vollständig die Induktion der TNF α mRNA durch den monoklonalen Lipid-bindenden aPL in Monozyten hemmen kann.

Die Steigerung der Expression von TNF α mRNA durch den monoklonalen Lipid-bindenden aPL HL5B erfolgt indirekt über TLR-Signalweg und ist vollständig von der Aktivität der NOX2 abhängig. HL5B bindet im ELISA auf Cardiolipin in An- oder Abwesenheit des Kofaktors β 2GPI, aber sein tatsächliches Zielantigen in vivo ist der EPCR/LBPA-Komplex. Sobald HL5B auf der Zelloberfläche den EPCR-LBPA-Komplex [86] bindet, wird er in die Endosomen internalisiert. Dort aktiviert HL5B das Enzym NOX2, das aus den normalen Sauerstoffmolekülen reaktive Superoxid-Radikale produziert, welche zu H₂O₂ umgewandelt werden. H₂O₂ erhöht zum einen die Expression der TLR7/8 mRNA im Zellkern und zum

anderen induziert es die Translokation der TLR7/8 vom ER in die Endosomen. Als Konsequenz werden Zellen wesentlich sensitiver für Liganden der TLR7/8 wie virale und bakterielle RNA. Die Aktivierung des TLR-Signalweges führt dann zur Steigerung der mRNA-Expression von TNF α [118, 235]. Während die Signalwege, über die der monoklonale Lipid-bindende aPL HL5B Autoimmunreaktion auslöst, detailliert erforscht wurden, ist über die intrazellulären Vorgänge, die die Induktion der TNF α durch den monoklonalen Kofaktor-bindenden aPL rJGG9 vermitteln, nur wenig bekannt. Hollerbach et al. haben einige dieser Prozesse identifiziert. Sie zeigten, dass die Induktion der TNF α mRNA durch rJGG9 in Monozyten vollständig durch den mTOR-Inhibitor, Rapamycin, inhibiert wird und unabhängig von NOX2 und der Komplement-Aktivierung ist. JGG9 bindet im ELISA an β 2GPI in Ab- oder Anwesenheit von Cardiolipin, ob neben β 2GPI noch weitere Moleküle zum Zielantigen gehören, ist bislang unbekannt.

7.2 Simvastatin und Pravastatin hemmen die Hochregulierung von TF mRNA und die Aktivierung des zellgebundenen TF durch Lipid-bindende aPL in Monozyten

Die Hochregulierung der TF-Expression durch aPL in Endothelzellen und Monozyten ist eine der gut beschriebenen pathophysiologischen Veränderungen in APS, die einen prokoagulanten Zustand einleiten, welcher mit einer erhöhten Thromboseneigung einhergeht [103, 236, 237]. Darüber hinaus haben Müller-Calleja et al. gezeigt, dass Lipid-bindende aPL in der Lage sind den zellgebundenen TF zu aktivieren [125]. An der Plasmamembran ruhender Monozyten wird TF im Komplex mit Faktor Xa und VIIa von TFPI inhibiert [129] und als „encrypted TF“ bezeichnet. Nach der Bindung der Lipid-bindenden aPL an EPCR-LBPA löst sich der TFPI aus dem TF-FVIIa-FXa-TFPI-Komplex und der „decryptete“ also aktivierte TF startet die Thrombinbildung über den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade. Bei der Untersuchung des Einflusses von Statinen auf die TF-Aktivierung durch Lipid-bindende aPL zeigte sich, dass die Gerinnungszeiten nach kurzer Vorinkubationszeit (15 min) mit Statinen den unbehandelten Monozyten glichen, während die Gerinnungszeiten der HL5B-behandelten Monozyten (in Abwesenheit von Statinen) deutlich verkürzt waren. Dies zeigt, dass Simvastatin die HL5B-induzierte TF-Aktivierung auf der Oberfläche von Monozyten verhindern kann. Außerdem wurde nachgewiesen, dass Statine die pathologisch erhöhte TF mRNA-Expression durch den Lipid-bindenden aPL HL5B in Monozyten und Endothelzellen nahezu vollständig hemmen können. Der Lipid-bindende aPL HL5B induziert die Expression des TF-Gens über den Anstieg der intrazellulären H₂O₂-Konzentration gefolgt von der Aktivierung des redox-sensitiven Transkriptionsfaktors NF- κ B. H₂O₂ wird in der Zelle durch NOX2 gebildet, deren Aktivität erst

nach Aufnahme des HL5B/EPCR/LBPA-Komplexes in die Endosomen erhöht wird. Denn die Aufnahme der Lipid-bindenden aPL ist entscheidend für ihre zellulären Effekte, unter anderem die Aktivierung der endosomalen NOX2. Ohne Aufnahme der aPL in Endosomen erfolgt keine Aktivierung der NOX2 und somit auch keine TF-Induktion. Die Internalisierung des HL5B/EPCR/LBPA-Komplexes in die Endosomen erfordert ein Zusammenspiel zwischen aPL, Komplement, Koagulationsfaktoren und PAR1/2. Nach Freisetzung von TFPI aus dem TF-FVIIa-FXa-TFPI-Komplex spaltet der freigewordene FXa Prothrombin zu Thrombin, der wiederum PAR-1/PAR2 aktiviert, wodurch die Internalisierung von HL5B induziert wird. Die Hemmung der HL5B-induzierten Thrombinbildung durch Statine verhindert die Internalisierung der aPL und somit auch die Erhöhte Expression von TF. Dies deutet darauf hin, dass Simvastatin nicht direkt intrazelluläre Signalwege hemmt, sondern die Internalisierung der Lipid-bindenden aPL verhindert. Zur weiteren Charakterisierung der Wirkung von Statinen auf die aPL wurde untersucht, ob intrazelluläre Effekte der Statine, wie Hemmung der Biosynthese des Cholesterins und seinen Zwischenprodukten, dazu beitragen, die aL-induzierte Aktivierung der Zellen zu blockieren und welcher Mechanismus hinter der Hemmung der Internalisierung steht.

7.3 Simvastatin hemmt Expression von TNF α mRNA in Monozyten Mevalonat-unabhängig

Die überwiegende Mehrheit der in der Literatur beschriebenen pleiotropen Effekte der Statine resultiert aus dem Mangel an Zwischenprodukten der Cholesterinbiosynthese - den Isoprenoiden - und kann daher durch Zugabe von Mevalonat ins Zellkulturmedium neutralisiert werden [212]. Um den gewünschten Mangel an Isoprenoiden in der Zelle hervorzurufen, muss nach der Blockierung der *de-novo*-Cholesterinsynthese durch Statine zuerst der Isoprenoid-Vorrat in der Zelle erschöpft werden. Aus diesem Grund beträgt der Inkubationszeit in den meisten Studien zu pleiotropen Effekten von Statinen mehrere Stunden. Häufig wird angegeben, dass die Zellen über Nacht mit Statinen vorinkubiert wurden [154, 168, 173, 177, 182, 189, 191, 198, 207]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Simvastatin innerhalb von wenigen Sekunden die Aktivierung von Monozyten durch einen monoklonalen Lipid-bindenden aPL inhibieren kann. Das Mevalonat zeigte keinen Einfluss auf die Statin-induzierte Hemmung der Aktivierung in Monozyten, was angesichts der raschen Wirkungseintritt nicht verwunderlich ist. Bis dato sind zahlreiche Studien über die Mevalonat-abhängigen pleiotropen Effekte der Statine veröffentlicht worden, während den Mevalonat-unabhängigen Wirkungen vergleichsweise wenig Aufmerksamkeit geschenkt wurde [212]. Einige Studien scheinen darauf hinzuweisen, dass die akuten Mevalonat-unabhängigen Effekte möglicherweise nicht so

selten sind, wie die bescheidene Menge an Studien vermuten lässt, sondern infolge der langen Inkubationszeiten unbeachtet blieben. So beobachteten Stein et al., dass Fluvastatin die Chemotaxis der vaskulären glatten Muskelzellen in Abhängigkeit von der Länge der Inkubationszeit entweder Mevalonat-abhängig oder Mevalonat-unabhängig inhibiert. Nach einer Inkubation von 20 Stunden inhibierte Fluvastatin die Chemotaxis auf eine Mevalonat-abhängige Weise. Eine Inkubation mit Fluvastatin für nur 20 Minuten löste eine vergleichbar starke Reduktion der Chemotaxis (34% vs. 38%) aus, die jedoch nicht durch Mevalonat aufgehoben werden konnte [238]. Ghalali et al. haben demonstriert, dass Statine je nach der Länge der Inkubation und der Zellart entweder Mevalonat-abhängige oder Mevalonat-unabhängige pleiotrope Effekte aufweisen. Nach einer langen Inkubation von 48 Stunden war der anti-invasive Effekt von Atorvastatin in Prostatakarzinomzellen Mevalonat-abhängig. Nach einer kurzen Inkubation von ein paar Minuten konnte die Hemmung der Invasion nicht durch Mevalonat entgegengewirkt werden [239]. Auch Weitz-Schmidt et al. haben gezeigt, dass Statine die Chemotaxis Mevalonat-unabhängig inhibieren können [196]. Zugleich gelang es ihnen, den dieser Mevalonat-unabhängigen Wirkung zugrundeliegenden Mechanismus aufzuklären. Sie zeigten, dass mehrere Statine mit Ausnahme von Pravastatin selektiv auf eine allosterische Bindungsstelle am Lymphozyten-Funktions-assoziierten Antigen 1 (LFA-1) auf der Oberfläche der Lymphozyten binden und dadurch die LFA-1-vermittelte Adhäsion und Kostimulation von Lymphozyten blockieren. Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass Statine in der Lage sind, durch eine direkte Interaktion mit Oberflächenmolekülen in die Immunantwort einzugreifen.

7.4 Simvastatin wirkt auf der Zelloberfläche der Monozyten

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Simvastatin und Pravastatin schon nach einer kurzen Vorinkubation von 15 min die Aktivierung der Monozyten durch HL5B vollständig hemmen. Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten, da die meisten pleiotropen Effekte der Statine eine Folge der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase und damit des Mangels an Cholesterinsynthese-Zwischenprodukte darstellen. Es ist unwahrscheinlich, dass eine so kurze Hemmung der HMG-CoA-Reduktase dermaßen den intrazellulären Cholesterin-Zwischenprodukte-Spiegel beeinflusst, dass die Mevalonat-abhängige Zellprozesse wie Endozytose oder zelluläre Signaltransduktion, die unter anderem für die Zellaktivierung durch aPL essenziell sind [86], nicht mehr funktionieren. Deswegen haben wir den Zeitverlauf genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Zugabe von Simvastatin innerhalb von 30 min vor bis 15 s nach dem aCL HL5B dessen Wirkung vollständig inhibieren kann. Der rasche

Wirkungseintritt führte zur Hypothese, dass Simvastatin, im Gegensatz zu bisher bekannten pleiotropen Wirkmechanismen, die aPL-induzierte Zellaktivierung durch eine direkte Interaktion mit der Zelloberfläche hemmt. Auch die weiteren Ergebnisse dieser Arbeit stärken diese Hypothese - wurde das Zellkulturmedium mit Simvastatin vor der Inkubation mit Lipid-bindenden aPL durch frisches Medium ersetzt, konnte die Zellaktivierung durch Lipid-bindende aPL wieder nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass die intrazellulär aufgenommenen Simvastatin-Moleküle und deren Auswirkung auf die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, Endozytose oder intrazelluläre Signaltransduktion keine wesentliche Rolle bei dem beobachteten anti-inflammatorischen Effekt des Medikaments auf Monozyten spielen. Weiter lässt sich aus dem Ergebnis dieses Experiments ableiten, dass nur Simvastatin an der äußeren, extrazellulären Seite der Zellmembran entscheidend für die Hemmung der Expression von TNF α mRNA durch aPL ist. Denkbar wäre, dass Statine die Bindung von Lipid-bindenden aPL an seinen Liganden EPCR-LBPA auf der Zellmembran kompetieren oder, dass sie die Endozytose des aPL/EPCR/LBPA-Komplexes und somit die daran anschließende Aktivierung der entzündlichen Signalwege stören. Im konfokalen Mikroskop lässt sich visualisieren, wie die Lipid-bindende aPL in Monozyten aufgenommen und ins Endosom transportiert werden. Bei gestörter Aufnahme in die Zelle, wie dies bei der HL5B-Antikörperfragmente ohne ihre Fc-Region der Fall ist, würde sich mikroskopisch eine Fluoreszenz der Zellmembran zeigen. Da die HL5B-F(ab)₂-Fragmente durch Abspalten von Fc-Region nicht ihre Fähigkeit verlieren, an EPCR/LBPA auf der Zelloberfläche zu binden. Bei Vorbehandlung der Monozyten mit Simvastatin zeigte sich keine Fluoreszenz in der Zelle oder auf der Zelloberfläche. Daraus lässt sich schließen, dass Simvastatin wahrscheinlich mit der Bindung von Lipid-bindenden aPL HL5B an dessen Ligand EPCR/LBPA interferiert.

