

Wirkung der Transglutaminase (Faktor XIII) auf die endotheliale Schrankenfunktion

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität**

**vorgelegt von Amir Hossein Hajimohammad
aus Teheran**

Gießen 2001

Physiologisches Institut

**Direktor : Prof. Dr. Dr. H. M. Piper
des Universitätsklinikums Gießen**

Gutachter : PD. Dr. Thomas Noll

Gutachter : Prof. Dr. Dr. Friedrich Grimminger

Tag der Disputation: 13. Dezember 2001

Meinen lieben Eltern und meiner Frau gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN

1. EINLEITUNG

- Das Endothel als Permeabilitätsbarriere
- Verlust der Schrankenfunktion des Endothels unter pathophysiologischen Bedingungen
- Struktur und Vorkommen der Plasmatransglutaminase (Faktor XIII)
- Experimentelle und klinische Bedeutung
- Ziel der Arbeit

2. MATERIAL UND METHODEN

- Isolation und Kultivierung von Endothelzellen
- Makromolekülpermeabilität endothelialer Zellschichten
- Versuchsbedingungen
- Aktivierung des Faktor XIII
- Inaktivierung des Faktor XIII
- Immunfluoreszenzmikroskopie
- Elektronenmikroskopie
- Statistische Analyse
- Materialien

3. ERGEBNISSE

- Wirkung des Faktor XIII auf die endotheliale Permeabilität
- Wirkung der Faktor XIII B-Untereinheit auf die Albuminpermeabilität
- Immunfluoreszenznachweis auf Endothelzellschichten
- Elektronenmikroskopische Lokalisation des Faktor XIII auf Endothelzellen
- Wirkung des Faktor XIII A auf die Hyperpermeabilität ausgelöst durch metabolische Hemmung

4. DISKUSSION

-Zielsetzung und Hauptbefunde

-Schlußfolgerung

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abkürzungen

Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
E	Einheit
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
2-DG	2-Desoxy-D-Glukose
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
G/V	Gewicht / Volumen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure
I. E.	internationale Einheiten
KCN	Kaliumzyanid
M	mol / Liter
MG	Molekulargewicht
MI	Metabolische Inhibition
NKS	Serum vom neugeborenen Kalb
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
S.D.	Standardabweichung
V/V	Volumen / Volumen

1. Einleitung

Das Endothel als Permeabilitätsbarriere

Der italienische Anatom Malpighi entdeckte 1661 die Blutkapillaren und bestätigte damit, daß das Blut in einem großen Kreislauf den Körper durchströmt. Die Bedeutung der Endothelzellen für den Aufbau der Kapillarwand wurde erst durch die Einführung des Elektronenmikroskopes in den fünfziger Jahren, sowie durch die Möglichkeit der Kultivierung der Endothelzellen in den siebziger Jahren (Jaffe et al., 1973) in vollem Umfang erfaßt. Mit einer geschätzten Oberfläche von 7000 m² (etwa 6×10^{13} Zellen) und einer Masse von ca. 1 kg (Wolinsky, 1980; Simionescu, 1991) könnte man die Endothelzellen des Organismus, trotz erheblicher regionaler Unterschiede, in funktioneller Hinsicht als Organ bezeichnen. Das Endothel stellt eine Barriere für Wasser, Lösungen und Makromoleküle zwischen dem Gefäßlumen und dem Interstitium dar. Diese Barrierefunktion ist eine der wichtigsten Aufgaben der Endothelzellen. Die Kontrolle des Austausches von Flüssigkeit und gelösten Stoffen ist ein selektiver und teilweise auch aktiver Prozeß, der weder in seinen qualitativen und quantitativen Eigenschaften noch in seiner regionalen Heterogenität befriedigend aufgeklärt ist.