7.5 Simvastatin hemmt kompetitiv die Bindung von Lipid-bindenden aPL an seinen Ligand EPCR/LBPA-Komplex

Im konfokalen Mikroskop wurde beobachtet, dass Simvastatin bereits die Bindung von Lipid-bindenden aPL an deren Ligand EPCR-LBPA-Komplex stört. Da LBPA zu den Phospholipiden gehört und sich aus einem hydrophilen Kopf und hydrophoben Schwanz zusammensetzt, könnte sie ein mögliches Target für hydrophobe Statine darstellen. Deswegen wurde in dieser Arbeit untersucht, ob LBPA oder EPCR/LBPA als Target für Statine fungieren könnte.

1998 haben Kobayashi et al. die anti-LBPA-Antikörper entdeckt und ihre Rolle in der Pathogenese des APS beschrieben. Da LBPA nur in späten Edosomen auftritt, wo sie Cholesterin-Transport reguliert [240], wurde mehrere Theorien vorgeschlagen, wie LBPA in

den Kontakt mit den im Blut zirkulierenden Antikörpern kommt. Einige Autoren haben vermutet, dass die anti-LBPA die Zellen durchdringen und so die Endosome erreichen können [241]. Weitere Theorien begründeten die Entstehung der anti-LBPA-Antikörper damit, dass LBPA während einer Exozytose [242] oder Apoptose [243] zur Zelloberfläche transportiert wird. 2021 haben Müller-Calleja et al. einen neuen Mechanismus entschlüsselt, der das Vorkommen dieses endosomalen Phospholipids auf der Zelloberfläche erklärt [86]. Sie zeigten, dass LBPA mit einem Rezeptor EPCR interagiert, der das Phospholipid auf der Zelloberfläche präsentiert und für aPL zugänglich macht. LBPA gelangt an den EPCR beim Rezeptorrecycling im Endosom und wird als EPCR/LBPA-Komplex an die Zelloberfläche gebracht. Der EPCR ist mit den CD1-Molekülen verwandt [244] und kann, ähnlich wie CD1, Lipide in seiner hydrophoben Rinne binden und präsentieren. Zugleich definierten Müller-Calleja et al. ein neues Zielantigen für Lipid-bindende aPL - ein EPCR mit gebundenem LBPA. Am Beispiel von Monozyten aus Procr^{C/S}-Mäusen und humanen ALIX^{-/-}-Trophoblastzellen demonstrierten sie, dass die Anwesenheit von LBPA auf EPCR unentbehrlich für die Bindung von Lipid-bindenden aPL und darauffolgende pathologische Veränderungen in der Zelle ist. In ihrer Arbeit haben sie die Genexpression von ALIX (ALG-2 interacting protein X) – einem zytoplasmatischen Protein, das zum Transport von LBPA erforderlich ist [245] - durch einen Knockdown mittels CRISPR/Cas in Trophoblastzellen blockiert und somit die LBPA Beladung im Endosom verhindert. Ähnliche Effekte konnte in Zellen aus Procr^{C/S} Mäusen beobachtet werden, bei denen eine Punktmutation im EPCR Gen das Rezeptorrecycling des EPCR verhindert. Beide dieser Genveränderungen hatten zur Folge, dass EPCR auf der Oberfläche dieser Zellen vermutlich entweder mit keinem oder mit einem anderen Phospholipid als LBPA beladen vorlag, wodurch die Zellen vor den schädlichen Auswirkungen der Lipid-bindenden aPL geschützt wurden. Durch einfache Zugabe von LBPA ins Zellkulturmedium konnte die Aktivierung der Zellen mit dem Lipid-bindenden aPL wiederhergestellt werden. Andere Phospholipide wie Cardiolipin und PS zeigten keinen Effekt. Das deutet darauf hin, dass ohne LBPA auf dem EPCR keine aPL-induzierte Stimulation stattfinden kann. Aufgrund dieser Erkenntnisse haben wir ein ähnliches Experiment durchgeführt. Auch unsere Ergebnisse zeigen, dass die einfache Zugabe von LBPA die Induktion der TNF α mRNA durch Lipid-bindende aPL wenigstens teilweise wiederherstellen kann. Damit übereinstimmend konnte nach der Zugabe von LBPA mikroskopisch eine Wiederherstellung der Statin-induzierten Hemmung der Internalisierung von aPL gezeigt werden. Es kommen mehrere Möglichkeiten in Frage, wie Statine die Bindung von aPL an den EPCR/LBPA-Komplex stören. Denkbar wäre, dass die Statine mit LBPA um die hydrophobe Rinne des EPCR kompetieren und LBPA von

der Bindungsstelle am EPCR verdrängen. Oder, dass Statine mit aPL um eine Bindungsstelle am EPCR bzw. EPCR/LBPA kompetieren. Es ist auch möglich, dass die Statine allosterisch den Rezeptor so verändern, dass aPL und/oder LBPA nicht mehr binden können. In diesem Fall würde jedoch wahrscheinlich die Zugabe von LBPA nicht die Kontrollbedingungen wiederherstellen. Die Vermutung, dass die Statine mit LBPA oder aPL um die Bindungsstelle am Rezeptor kompetieren, wird auch dadurch unterstützt, dass Simvastatin die Bindung von anti-EPCR/LBPA 1682 aber nicht von anti-EPCR 1650 in Mausmonozyten inhibiert. Die unveränderte Bindung von anti-EPCR 1650 deutet darauf hin, dass Statine nicht die Expression des EPCR auf der Zelloberfläche beeinflussen.

Anti-EPCR/LBPA 1682 ist ein Antikörper, der an EPCR bindet, wenn der Rezeptor mit dem Phospholipid LBPA beladen ist. Er blockiert die Signalübertragung und Internalisierung der Lipid-bindenden aPL, nicht jedoch die Aktivierung des Proteins C durch EPCR. Diese Eigenschaften des anti-EPCR/LBPA 1682 öffnen die Tür für neue therapeutische Anwendungen in APS, die bei Mäusen bereits erfolgreich getestet wurden. So reduziert anti-EPCR/LBPA 1682 bei MRL-Fas^{lpr} Mäusen, die spontan aPL und eine lupus-ähnliche Symptomatik entwickeln, die Bildung von aPL, renale Immunzellinfiltration sowie Nierenschädigung. Anti-EPCR 1650, dahingegen, bindet an anti-EPCR mit oder ohne LBPA, verhindern die Signalübertragung nicht und weist keine therapeutischen Eigenschaften auf [86]. Wildtyp-Mäuse, die mit anti-EPCR/LBPA 1682 behandelt wurde, wurden vor Thrombose ausgelöst durch Lipid-bindende aPL geschützt. Der anti-EPCR/LBPA 1650 wiederum hatte keinen Einfluss auf die Thrombenbildung. Besonders an dem anti-EPCR/LBPA 1682 ist, dass er die durch den Lipid-bindenden aPL HL5B ausgelöste Symptome des APS reduzieren kann ohne mit diesem um die Bindungsstellen am EPCR/LBPA-Komplex zu konkurrieren. Diesen scheinbar paradoxen Eigenschaften des anti-EPCR/LBPA ging Müller-Calleja et al. in weiterführenden Experimenten auf den Grund. Sie wiesen nach, dass anti-EPCR/LBPA 1682 über die Bindung an EPCR/LBPA die Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (ASMase) hemmen kann, die für Aufnahme der Lipid-bindenden aPL in Endosomen und weitere Signalübertragung erforderlich ist. ASMase ist ein Enzym, das den Abbau von Sphingomyelin katalysiert. Sphingomyelin und Phosphatidylcholin befinden sich häufig in der Außenschicht der Plasmamembran, während Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin in der inneren Membranhälfte lokalisiert sind. Nach der Bindung von Lipid-bindenden aPL an den EPCR/LBPA-Komplex kommt es vermittelt über Thrombin zur Aktivierung und zur Translokation der ASMase auf die Zelloberfläche und Umlagerung von PS auf die Außenseite der Plasmamembran [86]. Hydrolyse des Sphingomyelins durch die ASMase in der äußeren

Schicht der Plasmamembran sowie Externalisierung von PS auf die äußere Plasmamembran tragen zur Encryptung des TF auf der Zelloberfläche bei, wodurch TF aktiv wird und anschließend über den extrinsischen Weg die Fibrinbildung initiiert [86, 246, 247]. Zum anderen bindet der anionische Phospholipid PS auf der äußeren Seite der Plasmamembran über Ca^{2+} -Brücken ebenfalls negativ geladene Gerinnungsfaktoren. Dies führt zu Anreicherung der ansich im Blut nur in Spuren vorkommenden Gerinnungsfaktoren und ihren Kofaktoren, was die Enzymaktivität der Gerinnungsfaktoren erheblich erhöht und eine optimale Spaltung ihrer Substrate ermöglicht. So kann anti-EPCR/LBPA 1682 über die Hemmung der ASMase die prokoagulante Wirkung der Lipid-bindenden aPL bereits vor deren Internalisierung hemmen, wodurch auch die nachgeschalteten intrazellulären Effekte der aPL unterdrückt werden.

7.6 Der Einfluss von Cholesterinverteilung in der Zelle und Zellemembran auf die Zellaktivierung durch Lipid-bindende aPL

Wie Müller-Calleja zeigen konnte, sind intakte Lipid Rafts wichtig für die Aufnahme der Lipid-bindenden aPL in den Endosomen. Die Zerstörung der Lipid Rafts durch Substanzen, die den Zellen Cholesterin entziehen, wie beispielweise M β CD verhindert die Internalisierung von aPL in Monozyten und somit die Zellaktivierung [248]. Deswegen wurde die Hypothese geprüft, ob Statine die durch Lipid-bindende aPL-induzierte Aktivierung der Monozyten durch eine Cholesterin-Depletion in Lipid Rafts hemmen. Bei der Vorbehandlung der Zellen mit Simvastatin oder Pravastatin konnte die aPL-induzierte Zellaktivierung durch Zugabe von LBPA in Monozyten wiederhergestellt werden, was dahingegen bei der Vorbehandlung mit M β CD nicht der Fall war. Das lässt darauf schließen, dass der EPCR sich nach der Vorbehandlung durch M β CD nicht mehr auf Zelloberfläche befand oder seine Funktionalität durch Zerstörung der Lipid-Rafts stark beeinträchtigt wurde. In dieser Arbeit wurde erneut bestätigt, dass die Cholesterin-Zusammensetzung der Zellmembran zwar eine wesentliche Rolle bei der aPL-induzierten Zellaktivierung spielt, diese aber nicht durch Statine verändert wird.

Am Beispiel von U18666A konnte nochmals verdeutlicht werden, dass die Hemmung der aPL-induzierten Zellaktivierung auf der Zelloberfläche stattfindet. Die Vorbehandlung der Zellen mit U18666A verursacht eine intrazelluläre Cholesterinumverteilung, die dem histologischen Bild der Niemann Pick Krankheit Typ C ähnelt [226]. Da die Statine auch in den intrazellulären Cholesterin-Metabolismus eingreifen, stellten wir die Hypothese auf, dass Statine die aPL-induzierte Zellaktivierung durch Cholesterinumverteilung hemmen. In der Tat konnte das U18666A die Induktion der TNF α mRNA durch aPL hemmen und die Zugabe der LBPA, zu

unserer Überraschung, die TNF α -Induktion wiederherstellen. Wir vermuten daher, dass das U18666A die aPL-induzierte Hochregulierung der TNF α mRNA nicht durch eine Umverteilung des Cholesterins in der Zelle, sondern ähnlich wie Simvastatin und Pravastatin, durch eine Interaktion mit EPCR/LBPA auf der Zelloberfläche hemmt. Für die beobachteten Ergebnisse könnte eine Wechselwirkung von dem positiv geladenen U18666A mit anionischen Phospholipiden, darunter LBPA, und die hohe eingesetzte Konzentration von U18666A verantwortlich sein. Die Zellexperimente mit M β CD, U18666A und Mevalonat haben die Vermutung widerlegt, dass Statine die Hemmung der Induktion der TNF α mRNA in Monozyten durch Veränderungen im Cholesterinmetabolismus auslösen.

7.7 Simvastatin hemmt die Expression von TF mRNA in Endothelzellen sowohl Mevalonat-abhängig als auch Mevalonat-unabhängig

Neben Monozyten spielen Endothelzellen ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des APS. aPL erhöhen die Expression von Adhäsionsmolekülen [207, 249], TF [250] sowie von Endothelin-1 [249, 251] und IL-6 [207] in Endothelzellen. Zudem hemmen aPL die endotheliale NO-Synthase [119, 252] und induzieren die Proliferation der Endothelzellen und Intimahyperplasie [253]. Die aPL-induzierte Endotheldysfunktion, -aktivierung und -proliferation begünstigen die Entstehung einer Vaskulopathie [253] und Thrombosen [119, 254], welche vermutlich zu einem erhöhten Risiko für arterielle und venöse Thrombosen einschließlich Myokardinfarkt und Schlaganfall bei APS-Patienten beitragen [15].

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass Statine die durch Lipid-bindende aPL-induzierte Zellaktivierung auch in Endothelzellen hemmen können. Wie bereits in den Monozyten demonstriert, konnte LBPA die Hemmung der durch aPL hervorgerufenen Hochregulierung von TF durch Statine aufheben. Dies deutet darauf hin, dass Simvastatin seine Wirkung in Endothelzellen über den gleichen Mechanismus - vermutlich über eine kompetitive Hemmung der Bindung von aPL an den EPCR/LBPA-Komplex - ausübt, wie in Monozyten. Anders als in Monozyten scheint aber die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase mitverantwortlich für die pleiotropen Effekte der Statine in Endothelzellen zu sein. Es wurde bisher nicht genau untersucht, wie lange es dauert, bis eine Zelle ihren Vorrat an Zwischenprodukten der Cholesterinsynthese aufbraucht. Daher kann nicht überprüft werden, ob dieses Ergebnis angesichts der Inkubationszeit mit Simvastatin von 30 min plausibel erscheint oder nicht. Zieht man in Betracht, dass mehrere Wiederholungen des Experiments mit HUVEC nicht möglich waren, mag dieses Ergebnis nur ein Zufall sein, aber es könnte auch bedeuten, dass Statine je nach Zellart Mevalonat-abhängig, Mevalonat-unabhängig oder durch

beide Arten der pleiotropen Effekten wirken. So zeigte Ghalali et al., dass Atorvastatin die Invasion der zwei humanen Prostatakarzinomzelllinien entweder Mevalonat-abhängig (PC3 Zellen) oder Mevalonat-unabhängig (DU145 Zellen) hemmen kann [239].

Die Inhibierung der aPL-induzierten Aktivierung der Endothelzellen durch Statine beobachteten auch Meroni et al. [207]. Sie zeigten, dass Fluvastatin und Simvastatin die mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle (ICAM-1 und E-Selectin) und deren Transkriptionsfaktor NF- κ B in HUVEC inhibieren. Anders als in der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen über Nacht mit Statinen vorbehandelt. Mevalonat hob die beobachteten Effekte vollständig auf. Die Herunterregulierung der Adhäsionsmoleküle und NF- κ B gehören zu den gut beschriebenen Mevalonat-abhängigen pleiotropen Wirkungen von Statinen, die aus Studien zu pleiotropen Effekten bei anderen immunologischen Störungen bekannt sind. Somit konnten Meroni et al. zeigen, die Statine ihre anti-inflammatorische Wirkung bei APS über denselben Mechanismus, wie aus anderen Autoimmunkrankheiten bekannt, entfalten. Nämlich über die Hemmung der Synthese von Isoprenylderivaten. Die Tatsache, dass die inhibierenden Effekte der Statine in der Studie von Meroni et al. vollständig durch Zugabe von Mevalonat aufgehoben wurden, lässt vermuten, dass bei APS nur die Mevalonat-abhängigen Effekte eine Rolle spielen. Obwohl, eine eindeutige Beantwortung der Frage, ob Statine die aPL-induzierte Zellaktivierung ausschließlich auf eine Mevalonat-abhängige Weise hemmen, ist wegen der methodischen Einschränkungen dieser Studie nicht möglich. Ein Grund dafür ist, dass in der Studie von Meroni et al. nur mit einem aPL-Subtyp (β 2GPI-aPL) und einer Zelllinie gearbeitet wurde. Der Effekt von Statinen auf die Zellaktivierung durch weitere aPL-Subtypen bei anderen Zelltypen, wie Monozyten, Thrombozyten und dendritische Zellen, die ebenso eine wichtige Rolle in der Pathogenese des APS spielen, wurde nicht untersucht. Ein zweiter Grund ist die lange Präinkubationszeit mit Statinen. Wie bereits in der Abschnitt 7.3. erwähnt, können bei Inkubationszeiten von mehreren Stunden die akute Mevalonat-unabhängige Wirkungen der Statine übersehen werden. Ein dritter Grund liegt in der Quelle der verwendeten aPL. Die Studie von Meroni et al. wurde mit affinitätsaufgereinigten β 2GPI-aPL aus Seren von APS-Patienten durchgeführt. Durch die Affinitätsreinigung von Patientenseren kann zwar eine aPL-Fraktion gegen ein bestimmtes Zielprotein hergestellt werden, aber die isolierte aPL-Fraktion bleibt weiterhin heterogen und beinhaltet Antikörper gegen unterschiedliche Epitope des Zielantigens mit unterschiedlichen Selektivitäten und Affinitäten. Aus diesen Gründen könnten die Mevalonat-unabhängigen pleiotropen Effekte unbeachtet bleiben. Deshalb eignen sich für die Untersuchung der Mechanismen von pleiotropen Effekten der Statine bei APS am besten die monoklonalen aPL. Der monoklonale aPL HL5B macht deutlich, dass die Wirkung von einem

einzigem aPL auf die Induktion der TF mRNA in Endothelzellen sowohl Mevalonat-abhängig als auch Mevalonat-unabhängig - durch eine direkte Interaktion mit einem neulich entdeckten Zielantigen (EPCR/LBPA) für Lipid-bindende aPL - gehemmt werden kann. Dennoch konnte nicht abschließend geklärt werden, ob Statine bei APS-Patienten überwiegend Mevalonat-abhängig oder -unabhängig wirken.

Ferrara et al. zeigten ebenfalls, dass Statine in der Lage sind, die Aktivierung der Endothelzellen zu hemmen [206]. Sie stimulierten die HUVEC mit polyklonalen aPL aus IgG-Fractionen von APS-Patienten und wiesen nach, dass die Wirkung dieser aPL auf die TF-Expression durch Fluvastatin (10µM) gehemmt werden kann. Mevalonat hob die hemmende Wirkung von Fluvastatin auf die aPL-induzierte TF-Expression fast vollständig auf. Ähnlich wie bei der Studie von Meroni et al. erlaubt der Aufbau der Studie von Ferrara et al. ebenso keine Rückschlüsse darüber, ob Statine die aPL-induzierte Zellaktivierung auf eine ausschließlich Mevalonat-abhängige Weise hemmen. Darüber hinaus gibt es in der Studie von Ferrara et al. keine Angaben zur Länge der Präinkubationszeiten mit Fluvastatin.

7.8 Behandlung mit Statinen in Antiphospholipid-Syndrom

Die Therapie des APS umfasst je nach der klinischen Konstellation die Gabe von ASS und/oder Antikoagulation wie Vit. K-Antagonisten, DOAK und Heparin. Laut Euro-Phospholipid-Studie entwickelt etwa 17% der APS-Patienten trotz einer Sekundärprophylaxe mit ASS und/oder Antikoagulantien eine Rezidivthrombose innerhalb von den ersten 5 Jahren und 14% in den zweiten 5 Jahren [255]. Deswegen wird nach weiteren Therapieoptionen gesucht, die die Morbidität und Mortalität der Patienten reduzieren könnten. Der Einsatz von Statinen wird momentan nur bei APS-Patienten mit gleichzeitiger Hyperlipidämie empfohlen [21]. Statine sind wirksam bei primärer und sekundärer Prophylaxe der koronaren Herzkrankheit und des ischämischen Schlaganfalls. Statine zeichnen sich durch eine Reihe von pleiotropen Effekten aus. Neben ihrer gut bekannten Lipid-senkender Wirkung weisen Statine auch anti-atherosklerotische [154, 164-168, 173-175], entzündungshemmende [188-196] und antikoagulante [182, 190, 197-202] Eigenschaften auf. Daher könnten Statine auch bei APS-Patienten die Gefahr einer primären oder sekundären Thrombose verringern, insbesondere, wenn man berücksichtigt, dass eine akzelerierte Atherosklerose [256], Zellaktivierung [257] und Hochregulierung von TF-Expression [103, 236, 237] eine Schlüsselposition in der Pathogenese des APS einnehmen. In-vitro-Untersuchungen ergaben, dass Statine die aPL-induzierte Zellaktivierung hemmen können [206, 207]. Zudem zeigen einige in-vivo Studien, dass Statine den Spiegel von proinflammatorischen und prothrombotischen Markern im

Mausmodell [208] und bei aPL-positiven Patienten [258-260] senken. Mäuse, die mit Fluvastatin behandelt wurden, wiesen signifikant kleinere Thromben und eine geringere Anzahl an adhärenenten Leukozyten auf und dieser Effekt war unabhängig von der cholesterinsenkenden Wirkung des Medikaments [208]. 2021 zeigte eine Studie von Kwon et al. einen direkten Zusammenhang zwischen Statintherapie und reduziertem Thromboserisiko in APS-Patienten [209]. Es handelte sich um eine retrospektive Studie mit APS-Patienten, die wegen einer Dyslipidämie mit Statinen behandelt wurden. Die Therapie mit Statinen wurde mit einem niedrigeren Risiko für Rezidiv-Thrombosen assoziiert, obwohl es keinen signifikanten Unterschied im Cholesterin-Spiegel der APS-Patienten, die Statine einnahmen, im Vergleich zu Nicht-Nutzern gab. Dies lässt vermuten, dass das verminderte Risiko für Rezidivthrombosen in Statin-Benutzern nicht auf eine Cholesterin-senkende Wirkung der Statine sondern auf ihre pleiotropen Effekte zurückzuführen ist. Weil die Statine nur bei Patienten mit Dyslipidämie eingesetzt wurden, bleibt weiterhin unklar, ob auch APS-Patienten ohne Dyslipidämie von der Therapie mit Statinen profitieren würden. In den letzten Jahren gab es Bestrebungen, ein Scoring-System zu erstellen, um das individuelle Risiko eines APS-Patienten für eine Thrombose oder Schwangerschaftskomplikationen zu ermitteln. Dies würde ermöglichen, APS-Patienten nach ihrem Risiko zu stratifizieren, um die Präventions- und Therapiemaßnahmen dementsprechend anzupassen. Die ersten zwei Scoring-Systeme basierten ausschließlich auf aPL [261, 262]. Im Gegensatz dazu wurden im sog. Global APS Score (GAPSS) auch die „klassischen“ Thromboserisikofaktoren wie Hypercholesterinämie und arterielle Hypertonie zur Berechnung herangezogen. Der Hypercholesterinämie wurde im GAPSS die gleiche Punktezahl zugewiesen, wie dem Nachweis von Prothrombin- oder PS Antikörpern [263]. Die Tatsache, dass die Hypercholesterinämie in die GAPSS aufgenommen wurde, spricht stark dafür, dass auch aPL-positive Patienten mit einem erhöhten Risiko für Thrombosen von einer Behandlung mit Statinen profitieren könnten.