Während Wasser und kleine, sowohl wasser- als auch lipidlösliche Moleküle (wie z.B. Anästhesiegase, Harnstoff) die endotheliale Barriere ohne spezifische Transportmechanismen auf *direktem transzellulären Weg* passieren, werden für Makromoleküle zwei prinzipielle Transportwege diskutiert :

1. *Parazelluläre Passage von Makromolekülen über interendotheliale Spalträume* (Majno, 1963; Carter et al., 1974). Dieser Passageweg wird durch die „Zwei-Poren“-Theorie (Pappenheimer et al., 1951; Renkin, 1977, 1985) beschrieben. Man geht

davon aus, daß durch Poren (die Durchmesser schwanken für kleine Poren zwischen 5 und 7 nm, für große Poren zwischen 30 und 100 nm) im Bereich der Interzellulärspalten kontinuierlich extrazelluläre Flüssigkeit und gelöste Stoffe in Abhängigkeit von ihrem Molekülradius durch das Endothel hindurchtreten.

2. *Vesikulärer Transport* (Karnovsky, 1967; Shea et al., 1969): Elektronenmikroskopisch beobachtete Oberflächenkaveolen und zytoplasmatische Vesikel, die insbesondere Makromoleküle wie ein Shuttle durch die Endothelzellen transportieren, legen einen vesikulären Transport nahe.

Im Zentrum dieser Arbeit steht die *parazelluläre Passage von Makromolekülen über interendotheliale Spalträume*, die insbesondere unter pathophysiologischen Bedingungen relevant ist.

Verlust der Schrankenfunktion des Endothels unter pathophysiologischen Bedingungen

Unter pathophysiologischen Bedingungen beruht der Verlust der endothelialen Schrankenfunktion überwiegend auf einer Zunahme der parazellulären Permeabilität, die zu einem vermehrten Austreten von Makromolekülen und Flüssigkeit führt. Das resultierende extrazelluläre Ödem kann die Funktion des betroffenen Organs gefährden. Der durch das Ödem sekundär hervorgerufene Gewebsschaden mit Verschlechterung der Nährstoffzufuhr und Verminderung der Hämoperfusion kann den primären, zum Ödem führenden Gewebsschaden sogar übertreffen.

Zahlreiche endogene und exogene Faktoren können eine Steigerung der parazellulären Permeabilität auslösen. 1961 beobachteten Majno und Palade die Bildung großer interendothelialer Spalten (bis zu 1 µm Durchmesser) als Reaktion der Endothelzellen auf eine Histaminausschüttung im Rahmen einer Entzündungsreaktion. Später ist gezeigt worden, daß viele inflammatorische

Mediatoren wie z.B. Thrombin (Laposata et al., 1983; Malik et al., 1988), Bradykinin und Histamin (Svensjö et al., 1979) über einen ähnlichen Mechanismus ein Schrankenversagen auslösen. Weitere exogene Faktoren stellen reaktive Sauerstoffmoleküle dar, die z.B. von aktivierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (Hinshaw et al., 1989, Arndt et al., 1991; Siflinger-Birnboim et al., 1992) ausgeschüttet werden. Einen endogenen Faktor stellt der Energieverlust der Endothelzellen dar, der im Rahmen einer Ischämie ein Schrankenversagen auslösen kann (Noll et al., 1995).

Kommt es zu einer Erhöhung der endothelialen Permeabilität für Makromoleküle, sind antiödematöse therapeutische Ansätze wirkungslos, die sich nur einer Erhöhung des onkotischen Drucks im Plasma bedienen, um so eine erhöhte Wasserpermeabilität zu bekämpfen. Versuche, eine pathologische Erhöhung der endothelialen Makromolekülpermeabilität zu verhindern, setzen in der Regel an der pathologisch veränderten Signaltransduktion der Endothelzellen (z.B. der zytosolischen Kalziumkontrolle) oder an den auslösenden Faktoren (z.B. Granulozyten und den von ihnen freigesetzten Mediatoren) an. Wir haben eine Möglichkeit gesucht, die endotheliale Schranke auch dann zu stabilisieren, wenn sich der Einfluß solcher äußerer Faktoren auf die endotheliale Signaltransduktion (z.B. Kalziumanstieg) nicht vermeiden läßt. Dabei stießen wir auf die Plasmatransglutaminase (Faktor XIII), die allgemein durch ihre Rolle bei der Gerinnung und Fibrolyse bekannt ist.