Neben den Studien zur antitrombotischen Wirkung der Statine im APS, gibt es Hinweise darauf, dass Statine positiv den Schwangerschaftsverlauf im APS beeinflussen [210, 264]. Eine kleine Studie an 21 Frauen mit APS zeigte, dass Therapie mit Pravastatin mit Verbesserung des plazentaren Blutflusses und milderem Verlauf einer Präeklampsie assoziiert war [210]. Die klinischen Beobachtungen bei schwangeren Frauen mit APS bestätigen somit die Ergebnisse aus Mausmodellen, in denen eine Behandlung mit Statinen fetale Resorption verhinderte [264, 265]. In kleineren Studien in Tiermodellen und am Menschen wurden Pravastatin aufgrund von seinen pleiotropen Wirkungen positive Effekte auf den Verlauf der Präeklampsie und Dysfunktion der Plazenta zugeschrieben [266]. Hingegen konnte in einer randomisierten Studie

mit 1120 Frauen kein positiver Effekt auf Präeklampsie nachgewiesen werden [267]. Pravastatin gehört zur Gruppe der hydrophilen Statine und kann die Plazenta nur begrenzt passieren [268]. In der Vergangenheit haben sich Statine in Tierversuchen als teratogen erwiesen. Neuere Studien an Menschen haben jedoch nicht das gleiche Risiko ergeben [269-271]. Eine neue Studie hat einen Zusammenhang mit einem niedrigeren Geburtsgewicht und Frühgeburten, aber kein erhöhtes Risiko für Missbildungen gezeigt [271]. Die Daten einer Metaanalyse deuten zudem darauf hin dass, ein höheres Fehlgeburtsrisiko eher mit den mütterlichen Begleiterkrankungen als mit einer Einnahme von Statinen zusammenhängen [270]. 2021 hat die amerikanische Arzneimittelbehörde FDA (The U.S. Food and Drug Administration) empfohlen, die Kontraindikationen für Statine in der Schwangerschaft zu lockern [272]. Vor dieser Änderung wurden Statine in der Schwangerschaft und Stillzeit kontraindiziert. Laut FDA können nun Statine in der Schwangerschaft nach sorgfältiger Nutzen-Risiko-Abwägung angewendet werden.

Zusammenfassend, obwohl Statine zunehmend in den Fokus der APS-Forschung rücken, werden für ihren breiteren Gebrauch noch weitere Studien benötigt. Statine können in der Primär- und Sekundärprävention von Thrombosen bei aPL-positiven/APS-Patienten mit Hyperlipidämie von Nutzen sein, aber für eine eindeutige Aussage zur Statin-Therapie bei APS-Patienten ohne Hyperlipidämie sind weitere Studien erforderlich. In refraktären Fällen mit Rezidivthrombosen können Statine als Ergänzung zur Behandlung mit Antikoagulationen in Betracht gezogen werden [21].

7.9 Fazit und Ausblick

Im Rahmen des APS werden aPL produziert, die die Gerinnungsneigung des Blutes und das Risiko für Schwangerschaftskomplikationen und Fehlgeburten erhöhen. Dies zeigt, dass das Immunsystem und das Gerinnungssystem eng miteinander verknüpft sind und die Gerinnung unter anderem auch der Kontrolle des Immunsystems unterliegt. Zur Senkung des Thromboserisikos bei APS-Patienten bieten sich daher zwei therapeutische Strategien an: Gerinnungshemmung und Entzündungshemmung. Statine zeichnen sich dank ihrer pleiotropen Effekte durch beide diese Eigenschaften aus und könnten daher einen neuen therapeutischen Ansatz für APS darstellen. Zurzeit (2022) werden Statine nur bei APS-Patienten mit Hyperlipidämie oder in refraktären Fällen mit rezidivierenden Thrombosen empfohlen [21]. Für eine Erweiterung des Anwendungsbereichs der Statine auf eine primäre oder sekundäre Thrombose-Prävention bei aPL-positiven Patienten ohne Hyperlipidämie sind allerdings noch weitere Studien nötig. Es mangelt insbesondere an großen prospektiven klinischen Studien, welche die Wirksamkeit und Sicherheit der Statine im Kontext des APS belegen könnten. Auch bezüglich des Wirkmechanismus der Statine im Rahmen des APS gibt es noch Fragezeichen. Es ist bereits bekannt, dass Statine den Spiegel von prothrombotischen/proinflammatorische Biomarken wie VEGF, TF und TNF α bei APS-Patienten senken können [258-260]. Aus den wenigen im APS-Modell durchgeführten Studien geht hervor, dass dies auf eine Hemmung der Protein-Prenylierung - den zentralen Wirkmechanismus, über den die Statine deren pleiotropen Effekte ausüben - zurückzuführen ist. Die Hemmung der Prenylierung galt lange als der einzige bekannte pleiotrope Mechanismus der Statine, bis die Arbeitsgruppe von Weitz-Schmidt demonstrierte, dass Statine in der Lage sind, ganz unabhängig von der HMG-CoA-Reduktase ihre anti-entzündlichen Effekte auszuüben, indem sie als allosterische Antagonisten die Konformationsänderung in LFA-1 bewirken, was eine verminderte Affinität des LFA-1 zum ICAM-1 zur Folge hat [196]. Wir entdeckten einen weiteren von der HMG-CoA-Reduktase-unabhängigen pleiotropen Mechanismus. Wir zeigten, dass Simvastatin kompetitiv die Bindung von Lipid-bindenden aPL an ihr Zielantigen an der Zelloberfläche, den EPCR/LBPA-Komplex hemmt und so die prokoagulanten und proentzündlichen Aktivität der aPL neutralisiert. Übertragen auf APS-Patienten könnte dies bedeuten, dass insbesondere die APS-Patientengruppe mit Lipid-bindenden Kofaktor-unabhängigen aPL am meisten von einer Behandlung mit Statinen profitieren könnte. Unsere Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass dies schon bei üblichen Dosen der Statine zu erreichen wäre.

Mit jeder neuen Entdeckung eröffnen sich gleichzeitig neue Fragen. Da alle Experimente in dieser Arbeit im in-vitro-Modell durchgeführt wurden, sollte künftig die klinische Relevanz dieser Ergebnisse in einem in-vivo-Modell, zum Beispiel mit Mäusen, geklärt werden. Mit IgG-Frakturen von APS-Patienten könnte untersucht werden, in welcher Maße die akuten, Mevalonat-unabhängigen Effekte zur Gesamtwirkung der Statine in APS beitragen. Allerdings könnte in solchem Experiment nicht unterschieden werden, welche pleiotropen Mechanismen für die akute Wirkung der Statine verantwortlich sind. Es wäre denkbar, dass Statine an weitere antigene Ziele der aPL (Phospholipide selbst, oder Kofaktoren) binden und so die Bindung von aPL kompetitiv/allosterisch inhibieren.

Die Entdeckung dieses neuen pleiotropen Mechanismus der anti-inflammatorischen und anti-thrombotischen Eigenschaften der Statine in APS bekräftigen die Vermutung, dass auch die APS-Patienten ohne Hyperlipidämie und/oder aPL-positive Patienten von der Behandlung mit Statinen profitieren könnten. Dies würde ein Fortschritt in der Therapie des APS bedeuten.

8 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha\beta$ 2GPI	Anti-beta-2-Glykoprotein I-Antikörper
Abb.	Abbildung
ABCA1	ATP binding cassette transporter A1
aCL	Anti-Cardiolipin-Antikörper
AG	Arbeitsgruppe
ALG-2	apoptosis-linked gene 2
ALIX	ALG-2 interacting protein X
aPL	Antiphospholipid-Antikörper
APS	Antiphospholipid-Syndrom
apoER2	Apolipoprotein E Rezeptor 2
ASMase	saure Sphingomyelinase
ASS	Acetylsalicylsäure
ANX	Annexin A
APC	Antigen-präsentierenden Zellen
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
Arf6	ADP-Ribosylierungsfaktor-6
ATP	Adenosintriphosphat
β 2GPI	Beta-2-Glykoprotein I
C	Kohlenstoffatom
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAPS	Katastrophales Antiphospholipid-Syndrom
CD	cluster of differentiation
CD36	cluster of differentiation 36, Thrombozytenglykoprotein 4
cDNA	komplementäre DNA
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
CIITA	Transaktivators der Klasse II
CMV	Cytomegalievirus
CRP	C-reaktives Protein
CoA	Koenzym A
COX-2	Cyclooxygenase-2
Ct-Wert	cycle-threshold-Wert
CYP	Cytochrom
DAMPs	Schaden-assoziierte molekulare Muster
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOAK	Direkte orale Antikoagulantien
dRVVT	Russel's Viper Venom Time
dsRNA	doppelsträngige RNA
EBV	Epstein-Barr-Virus
E.coli	Escherichia coli
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

Abkürzungsverzeichnis

ET-1	Endothelin-1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EU	endotoxin units
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
F(ab) ₂	fragment antigen binding
Fc	fragment crystallizable
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluorescein isothiocyanat
FPP	Farensylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	hepatitis-C-Virus
HDL	high-density lipoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HO-1	Hämoxidase-1
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICAM	intercellular adhesion molecule 1
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
inkl.	inclusive
INF	Interferon
ISTH	International Society on Thrombosis and Haemostasis
IUGR	Intrauterine Wachstumsretardierung
LA	Lupus Antikoagulans
LBPA	Lysobisphosphatidic-Säure
LDA	low dose aspirin
LDL	low density-lipoprotein
LFA-1	Lymphozyten-Funktions-assoziertes Antigen-1
LMWH	niedermolekulares Heparin
LOX-1	lectin-like oxLDL receptor 1
LPS	Lipopolysaccharid
LRP8	low-density lipoprotein receptor- related protein 8
M. leprae	Mycobacterium leprae
MACS	magnetic activated cell sorting
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	MAP-Kinase
Meval.	Mevalonat
MHC-II	Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse II
min	Minute
mm	Milimeter

Abkürzungsverzeichnis

MM1	MonoMac 1
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
MCP-1	Monozyten-Chemoattraktorprotein-1
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NLR	nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor
NLRP3	MLR family pyrin domain containing 3
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH-Oxidase
NP-C	Niemann-Pick-Krankheit Typ C
NPC1	Niemann-Pick-C1-Protein
ns	nicht signifikant
OR	Odd Ration
oxLDL	oxidierte LDL
p38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
PAI-1	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PAMPs	Pathogenassoziierte molekulare Muster
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PAR- γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor gamma
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Redox	Reduktions-Oxidations
PI3K/Akt	Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B
PP	Pyrophosphat
PS	Phosphatidylserin
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-assoziierte Proteinkinase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehung pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Simv.	Simvastatin
SOD	Superoxid-Dismutase
ssRNA	einzelsträngige RNA
SSW	Schwangerschaftswoche
SLE	Systemischer Lupus erythematodes

Abkürzungsverzeichnis

Tab.	Tabelle
TF	Gewebefaktor, Faktor III
Th	T-Helfer-Zelle
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TLR	Toll-like Rezeptor
t-PA	Gewebespezifischer Plasminogenaktivator
U18666A	(3 β)-3-[2-(Diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one hydrochloride
u.a.	Unter anderem
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1
VKA	Vitamin-K-Antagonisten
VLDL	very low density lipoprotein
z.B.	zum Beispiel

9 Literaturverzeichnis

1. Wassermann, A.N.A.B.C., *Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis*. 1906.
2. Pangborn, M.C., *A New Serologically Active Phospholipid from Beef Heart*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1941. **48**(2): p. 484-486.
3. Moore, J.E. and C.F. Mohr, *The incidence and etiologic background of chronic biologic false-positive reactions in serologic tests for syphilis*. Ann Intern Med, 1952. **37**(6): p. 1156-61.
4. Sanchez Medal, L. and R. Lisker, *Circulating anticoagulants in disseminated lupus erythematosus*. Br J Haematol, 1959. **5**: p. 284-93.
5. Bowie, E.J., et al., *THROMBOSIS IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS DESPITE CIRCULATING ANTICOAGULANTS*. J Lab Clin Med, 1963. **62**: p. 416-30.
6. Manoharan, A., et al., *Recurrent venous thrombosis with a "lupus" coagulation inhibitor in the absence of systemic lupus*. Aust N Z J Med, 1977. **7**(4): p. 422-6.
7. Hughes, G.R., *Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant*. Br Med J (Clin Res Ed), 1983. **287**(6399): p. 1088-9.
8. Bingley, P.J. and B.I. Hoffbrand, *Antiphospholipid antibody syndrome: a review*. J R Soc Med, 1987. **80**(7): p. 445-8.
9. Asherson, R.A., *"Primary" anti-phospholipid syndrome*, in *Phospholipid-binding antibodies*. 2020, CRC Press. p. 377-386.
10. Asherson, R., *The catastrophic antiphospholipid syndrome*. Journal of Rheumatology, 1992. **19**(4): p. 508-512.
11. Jayakody Arachchilage, D. and M. Greaves, *The chequered history of the antiphospholipid syndrome*. British journal of haematology, 2014. **165**(5): p. 609-617.
12. Wilson WA, G.A., Koike T, et al., *International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop*, in *Arthritis & Rheumatism*, A.C.o. Rheumatology, Editor. 1999. p. 1309-1311.
13. Miyakis, S., et al., *International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS)*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(2): p. 295-306.
14. Cervera, R., *Antiphospholipid syndrome*. Thromb Res, 2017. **151 Suppl 1**: p. S43-S47.
15. Cervera, R., et al., *Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(4): p. 1019-27.
16. Abreu, M.M., et al., *The relevance of "non-criteria" clinical manifestations of antiphospholipid syndrome: 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Technical Task Force Report on Antiphospholipid Syndrome Clinical Features*. Autoimmun Rev, 2015. **14**(5): p. 401-14.
17. Vora, S.K., R.A. Asherson, and D. Erkan, *Catastrophic antiphospholipid syndrome*. J Intensive Care Med, 2006. **21**(3): p. 144-59.
18. Asherson, R.A., et al., *Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines*. Lupus, 2003. **12**(7): p. 530-4.
19. Arnaud, L., et al., *Efficacy of aspirin for the primary prevention of thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies: an international and collaborative meta-analysis*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(3): p. 281-91.
20. Arnaud, L., et al., *Patient-level analysis of five international cohorts further confirms the efficacy of aspirin for the primary prevention of thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies*. Autoimmun Rev, 2015. **14**(3): p. 192-200.
21. Cohen, H., et al., *16th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force Report on Antiphospholipid Syndrome Treatment Trends*. Lupus, 2020. **29**(12): p. 1571-1593.
22. Cuadrado, M.J., et al., *Low-dose aspirin vs low-dose aspirin plus low-intensity warfarin in thromboprophylaxis: a prospective, multicentre, randomized, open, controlled trial in patients positive for antiphospholipid antibodies (ALIWAPAS)*. Rheumatology (Oxford), 2014. **53**(2): p. 275-84.

23. Finazzi, G., et al., *A randomized clinical trial of high-intensity warfarin vs. conventional antithrombotic therapy for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid syndrome (WAPS)*. *J Thromb Haemost*, 2005. **3**(5): p. 848-53.
24. Crowther, M.A., et al., *A comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid antibody syndrome*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(12): p. 1133-8.
25. Tektonidou, M.G., et al., *EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults*. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2019. **78**(10): p. 1296-1304.
26. van Es, N., et al., *Direct oral anticoagulants compared with vitamin K antagonists for acute venous thromboembolism: evidence from phase 3 trials*. *Blood*, 2014. **124**(12): p. 1968-75.
27. Pengo, V., et al., *Rivaroxaban vs warfarin in high-risk patients with antiphospholipid syndrome*. *Blood*, 2018. **132**(13): p. 1365-1371.
28. Ordi-Ros, J., et al., *Rivaroxaban Versus Vitamin K Antagonist in Antiphospholipid Syndrome: A Randomized Noninferiority Trial*. *Ann Intern Med*, 2019. **171**(10): p. 685-694.
29. Pengo, V., et al., *Confirmation of initial antiphospholipid antibody positivity depends on the antiphospholipid antibody profile*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2013. **11**(8): p. 1527-1531.
30. Linnemann, B., *Antiphospholipid syndrome – an update*. *Vasa*, 2018. **47**(6): p. 451-464.
31. Pengo, V., et al., *Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome*. *Thromb Haemost*, 2005. **93**(06): p. 1147-1152.
32. Lackner, K.J., D. Manukyan, and N. Müller-Calleja, *Pathophysiological insights into the antiphospholipid syndrome*. *Hamostaseologie*, 2017. **37**(3): p. 202-207.
33. Artim-Esen, B., et al., *Anti-factor Xa antibodies in patients with antiphospholipid syndrome and their effects upon coagulation assays*. *Arthritis Research & Therapy*, 2015. **17**(1): p. 47.
34. Jones, D.W., et al., *Reduced factor XII levels in patients with the antiphospholipid syndrome are associated with antibodies to factor XII*. *Br J Haematol*, 2000. **110**(3): p. 721-6.
35. Misasi, R., et al., *"New" antigenic targets and methodological approaches for refining laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome*. *J Immunol Res*, 2015. **2015**: p. 858542.
36. Blank, M., et al., *Induction of anti-phospholipid syndrome in naive mice with mouse lupus monoclonal and human polyclonal anti-cardiolipin antibodies*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(8): p. 3069-73.
37. Bakimer, R., et al., *Induction of primary antiphospholipid syndrome in mice by immunization with a human monoclonal anticardiolipin antibody (H-3)*. *J Clin Invest*, 1992. **89**(5): p. 1558-63.
38. Blank, M. and Y. Shoenfeld, *Beta-2-glycoprotein-I, infections, antiphospholipid syndrome and therapeutic considerations*. *Clinical Immunology*, 2004. **112**(2): p. 190-199.
39. Abdel-Wahab, N., et al., *Risk of developing antiphospholipid antibodies following viral infection: a systematic review and meta-analysis*. *Lupus*, 2017. **27**(4): p. 572-583.
40. Gharavi, E.E., et al., *Induction of antiphospholipid antibodies by immunization with synthetic viral and bacterial peptides*. *Lupus*, 1999. **8**(6): p. 449-55.
41. Blank, M., et al., *Bacterial induction of autoantibodies to beta2-glycoprotein-I accounts for the infectious etiology of antiphospholipid syndrome*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(6): p. 797-804.
42. Prinz, N., et al., *Structural and functional characterization of a human IgG monoclonal antiphospholipid antibody*. *Immunobiology*, 2011. **216**(1-2): p. 145-51.
43. Merrill, J.T., *Do antiphospholipid antibodies develop for a purpose?* *Curr Rheumatol Rep*, 2006. **8**(2): p. 109-13.
44. Lackner, K.J. and N. Müller-Calleja, *Antiphospholipid Antibodies: Their Origin and Development*. *Antibodies (Basel)*, 2016. **5**(2).
45. Ruff, W.E., S.M. Vieira, and M.A. Kriegel, *The role of the gut microbiota in the pathogenesis of antiphospholipid syndrome*. *Curr Rheumatol Rep*, 2015. **17**(1): p. 472.
46. Rauch, J., et al., *Apoptosis and the antiphospholipid syndrome*. *J Autoimmun*, 2000. **15**(2): p. 231-5.

47. Hernández-Chirlaque, C., et al., *Germ-free and Antibiotic-treated Mice are Highly Susceptible to Epithelial Injury in DSS Colitis*. Journal of Crohn's and Colitis, 2016. **10**(11): p. 1324-1335.
48. Mu, Q., et al., *Control of lupus nephritis by changes of gut microbiota*. Microbiome, 2017. **5**(1): p. 73.
49. Oldstone, M.B., *Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by virus infection*. Science, 1988. **239**(4839): p. 500-2.
50. Ochoa-Repáraz, J., T.O. Kirby, and L.H. Kasper, *The Gut Microbiome and Multiple Sclerosis*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018. **8**(6).
51. Rizzo, A., et al., *Gut inflammation in spondyloarthritis*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2017. **31**(6): p. 863-876.
52. Levine, J.S., et al., *Induction of anti-phospholipid autoantibodies by beta2-glycoprotein I bound to apoptotic thymocytes*. J Autoimmun, 1998. **11**(5): p. 413-24.
53. Shoenfeld, Y., et al., *Infectious origin of the antiphospholipid syndrome*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(1): p. 2-6.
54. Pierangeli, S.S., A.E. Gharavi, and E.N. Harris, *Experimental thrombosis and antiphospholipid antibodies: new insights*. J Autoimmun, 2000. **15**(2): p. 241-7.
55. Pierangeli, S.S., et al., *Effect of human IgG antiphospholipid antibodies on an in vivo thrombosis model in mice*. Thromb Haemost, 1994. **71**(5): p. 670-4.
56. Conley, C.L., R.C. Hartmann, and W.I. Morse, 2nd, *Circulating anticoagulants; a technique for their detection and clinical studies*. Bull Johns Hopkins Hosp, 1949. **84**(3): p. 255-68.
57. Conley, C., *A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus*. J Clin Invest, 1952. **31**: p. 621-622.
58. Bowie, E.W., et al., *Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants*. The Journal of laboratory and clinical medicine, 1963. **62**(3): p. 416-430.
59. Pengo, V., et al., *Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(10): p. 1737-40.
60. Wahl, D.G., et al., *Risk for venous thrombosis related to antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus--a meta-analysis*. Lupus, 1997. **6**(5): p. 467-73.
61. Reynaud, Q., et al., *Risk of venous and arterial thrombosis according to type of antiphospholipid antibodies in adults without systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(6): p. 595-608.
62. Lozier, J., N. Takahashi, and F.W. Putnam, *Complete amino acid sequence of human plasma beta 2-glycoprotein I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(12): p. 3640-4.
63. Bouma, B., et al., *Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure*. Embo j, 1999. **18**(19): p. 5166-74.
64. Agar, C., et al., *Beta2-glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome*. Blood, 2010. **116**(8): p. 1336-43.
65. McDonnell, T., et al., *The role of beta-2-glycoprotein I in health and disease associating structure with function: More than just APS*. Blood Rev, 2020. **39**: p. 100610.
66. Bancsi, L.F.J.M.M., I.K. van der Linden, and R.M. Bertina, *β 2-Glycoprotein I Deficiency and the Risk of Thrombosis*. Thromb Haemost, 1992. **67**(06): p. 649-653.
67. Yasuda, S., et al., *beta(2)-glycoprotein I deficiency: prevalence, genetic background and effects on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis*. Atherosclerosis, 2000. **152**(2): p. 337-46.
68. Giannakopoulos, B., et al., *Deletion of the antiphospholipid syndrome autoantigen β 2 - glycoprotein I potentiates the lupus autoimmune phenotype in a Toll-like receptor 7-mediated murine model*. Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(8): p. 2270-80.
69. Hunt, J.E., R.J. Simpson, and S.A. Krilis, *Identification of a region of beta 2-glycoprotein I critical for lipid binding and anti-cardiolipin antibody cofactor activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(6): p. 2141-5.