Struktur und Vorkommen der Plasmatransglutaminase (Faktor XIII)

Faktor XIII ist eine Transglutaminase (endo- γ -glutamin: ϵ -lysin Transferase), welche die Bildung von γ -Glutamyl- ϵ -Lysyl-Bindungen zwischen benachbarten Proteinen katalysiert. Er spielt eine wichtige Rolle im Verlauf des Gerinnungsprozesses und der

Fibrinolyse (Greenberg et al., 1991, Muszbek et al., 1996). Das Plasmaproenzym ist ein Heterotetramer, bestehend aus zwei Typen von Untereinheiten (A und B, mit Molekulargewichten von 83 und 77 kDA), welche nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Der plasmatische Faktor XIII wird durch Thrombin in Gegenwart von Kalzium aktiviert. Thrombin spaltet dabei ein Peptid vom NH₂-terminalen Ende der A-Untereinheit ab, die aus dieser Reaktion als aktive Transglutaminase hervorgeht. Die Funktion der B-Untereinheit ist zur Zeit noch nicht vollständig verstanden. Sie scheint vor einer spontanen nichtproteolytischen Aktivierung des Faktor XIII (Polgar et al., 1990) oder einer raschen Deaktivierung der aktiven A-Untereinheit (Mary et al., 1988) zu schützen. Die seit langem bekannte Hauptfunktion von Faktor XIII besteht in der Vernetzung von Fibrinmonomeren zu einem stabilen Thrombus. Faktor XIII scheint auch an der Zelladhäsion und Migration beteiligt zu sein (Knox et al., 1986, Paye & Lapiere, 1986, Ueki et al., 1996), sowie am Aufbau der extrazellulären Matrix (Barry & Mosher, 1988, 1989), der Gewebereparatur und der Wundheilung (Lorand et al., 1980, Board et al., 1993). Die letztgenannten Wirkungen werden auf die Eigenschaft des Faktor XIII zurückgeführt, verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix zu vernetzen, wie z.B. Fibronectin, Kollagen und Vitronectin (Keski-Oja et al., 1976, Mosher & Schad, 1979, Sane et al., 1988).

Experimentelle und klinische Bedeutung

Klinische Beobachtungen der letzten zwei Jahrzehnte haben gezeigt, daß der systemisch angewandte Faktor XIII die Kapillarhyperpermeabilität reduzieren kann und somit eine antiödematöse Wirkung besitzt (Karges & Clemens, 1988, Egbring et al., 1996). Es wurde beobachtet, daß eine gesteigerte kapilläre Permeabilität bei Patienten mit Kollagenosen, im Verlauf einer Therapie mit Faktor XIII, auf fast normale Werte gesenkt werden konnte (Egbring et al., 1996, Kamitsuji et al., 1987).

Es wurde außerdem festgestellt, daß eine Faktor XIII-Therapie das Mukosaödem bei entzündlichen Darmerkrankungen (Lorenz et al., 1995, 1996) und Purpura Schönlein-Henoch (Kamitsuji et al., 1987, Utani et al., 1991, Fukui et al., 1989) verringert. In einer tierexperimentellen Studie zeigten Hirahara et al. (1993), daß Faktor XIII die inflammatorisch gesteigerte vaskuläre Permeabilität der Meerschweinchenhaut unterdrücken kann. Der zugrunde liegende Mechanismus dieser verschiedenartigen Faktor XIII-Wirkungen ist bisher unbekannt.

In der jetzigen Studie wurde die Frage untersucht, ob Faktor XIII die endotheliale Schrankenfunktion direkt beeinflussen kann. Dazu wurde ein etabliertes Modell kultivierter Endothelzellen eingesetzt. In Zellschichten aus kultivierten Endothelzellen der Schweineaorta wurde die parazelluläre Passage von Albumin als ein Parameter für die endotheliale Schrankenfunktion bestimmt. Änderung der Makromolekülpermeabilität in diesem Modell sind auf Änderungen der parazellulären Permeabilität zurückzuführen (Albelda et al., 1988).

Ziele der Arbeit

Im Einzelnen wurde untersucht :

1. ob der Faktor XIII eine Wirkung auf die endotheliale Schranke ausübt. Dazu wurde geprüft, ob der Thrombin-aktivierte Faktor XIII die Albuminpermeabilität kultivierter Endothelzellschichten reduzieren kann, und ob auch der nichtaktivierte Faktor XIII eine vergleichbare Wirkung auf die Schrankenfunktion ausübt.
2. welche Rolle dabei die Faktor XIII A-Untereinheit als aktive Transglutaminase spielt. Dazu wurde eine rekombinante humane Faktor XIII A-Untereinheit eingesetzt und mit der Wirkung der isolierten Faktor XIII B-Untereinheit auf die Schrankenfunktion verglichen.

3. wo der Faktor XIII auf der Endothelzellschicht lokalisiert ist. Diese Analyse zielte auf die Identifikation des Wirkungsortes des Faktor XIII in den Endothelzellschichten ab.
4. ob Faktor XIII einen Einfluß auf eine induzierte Permeabilitätssteigerung ausübt.

2. Material und Methoden

Isolation und Kultivierung von Endothelzellen

Zellkulturen wurden aus Endothelzellen von Schweineaorten angelegt. Die Schweineaorten wurden frisch geschlachteten Tieren entnommen und anschließend für die Zellpräparation vorbereitet. Wie von Spahr & Piper (1990) beschrieben, wurden die Endothelzellen durch vorsichtiges Kratzen von der Media abgelöst und in Kulturmedium überführt. Das Kulturmedium bestand aus Medium 199 mit Earle's Salz und enthielt zusätzlich 100 I.E./ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin, und 20% (V/V) Serum vom neugeborenen Kalb (NKS). Aus dieser Suspension wurde die Endothelzellfraktion isoliert und mit einer Zelldichte von 10^6 Zellen pro 100-mm² Petri-Schale kultiviert. Die Zellen wurden bei 37° C, 95% (V/V) Luftfeuchtigkeit und 5% (V/V) CO₂ gezüchtet. Das Medium wurde jeden zweiten Tag erneuert. Nach 4 Tagen wurden die Zellen mit einer Phosphat (PBS)-gepufferten Lösung [PBS, bestehend aus (mM): 137 NaCl, 2,7 KCl 1,5 KH₂PO₄, und 8,0 Na₂HPO₄, bei pH 7,4, die zusätzlich 0,05% (G/V) Trypsin und 0,02% (G/V) EDTA enthielt] trypsinisiert. Endothelzellen wurden bei einer Dichte von 7×10^4 Zellen/cm² zur Bestimmung der Albuminpermeabilität auf 24-mm runden Polycarbonatfiltern (Porengröße 0,4 µm) und zur immunhistochemischen Untersuchung auf 20-mm Deckgläsern subkultiviert. Experimente wurden 4 Tage nach Kultivierung mit konfluenten Endothelkulturen durchgeführt. Es wurden dabei nur Endothelzellkulturen mit einer Reinheit von 99% verwendet.

Makromolekülpermeabilität endothelialer Zellschichten

Die Permeabilität der Endothelzellen wurde in einem Zweikammersystem, getrennt durch eine Filtermembran (Muhs et al., 1997), untersucht. Beide Kompartimente

beinhalteten als Basismedium modifizierte Tyrodelösung (Zusammensetzung in mM: 150 NaCl, 2,7 KCl, 1,2 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 1,0 CaCl₂, und 30,0 N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure; pH 7,4, 37° C) ergänzt mit 2% (V/V) NKS. Es bestand keine hydrostatische Druckdifferenz zwischen beiden Kompartimenten.