70. Hunt, J. and S. Krilis, *The fifth domain of beta 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies.* J Immunol, 1994. **152**(2): p. 653-9.
71. Fadok, V.A., et al., *The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes.* Cell Death Differ, 1998. **5**(7): p. 551-62.
72. Gonzalez-Mejia, M.E. and A.I. Doseff, *Regulation of monocytes and macrophages cell fate.* Front Biosci (Landmark Ed), 2009. **14**(7): p. 2413-31.
73. Chonn, A., S.C. Semple, and P.R. Cullis, *Beta 2 glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes in vivo, suggesting a significant role in the immune clearance of "non-self" particles.* J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25845-9.
74. Agar, C., et al., *β_2 -glycoprotein I: a novel component of innate immunity.* Blood, 2011. **117**(25): p. 6939-47.
75. Gropp, K., et al., *β_2 -glycoprotein I, the major target in antiphospholipid syndrome, is a special human complement regulator.* Blood, 2011. **118**(10): p. 2774-83.
76. Nilsson, M., et al., *The antibacterial activity of peptides derived from human beta-2 glycoprotein I is inhibited by protein H and M1 protein from Streptococcus pyogenes.* Mol Microbiol, 2008. **67**(3): p. 482-92.
77. Ioannou, Y., et al., *Novel assays of thrombogenic pathogenicity in the antiphospholipid syndrome based on the detection of molecular oxidative modification of the major autoantigen β_2 -glycoprotein I.* Arthritis Rheum, 2011. **63**(9): p. 2774-82.
78. Ioannou, Y., et al., *Naturally occurring free thiols within beta 2-glycoprotein I in vivo: nitrosylation, redox modification by endothelial cells, and regulation of oxidative stress-induced cell injury.* Blood, 2010. **116**(11): p. 1961-70.
79. Hanly, J.G. and S.A. Smith, *Anti-beta2-glycoprotein I (GPI) autoantibodies, annexin V binding and the anti-phospholipid syndrome.* Clin Exp Immunol, 2000. **120**(3): p. 537-43.
80. Keeling, D.M., et al., *Role of beta 2-glycoprotein I and anti-phospholipid antibodies in activation of protein C in vitro.* J Clin Pathol, 1993. **46**(10): p. 908-11.
81. White-Adams, T.C., et al., *Identification of coagulation factor XI as a ligand for platelet apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2).* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(10): p. 1602-7.
82. White, T.C., et al., *Protein C supports platelet binding and activation under flow: role of glycoprotein Ib and apolipoprotein E receptor 2.* J Thromb Haemost, 2008. **6**(6): p. 995-1002.
83. Shi, T., et al., *Beta 2-Glycoprotein I binds factor XI and inhibits its activation by thrombin and factor XIIa: loss of inhibition by clipped beta 2-glycoprotein I.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(11): p. 3939-44.
84. Ieko, M., et al., *The putative mechanism of thrombosis in antiphospholipid syndrome: impairment of the protein C and the fibrinolytic systems by monoclonal anticardiolipin antibodies.* Semin Thromb Hemost, 1999. **25**(5): p. 503-7.
85. Müller-Calleja, N. and K.J. Lackner, *Mechanisms of Cellular Activation in the Antiphospholipid Syndrome.* Semin Thromb Hemost, 2018. **44**(5): p. 483-492.
86. Müller-Calleja, N., et al., *Lipid presentation by the protein C receptor links coagulation with autoimmunity.* Science, 2021. **371**(6534).
87. Pierangeli, S.S., et al., *Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanisms.* Semin Thromb Hemost, 2008. **34**(3): p. 236-50.
88. Simoncini, S., et al., *Role of reactive oxygen species and p38 MAPK in the induction of the pro-adhesive endothelial state mediated by IgG from patients with anti-phospholipid syndrome.* International immunology, 2005. **17**(4): p. 489-500.
89. Vega-Ostertag, M., et al., *Involvement of p38 MAPK in the up-regulation of tissue factor on endothelial cells by antiphospholipid antibodies.* Arthritis & Rheumatism, 2005. **52**(5): p. 1545-1554.
90. López-Pedreira, C., et al., *Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF- κ B/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK*

- pathway*. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 2006. **54**(1): p. 301-311.
91. Oku, K., et al., *Essential role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in tissue factor gene expression mediated by the phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody*. Rheumatology, 2013. **52**(10): p. 1775-1784.
 92. Canaud, G., et al., *Inhibition of the mTORC pathway in the antiphospholipid syndrome*. New England Journal of Medicine, 2014. **371**(4): p. 303-312.
 93. Bharadwaj, A., et al., *Annexin A2 Heterotetramer: Structure and Function*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(3): p. 6259-6305.
 94. Hajjar, K.A., A.T. Jacovina, and J. Chacko, *An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II*. J Biol Chem, 1994. **269**(33): p. 21191-7.
 95. Forastiero, R. and M. Martinuzzo, *Prothrombotic mechanisms based on the impairment of fibrinolysis in the antiphospholipid syndrome*. Lupus, 2008. **17**(10): p. 872-7.
 96. Ma, K., et al., *High affinity binding of beta 2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II*. J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 15541-8.
 97. Ling, Q., et al., *Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo*. J Clin Invest, 2004. **113**(1): p. 38-48.
 98. Benaud, C., et al., *AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture*. The Journal of cell biology, 2004. **164**(1): p. 133-144.
 99. Kwon, M., et al., *S100A10, annexin A2, and annexin a2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors*. Frontiers in Bioscience-Landmark, 2005. **10**(1): p. 300-325.
 100. Surette, A.P., et al., *Regulation of fibrinolysis by S100A10 in vivo*. Blood, 2011. **118**(11): p. 3172-3181.
 101. Ma, K., et al., *High affinity binding of β 2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(20): p. 15541-15548.
 102. Zhang, J. and K.R. McCrae, *Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2 glycoprotein I antibodies*. Blood, 2005. **105**(5): p. 1964-9.
 103. Zhou, H., et al., *Involvement of annexin A2 in anti- β 2GPI/ β 2GPI-induced tissue factor expression on monocytes*. Cell Research, 2007. **17**(8): p. 737-739.
 104. Cesarman-Maus, G., et al., *Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin 2, in antiphospholipid syndrome*. Blood, 2006. **107**(11): p. 4375-82.
 105. Allen, K.L., et al., *A novel pathway for human endothelial cell activation by antiphospholipid/anti- β 2 glycoprotein I antibodies*. Blood, 2012. **119**(3): p. 884-93.
 106. Cockrell, E., R. Espinola, and K. McCrae, *Annexin A2: biology and relevance to the antiphospholipid syndrome*. Lupus, 2008. **17**(10): p. 944-952.
 107. Allen, K.L., et al., *A novel pathway for human endothelial cell activation by antiphospholipid/anti- β 2 glycoprotein I antibodies*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2012. **119**(3): p. 884-893.
 108. van Heerde, W.L., P.G. de Groot, and C.P. Reutelingsperger, *The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V*. Thromb Haemost, 1995. **73**(2): p. 172-9.
 109. Rand, J.H. and X.X. Wu, *Antibody-mediated disruption of the annexin-V antithrombotic shield: a new mechanism for thrombosis in the antiphospholipid syndrome*. Thromb Haemost, 1999. **82**(2): p. 649-55.
 110. Rand, J.H., et al., *Resistance to annexin A5 anticoagulant activity: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome*. Lupus, 2008. **17**(10): p. 922-30.
 111. Hunt, B.J., et al., *Resistance to annexin A5 anticoagulant activity in women with histories for obstetric antiphospholipid syndrome*. Am J Obstet Gynecol, 2011. **205**(5): p. 485.e17-23.
 112. de Laat, B., et al., *Correlation between antiphospholipid antibodies that recognize domain I of beta2-glycoprotein I and a reduction in the anticoagulant activity of annexin A5*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1490-4.
 113. Kawasaki, T. and T. Kawai, *Toll-Like Receptor Signaling Pathways*. Frontiers in Immunology, 2014. **5**.

114. Takeda, K. and S. Akira, *TLR signaling pathways*. Semin Immunol, 2004. **16**(1): p. 3-9.
115. Pierangeli, S.S., et al., *Toll-like receptor and antiphospholipid mediated thrombosis: in vivo studies*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(10): p. 1327-33.
116. Raschi, E., et al., *Toll-like receptors: another player in the pathogenesis of the anti-phospholipid syndrome*. Lupus, 2008. **17**(10): p. 937-42.
117. Brandt, K.J., et al., *NF- κ B is activated from endosomal compartments in antiphospholipid antibodies-treated human monocytes*. J Thromb Haemost, 2014. **12**(5): p. 779-91.
118. Prinz, N., et al., *Antiphospholipid antibodies induce translocation of TLR7 and TLR8 to the endosome in human monocytes and plasmacytoid dendritic cells*. Blood, 2011. **118**(8): p. 2322-32.
119. Ramesh, S., et al., *Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via β 2GPI and apoER2*. J Clin Invest, 2011. **121**(1): p. 120-31.
120. Romay-Penabad, Z., et al., *Apolipoprotein E receptor 2 is involved in the thrombotic complications in a murine model of the antiphospholipid syndrome*. Blood, 2011. **117**(4): p. 1408-14.
121. Ulrich, V., et al., *ApoE Receptor 2 Mediation of Trophoblast Dysfunction and Pregnancy Complications Induced by Antiphospholipid Antibodies in Mice*. Arthritis Rheumatol, 2016. **68**(3): p. 730-739.
122. Guglielmone, H., et al., *Cofactor dependence and isotype distribution of anticardiolipin antibodies in viral infections*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2001. **60**(5): p. 500-504.
123. Lackner, K.J., D. Manukyan, and N. Müller-Calleja, *Endosomal Redox Signaling in the Antiphospholipid Syndrome*. Curr Rheumatol Rep, 2017. **19**(4): p. 20.
124. Prinz, N., et al., *Endosomal NADPH-oxidase is critical for induction of the tissue factor gene in monocytes and endothelial cells. Lessons from the antiphospholipid syndrome*. Thromb Haemost, 2013. **109**(3): p. 525-31.
125. Müller-Calleja, N., et al., *Tissue factor pathway inhibitor primes monocytes for antiphospholipid antibody-induced thrombosis*. Blood, 2019. **134**(14): p. 1119-1131.
126. Müller-Calleja, N., et al., *Cofactor-independent antiphospholipid antibodies activate the NLRP3-inflammasome via endosomal NADPH-oxidase: implications for the antiphospholipid syndrome*. Thromb Haemost, 2015. **113**(5): p. 1071-83.
127. Fairhurst, A.M., et al., *Yaa autoimmune phenotypes are conferred by overexpression of TLR7*. Eur J Immunol, 2008. **38**(7): p. 1971-8.
128. Manukyan, D., et al., *Cofactor-independent human antiphospholipid antibodies induce venous thrombosis in mice*. J Thromb Haemost, 2016. **14**(5): p. 1011-20.
129. Norledge, B.V., et al., *The tissue factor/factor VIIa/factor Xa complex: a model built by docking and site-directed mutagenesis*. Proteins, 2003. **53**(3): p. 640-8.
130. Grimsey, N., H. Lin, and J. Trejo, *Endosomal signaling by protease-activated receptors*. Methods Enzymol, 2014. **535**: p. 389-401.
131. McCulloch, K., et al., *Rheumatic Disease: Protease-Activated Receptor-2 in Synovial Joint Pathobiology*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 257.
132. Noorbakhsh, F., et al., *Proteinase-activated receptor 2 modulates neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis*. J Exp Med, 2006. **203**(2): p. 425-35.
133. Abdel Raheem, H.M., et al., *Decreased level of PAR2 in Psoriasis and MF patients receiving Phototherapy*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2019. **35**(4): p. 282-283.
134. Müller-Calleja, N., et al., *Complement C5 but not C3 is expendable for tissue factor activation by cofactor-independent antiphospholipid antibodies*. Blood Adv, 2018. **2**(9): p. 979-986.
135. Scandinavian Simvastatin Survival Study, G., *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)*. The Lancet, 1994. **344**(8934): p. 1383-1389.