Das „luminale“ Kompartiment, welches die Endothelzellschichten enthielt, hatte ein Volumen von 2,5 ml und das „abluminale“ Kompartiment hatte ein Volumen von 6,5 ml. Das Medium im abluminalen Kompartiment wurde kontinuierlich gerührt. Das luminale Kompartiment enthielt zusätzlich Trypanblau-markiertes Albumin (60 µM). Das Erscheinen des markierten Albumins im abluminalen Kompartiment wurde fortlaufend bestimmt, indem das Medium durch ein Spektrophotometer gepumpt wurde (Specord 10, Zeiss Jena, Deutschland). Eine Zunahme der Konzentration des Trypanblau-markierten Albumins wurde mit einer Zeitverzögerung von weniger als 15 Sekunden bestimmt. Die Konzentration des Trypanblau-markierten Albumins im luminalen Kompartiment wurde alle 10 Minuten bestimmt. Es änderte sich nicht signifikant im Verlauf eines Experimentes.

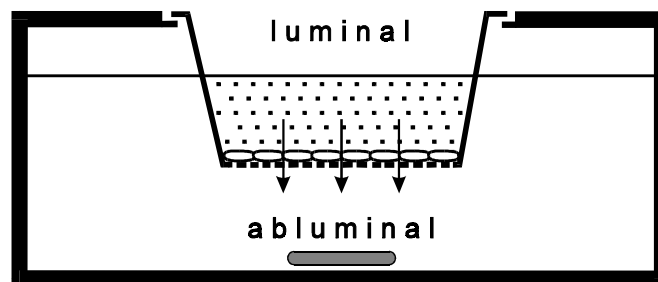
Der Albuminfluß (**F**, angegeben in mol/(sec x cm²)) durch die Endothelzellschicht mit der Fläche (**S**) wurde bestimmt durch den Anstieg der Albuminkonzentration (**d[A]₂**) während des Zeitintervalls (**dt**) im abluminalen Kompartiment mit dem Volumen (**V**).

$$F = \frac{d[A]_2/dt \times V}{S} \quad (I)$$

Der Permeabilitätskoeffizient (**P**, angegeben als cm/sec) der Kombination aus Zellmonolayer und Filtermembran wurde wie folgt berechnet:

$$P = \frac{F}{([A]_1 - [A]_2)} \quad (II)$$

wobei $[A]_1$ und $[A]_2$ die Albuminkonzentrationen im luminalen und abluminalen Kompartiment angeben. Da die treibende Kraft $([A]_1 - [A]_2)$ im Laufe des Experimentes praktisch konstant blieb, entsprechen die relativen Veränderungen von (**F**) denen der Permeabilitätskoeffizienten (**P**).



Inkubationskammer

Versuchsbedingungen

Zur Bestimmung der Makromolekülpermeabilität wurden die Endothelzellschichten in die Inkubationskammer überführt. Als Inkubationsmedium diente eine modifizierte Tyrodelösung (Basalmedium, Zusammensetzung siehe oben). Nach einer Equilibrierungsperiode von 20 Minuten wurde die Basalpermeabilität der Endothelzellschichten über einen Zeitraum von 20 Minuten bestimmt. Substanzen wurden wie angegeben zugegeben, und die Reaktion im Hinblick auf die

Albuminpermeabilität für weitere 80 Minuten aufgezeichnet. In einer Reihe von Experimenten wurden die Endothelzellen zunächst in Basalmedium für 2, 4 und 6 Stunden mit der Thrombin-aktivierten Faktor XIII A-Untereinheit (1 E/ml), bei 37 ° C in einem Zellkulturinkubator vorinkubiert. Anschließend wurden die Endothelzellen in die Inkubationskammer überführt und die Albuminpermeabilität dieser vorbehandelten Endothelzellschichten bestimmt.