136. Sacks, F.M., et al., *The Effect of Pravastatin on Coronary Events after Myocardial Infarction in Patients with Average Cholesterol Levels*. New England Journal of Medicine, 1996. **335**(14): p. 1001-1009.
137. *Prevention of Cardiovascular Events and Death with Pravastatin in Patients with Coronary Heart Disease and a Broad Range of Initial Cholesterol Levels*. New England Journal of Medicine, 1998. **339**(19): p. 1349-1357.
138. Shepherd, J., et al., *Prevention of Coronary Heart Disease with Pravastatin in Men with Hypercholesterolemia*. New England Journal of Medicine, 1995. **333**(20): p. 1301-1308.
139. Downs, J.R., et al., *Primary Prevention of Acute Coronary Events With Lovastatin in Men and Women With Average Cholesterol Levels Results of AFCAPS/TexCAPS*. JAMA, 1998. **279**(20): p. 1615-1622.
140. Group, H.P.S.C., *MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20 536 high-risk individuals: a randomised placebocontrolled trial*. The Lancet, 2002. **360**(9326): p. 7-22.
141. Rageh, A.H., N.N. Atia, and H.M. Abdel-Rahman, *Lipophilicity estimation of statins as a decisive physicochemical parameter for their hepato-selectivity using reversed-phase thin layer chromatography*. J Pharm Biomed Anal, 2017. **142**: p. 7-14.
142. Schachter, M., *Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update*. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2005. **19**(1): p. 117-125.
143. Tam, S.P., et al., *Differences between the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and low density lipoprotein receptor in human hepatoma cells and fibroblasts reside primarily at the translational and post-translational levels*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(25): p. 16764-16773.
144. Kobashigawa, J.A., et al., *Effect of Pravastatin on Outcomes after Cardiac Transplantation*. New England Journal of Medicine, 1995. **333**(10): p. 621-627.
145. Wenke, K., et al., *Simvastatin reduces graft vessel disease and mortality after heart transplantation: a four-year randomized trial*. Circulation, 1997. **96**(5): p. 1398-402.
146. Meiser, B.M., et al., *Simvastatin decreases accelerated graft vessel disease after heart transplantation in an animal model*. Transplant Proc, 1993. **25**(2): p. 2077-9.
147. Kakkis, J.L., et al., *Pravastatin increases survival and inhibits natural killer cell enhancement factor in liver transplanted rats*. J Surg Res, 1997. **69**(2): p. 393-8.
148. Maggard, M.A., et al., *EFFECTS OF PRAVASTATIN ON CHRONIC REJECTION OF RAT CARDIAC ALLOGRAFTS1,2*. Transplantation, 1998. **65**(2): p. 149-155.
149. Murphy, C., et al., *The Role of Structure and Biophysical Properties in the Pleiotropic Effects of Statins*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(22).
150. Russell, D.W., *Cholesterol biosynthesis and metabolism*. Cardiovascular Drugs and Therapy, 1992. **6**(2): p. 103-110.
151. Wang, C.-Y., P.-Y. Liu, and J.K. Liao, *Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results*. Trends in Molecular Medicine, 2008. **14**(1): p. 37-44.
152. Noma, K., N. Oyama, and J.K. Liao, *Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2006. **290**(3): p. C661-C668.
153. Uehata, M., et al., *Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension*. Nature, 1997. **389**(6654): p. 990-994.
154. Hernández-Perera, O., et al., *Involvement of Rho GTPases in the Transcriptional Inhibition of Preproendothelin-1 Gene Expression by Simvastatin in Vascular Endothelial Cells*. Circulation Research, 2000. **87**(7): p. 616-622.
155. Hyvelin, J.-M., et al., *Inhibition of Rho-kinase attenuates hypoxia-induced angiogenesis in the pulmonary circulation*. Circulation research, 2005. **97**(2): p. 185-191.
156. Uehata, M., et al., *Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension*. Nature, 1997. **389**(6654): p. 990-994.

157. Higashi, M., et al., *Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD (P) H oxidase system.* Circulation research, 2003. **93**(8): p. 767-775.
158. Masumoto, A., et al., *Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans.* Hypertension, 2001. **38**(6): p. 1307-10.
159. Rikitake, Y., et al., *Decreased perivascular fibrosis but not cardiac hypertrophy in ROCK1+/- haploinsufficient mice.* Circulation, 2005. **112**(19): p. 2959-2965.
160. Shibuya, M., et al., *Effect of AT877 on cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: Results of a prospective placebo-controlled double-blind trial.* Journal of Neurosurgery, 1992. **76**(4): p. 571-577.
161. Kattoor, A.J., et al., *Oxidative Stress in Atherosclerosis.* Current Atherosclerosis Reports, 2017. **19**(11): p. 42.
162. Görlach, A., et al., *A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall.* Circ Res, 2000. **87**(1): p. 26-32.
163. Sundaresan, M., et al., *Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac 1.* Biochemical Journal, 1996. **318**(2): p. 379-382.
164. Pietsch, A., W. Erl, and R.L. Lorenz, *Lovastatin reduces expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocytic cells.* Biochem Pharmacol, 1996. **52**(3): p. 433-9.
165. Li, D.Y., H.J. Chen, and J.L. Mehta, *Statins inhibit oxidized-LDL-mediated LOX-1 expression, uptake of oxidized-LDL and reduction in PKB phosphorylation.* Cardiovasc Res, 2001. **52**(1): p. 130-5.
166. Tsai, N.W., et al., *Statin therapy reduces oxidized low density lipoprotein level, a risk factor for stroke outcome.* Crit Care, 2014. **18**(1): p. R16.
167. Zelvyte, I., et al., *Modulation of inflammatory mediators and PPARgamma and NFkappaB expression by pravastatin in response to lipoproteins in human monocytes in vitro.* Pharmacol Res, 2002. **45**(2): p. 147-54.
168. Yano, M., et al., *Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages.* Circ Res, 2007. **100**(10): p. 1442-51.
169. Singaraja, R.R., et al., *Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis.* J Clin Invest, 2002. **110**(1): p. 35-42.
170. Bodzioch, M., et al., *The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease.* Nature Genetics, 1999. **22**(4): p. 347-351.
171. Channon, K.M., H. Qian, and S.E. George, *Nitric Oxide Synthase in Atherosclerosis and Vascular Injury.* Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2000. **20**(8): p. 1873-1881.
172. Liao, J.K., *Inhibition of Gi proteins by low density lipoprotein attenuates bradykinin-stimulated release of endothelial-derived nitric oxide.* Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(17): p. 12987-12992.
173. Laufs, U. and J.K. Liao, *Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(37): p. 24266-24271.
174. Kureishi, Y., et al., *The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals.* Nature medicine, 2000. **6**(9): p. 1004-1010.
175. Plenz, G.A., O. Hofnagel, and H. Robenek, *Differential modulation of caveolin-1 expression in cells of the vasculature by statins.* Circulation, 2004. **109**(2): p. e7-e8.
176. Wolfrum, S., et al., *Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt and cardiovascular protection.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(10): p. 1842-7.
177. Lee, T.-S., et al., *Simvastatin induces heme oxygenase-1: a novel mechanism of vessel protection.* Circulation, 2004. **110**(10): p. 1296-1302.

178. Ryter, S.W., J. Alam, and A.M.K. Choi, *Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications*. *Physiological Reviews*, 2006. **86**(2): p. 583-650.
179. Ishikawa, K., et al., *Heme oxygenase-1 inhibits atherosclerotic lesion formation in ldl-receptor knockout mice*. *Circ Res*, 2001. **88**(5): p. 506-12.
180. Juan, S.H., et al., *Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer inhibits the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Circulation*, 2001. **104**(13): p. 1519-25.
181. Bond, M., et al., *Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells*. *Cardiovasc Res*, 2001. **50**(3): p. 556-65.
182. Aikawa, M., et al., *An HMG-CoA Reductase Inhibitor, Cerivastatin, Suppresses Growth of Macrophages Expressing Matrix Metalloproteinases and Tissue Factor In Vivo and In Vitro*. *Circulation*, 2001. **103**(2): p. 276-283.
183. Hernández-Presa, M.A., et al., *Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells*. *Atherosclerosis*, 2002. **160**(1): p. 49-58.
184. Massaro, M., et al., *Statins inhibit cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human endothelial cells: anti-angiogenic actions possibly contributing to plaque stability*. *Cardiovasc Res*, 2010. **86**(2): p. 311-20.
185. Kwak, B., et al., *Statins as a newly recognized type of immunomodulator*. *Nature Medicine*, 2000. **6**(12): p. 1399-1402.
186. Nobes, C. and M. Marsh, *Dendritic cells: New roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake?* *Current Biology*, 2000. **10**(20): p. R739-R741.
187. Youssef, S., et al., *The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease*. *Nature*, 2002. **420**(6911): p. 78-84.
188. Aprahamian, T., et al., *Simvastatin Treatment Ameliorates Autoimmune Disease Associated with Accelerated Atherosclerosis in a Murine Lupus Model*. *The Journal of Immunology*, 2006. **177**(5): p. 3028-3034.
189. Hölschermann, H., et al., *Statins prevent NF-kB transactivation independently of the IKK-pathway in human endothelial cells*. *Atherosclerosis*, 2006. **185**(2): p. 240-245.
190. Hilgendorff, A., et al., *Statins differ in their ability to block NF-kappaB activation in human blood monocytes*. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2003. **41**(9): p. 397-401.
191. Ortego, M., et al., *Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells*. *Atherosclerosis*, 1999. **147**(2): p. 253-61.
192. Seljeflot, I., et al., *Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and atorvastatin in patients with coronary heart disease*. *Atherosclerosis*, 2002. **162**(1): p. 179-185.
193. Kimura, M., et al., *Effects of fluvastatin on leukocyte-endothelial cell adhesion in hypercholesterolemic rats*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 1997. **17**(8): p. 1521-1526.
194. Ridker, P.M., et al., *Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events*. *New England Journal of Medicine*, 2001. **344**(26): p. 1959-1965.
195. Musial, J., et al., *Anti-inflammatory effects of simvastatin in subjects with hypercholesterolemia*. *International journal of cardiology*, 2001. **77**(2-3): p. 247-253.
196. Weitz-Schmidt, G., et al., *Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site*. *Nat Med*, 2001. **7**(6): p. 687-92.
197. Sahebkar, A., et al., *Impact of statin therapy on plasma levels of plasminogen activator inhibitor-1. A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials*. *Thromb Haemost*, 2016. **116**(1): p. 162-71.

198. Mukai, Y., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt negatively regulates plasminogen activator inhibitor type 1 expression in vascular endothelial cells*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2007. **292**(4): p. H1937-H1942.
199. Bourcier, T. and P. Libby, *HMG CoA Reductase Inhibitors Reduce Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression by Human Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cells*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2000. **20**(2): p. 556-562.
200. Eto, M., et al., *Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways*. Circulation, 2002. **105**(15): p. 1756-9.
201. Hölschermann, H., et al., *Simvastatin attenuates vascular hypercoagulability in cardiac transplant recipients*. Transplantation, 2000. **69**(9): p. 1830-6.
202. Aviram, M., et al., *Interactions of platelets, macrophages, and lipoproteins in hypercholesterolemia: antiatherogenic effects of HMG-CoA reductase inhibitor therapy*. J Cardiovasc Pharmacol, 1998. **31**(1): p. 39-45.
203. Osamah, H., et al., *Reduced platelet aggregation after fluvastatin therapy is associated with altered platelet lipid composition and drug binding to the platelets*. Br J Clin Pharmacol, 1997. **44**(1): p. 77-83.
204. Rikitake, Y. and J.K. Liao, *Rho GTPases, Statins, and Nitric Oxide*. Circulation Research, 2005. **97**(12): p. 1232-1235.
205. Hölschermann, H., et al., *Statins prevent NF-kappaB transactivation independently of the IKK-pathway in human endothelial cells*. Atherosclerosis, 2006. **185**(2): p. 240-5.
206. Ferrara, D., et al., *Fluvastatin inhibits up-regulation of tissue factor expression by antiphospholipid antibodies on endothelial cells*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2004. **2**(9): p. 1558-1563.
207. Meroni, P.L., et al., *Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti- β 2-glycoprotein I) antibodies: Effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype*. Arthritis & Rheumatism, 2001. **44**(12): p. 2870-2878.
208. Ferrara, D.E., et al., *Inhibition of the thrombogenic and inflammatory properties of antiphospholipid antibodies by fluvastatin in an in vivo animal model*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(11): p. 3272-9.
209. Kwon, O.C., Y.-B. Park, and M.-C. Park, *Effect of statins on the prevention of recurrent thrombosis in thrombotic antiphospholipid syndrome*. Rheumatology, 2021. **61**(4): p. 1548-1555.
210. Lefkou, E., et al., *Pravastatin improves pregnancy outcomes in obstetric antiphospholipid syndrome refractory to antithrombotic therapy*. J Clin Invest, 2016. **126**(8): p. 2933-40.
211. Khattri, S. and G. Zandman-Goddard, *Statins and autoimmunity*. Immunologic Research, 2013. **56**(2): p. 348-357.
212. Ulivieri, C. and C.T. Baldari, *Statins: from cholesterol-lowering drugs to novel immunomodulators for the treatment of Th17-mediated autoimmune diseases*. Pharmacol Res, 2014. **88**: p. 41-52.
213. Wei, Y.M., et al., *Attenuation by statins of membrane raft-redox signaling in coronary arterial endothelium*. J Pharmacol Exp Ther, 2013. **345**(2): p. 170-9.
214. Kumar, G.A. and A. Chattopadhyay, *Statin-Induced Chronic Cholesterol Depletion Switches GPCR Endocytosis and Trafficking: Insights from the Serotonin(1A) Receptor*. ACS Chem Neurosci, 2020. **11**(3): p. 453-465.
215. de la Roche, M., et al., *Trafficking of cholesterol to the ER is required for NLRP3 inflammasome activation*. J Cell Biol, 2018. **217**(10): p. 3560-3576.
216. Zhuang, L., et al., *Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts*. J Clin Invest, 2005. **115**(4): p. 959-68.
217. Ziegler-Heitbrock, H.W., et al., *Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes*. Int J Cancer, 1988. **41**(3): p. 456-61.
218. von Landenberg, C., et al., *Isolation and Characterization of Two Human Monoclonal Anti-Phospholipid IgG from Patients with Autoimmune Disease*. Journal of Autoimmunity, 1999. **13**(2): p. 215-223.

219. Buschmann, C., et al., *Generation and characterization of three monoclonal IgM antiphospholipid antibodies recognizing different phospholipid antigens*. Ann NY Acad Sci, 2005. **1051**: p. 240-54.
220. Prinz, N., et al., *Structural and functional characterization of a human IgG monoclonal antiphospholipid antibody*. Immunobiology, 2011. **216**(1): p. 145-151.
221. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method*. methods, 2001. **25**(4): p. 402-408.
222. von Landenberg, C., et al., *Isolation and characterization of two human monoclonal anti-phospholipid IgG from patients with autoimmune disease*. J Autoimmun, 1999. **13**(2): p. 215-23.
223. Cavallini, G. and E. Massarani, *Contributo Alle Relazioni Fra Costituzioni Chimica Ed Attivita Biologica*. Sci. e tee (pavia), 1951. **6**: p. 291-299.
224. Cenedella, R.J., *Cholesterol Synthesis Inhibitor U18666A and the Role of Sterol Metabolism and Trafficking in Numerous Pathophysiological Processes*. Lipids, 2009. **44**(6): p. 477-487.
225. Lange, Y., J. Ye, and J. Chin, *The fate of cholesterol exiting lysosomes*. J Biol Chem, 1997. **272**(27): p. 17018-22.
226. Lu, F., et al., *Identification of NPC1 as the target of U18666A, an inhibitor of lysosomal cholesterol export and Ebola infection*. Elife, 2015. **4**.
227. Liscum, L. and J.J. Klasek, *Niemann-Pick disease type C*. Curr Opin Lipidol, 1998. **9**(2): p. 131-5.
228. Lange, Y., et al., *Cholesterol movement in Niemann-Pick type C cells and in cells treated with amphiphiles*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(23): p. 17468-17475.
229. Ko, D.C., et al., *Dynamic movements of organelles containing Niemann-Pick C1 protein: NPC1 involvement in late endocytic events*. Molecular biology of the cell, 2001. **12**(3): p. 601-614.
230. Owen, D.M., *Methods in membrane lipids*. Vol. 1232. 2015: Springer.
231. Ohtani, Y., et al., *Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes*. Eur J Biochem, 1989. **186**(1-2): p. 17-22.
232. Kilsdonk, E.P., et al., *Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins*. J Biol Chem, 1995. **270**(29): p. 17250-6.
233. Kabouridis, P.S., et al., *Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes*. European journal of immunology, 2000. **30**(3): p. 954-963.
234. Björkhem-Bergman, L., J.D. Lindh, and P. Bergman, *What is a relevant statin concentration in cell experiments claiming pleiotropic effects?* Br J Clin Pharmacol, 2011. **72**(1): p. 164-5.
235. Döring, Y., et al., *Human antiphospholipid antibodies induce TNF α in monocytes via Toll-like receptor 8*. Immunobiology, 2010. **215**(3): p. 230-41.
236. Amengual, O., et al., *The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome*. Thromb Haemost, 1998. **79**(2): p. 276-81.
237. Roubey, R.A.S., *Tissue Factor Pathway and the Antiphospholipid Syndrome*. Journal of Autoimmunity, 2000. **15**(2): p. 217-220.
238. Stein, J.J., K.G. Maier, and V. Gahtan, *Abstract 488: Acute Fluvastatin Pleiotropy Is Mevalonate Independent*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2012. **32**(suppl_1): p. A488-A488.
239. Ghalali, A., et al., *Atorvastatin prevents ATP-driven invasiveness via P2X7 and EHBP1 signaling in PTEN-expressing prostate cancer cells*. Carcinogenesis, 2014. **35**(7): p. 1547-1555.
240. Kobayashi, T., et al., *Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport*. Nature Cell Biology, 1999. **1**(2): p. 113-118.
241. Cheng, H.-M., *Cell penetration by antiphospholipid autoantibodies*. Immunology Today, 1998. **19**(1): p. 49.
242. Laulagnier, K., et al., *Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization*. Biochem J, 2004. **380**(Pt 1): p. 161-71.
243. Sorice, M., et al., *Cardiolipin and its metabolites move from mitochondria to other cellular membranes during death receptor-mediated apoptosis*. Cell Death Differ, 2004. **11**(10): p. 1133-45.

244. Oganessian, V., et al., *The Crystal Structure of the Endothelial Protein C Receptor and a Bound Phospholipid*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**: p. 24851-4.
245. Matsuo, H., et al., *Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization*. Science, 2004. **303**(5657): p. 531-4.
246. Wang, J., U.R. Pendurthi, and L.V.M. Rao, *Sphingomyelin encrypts tissue factor: ATP-induced activation of A-SMase leads to tissue factor decryption and microvesicle shedding*. Blood Adv, 2017. **1**(13): p. 849-862.
247. Rao, L. and U. Pendurthi, *Regulation of tissue factor coagulant activity on cell surfaces*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2012. **10**(11): p. 2242-2253.
248. Prinz, N., et al., *Antiphospholipid antibodies induce translocation of TLR7 and TLR8 to the endosome in human monocytes and plasmacytoid dendritic cells*. Blood, 2011. **118**(8): p. 2322-2332.
249. Simantov, R., et al., *Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies*. J Clin Invest, 1995. **96**(5): p. 2211-9.
250. Pierangeli, S.S., M. Vega-Ostertag, and E. Nigel Harris, *Intracellular signaling triggered by antiphospholipid antibodies in platelets and endothelial cells: a pathway to targeted therapies*. Thrombosis Research, 2004. **114**(5): p. 467-476.
251. Atsumi, T., et al., *Arterial disease and thrombosis in the antiphospholipid syndrome: A pathogenic role for endothelin 1*. Arthritis & Rheumatism, 1998. **41**(5): p. 800-807.
252. Ramesh, S., et al., *Antiphospholipid antibodies promote leukocyte–endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via β 2GPI and apoER2*. The Journal of clinical investigation, 2011. **121**(1): p. 120-131.
253. Canaud, G., C. Legendre, and F. Terzi, *AKT/mTORC pathway in antiphospholipid-related vasculopathy: a new player in the game*. 2015, Sage Publications Sage UK: London, England. p. 227-230.
254. Pierangeli, S.S., et al., *Antiphospholipid Antibodies From Antiphospholipid Syndrome Patients Activate Endothelial Cells In Vitro and In Vivo*. Circulation, 1999. **99**(15): p. 1997-2002.
255. Cervera, R., et al., *Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients*. Ann Rheum Dis, 2015. **74**(6): p. 1011-8.
256. Soltész, P., et al., *Cardiac manifestations in antiphospholipid syndrome*. Autoimmunity Reviews, 2007. **6**(6): p. 379-386.
257. Willis, R. and S.S. Pierangeli, *Pathophysiology of the antiphospholipid antibody syndrome*. Autoimmunity highlights, 2011. **2**(2): p. 35-52.
258. López-Pedraza, C., et al., *Global effects of fluvastatin on the prothrombotic status of patients with antiphospholipid syndrome*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(4): p. 675-82.
259. Jajoria, P., et al., *Statins for the treatment of antiphospholipid syndrome?* Ann N Y Acad Sci, 2009. **1173**: p. 736-45.
260. Erkan, D., et al., *A prospective open-label pilot study of fluvastatin on proinflammatory and prothrombotic biomarkers in antiphospholipid antibody positive patients*. Ann Rheum Dis, 2014. **73**(6): p. 1176-80.
261. Sciascia, S., M.J. Cuadrado, and M.Y. Karim, *Management of infection in systemic lupus erythematosus*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2013. **27**(3): p. 377-89.
262. Otomo, K., et al., *Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(2): p. 504-12.
263. Sciascia, S. and M.L. Bertolaccini, *Thrombotic risk assessment in APS: the Global APS Score (GAPSS)*. Lupus, 2014. **23**(12): p. 1286-7.
264. Redecha, P., et al., *Neutrophil activation by the tissue factor/Factor VIIa/PAR2 axis mediates fetal death in a mouse model of antiphospholipid syndrome*. J Clin Invest, 2008. **118**(10): p. 3453-61.

265. Redecha, P., et al., *Pravastatin prevents miscarriages in mice: role of tissue factor in placental and fetal injury*. *Blood*, 2009. **113**(17): p. 4101-4109.
266. Wei, J., J.K. Liao, and C.N. Bairey Merz, *Challenging Statin Pleiotropy: Preeclampsia*. *Circulation*, 2021. **144**(9): p. 680-683.
267. Döbert, M., et al., *Pravastatin Versus Placebo in Pregnancies at High Risk of Term Preeclampsia*. *Circulation*, 2021. **144**(9): p. 670-679.
268. Nanovskaya, T.N., et al., *Transplacental transfer and distribution of pravastatin*. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2013. **209**(4): p. 373.e1-373.e3735.
269. Winterfeld, U., et al., *Pregnancy outcome following maternal exposure to statins: a multicentre prospective study*. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 2013. **120**(4): p. 463-471.
270. Zarek, J. and G. Koren, *The Fetal Safety of Statins: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 2014. **36**(6): p. 506-509.
271. Taguchi, N., et al., *Prenatal exposure to HMG-CoA reductase inhibitors: effects on fetal and neonatal outcomes*. *Reprod Toxicol*, 2008. **26**(2): p. 175-7.
272. (Internet), T.U.S.F.a.D.A. *FDA requests removal of strongest warning against using cholesterol-lowering statins during pregnancy; still advises most pregnant patients should stop taking statins*. 2021; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-requests-removal-strongest-warning-against-using-cholesterol-lowering-statins-during-pregnancy>.