Aktivierung von Faktor XIII

Zur Aktivierung des plasmatischen Faktor XIII und Faktors XIII A wurden bekannte Faktor XIII-Mengen in Gegenwart von Sepharose-gekoppeltem Thrombin für 20 Minuten bei 37 ° C in Tris-buffer (200 mM; pH 7,4) inkubiert. Anschließend wurde der aktivierte Faktor XIII von Thrombin-Sepharose durch Zentrifugierung getrennt. Die Thrombinkontamination des Überstandes lag unter der Nachweisgrenze. Die Faktor XIII-Aktivität wurde nach Fickenscher et al. (1991), ohne Thrombin im Bestimmungsansatz gemessen.

Inaktivierung von Faktor XIII A

Faktor XIII A wurde unter Anwendung des alkylierenden Reagenz Iodacetamid, wie von Curtis et al. (1974) beschrieben, inaktiviert. Um Faktor XIII zu inaktivieren, wurden 12 µM Thrombin-aktivierter Faktor XIII A, (entsprechend 1 mg Protein/ml) in Gegenwart von 24 µM Iodacetamid bei 37 ° C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde 48 µM Glutathion zugegeben, um mit dem verbliebenen Iodacetamid zu reagieren, und die Inkubation wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur fortgesetzt. Nach diesem Verfahren lag die Aktivität von Faktor XIII A unterhalb der Nachweisgrenze. Aliquoten des inaktivierten Faktor XIII A (etwa 10 µg Protein entsprechend 1 E Faktor XIII A) wurden zu den Endothelzellen hinzugegeben. Die

Iodacetamid- und Glutathionkonzentration in der Inkubation betragen 0,24 μM und 0,48 μM . In dieser Konzentration beeinflussten beide Substanzen nicht die Basispermeabilität der endothelialen Zellschichten.

Immunfluoreszenzmikroskopie

Endothelzellen wurden unter den oben aufgeführten Bedingungen inkubiert. Konfluente endotheliale Zellschichten auf Deckgläschen wurden dreimal mit PBS gewaschen, anschließend für 10 Minuten bei 20 ° C mit 5% Paraformaldehyd fixiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit je 100 μl eines polyklonalen Anti-Faktor XIII A-Antikörpers (aus Kaninchen) oder Anti-Faktor XIII B-Antikörpers (verdünnt 1:200 in PBS) überschichtet und für 6 h bei 37 ° C inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen erneut dreimal mit PBS gewaschen und mit 100 μl FITC-gekoppeltem (Fluoreszeinisothiozyanat) IgG-Antikörper (monoklonaler Anti-Kaninchen AK aus Maus) (verdünnt 1:100 in PBS) für 6 h bei 37 ° C inkubiert. Die Deckgläschen wurden schließlich in einer 40% Glycerol/PBS Lösung (pH 8,5) auf Glasobjektträgern eingebettet. Die Endothelzellschichten wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX 70, Hamburg, Deutschland) analysiert.

Elektronenmikroskopie

Nach den Permeabilitätsexperimenten wurden konfluente Endothelzellschichten auf Filtermembranen dreimal mit PBS gewaschen und für 10 Minuten bei 20 ° C mit 5% Paraformaldehyd fixiert (alle weiteren Schritte wurden im Institut für Anatomie und Zellbiologie durchgeführt, Leiter Prof. Dr. Kummer). Die Zellen wurden mit 100 μl anti-FXIII-A-Antikörper oder anti-XIII-B-Antikörper (verdünnt 1:200 in PBS) bedeckt und über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann wurden die Filter dreimal mit PBS gewaschen, mit 100 μl anti-Kaninchen IgG gekoppelt mit Peroxidase (verdünnt

1:150 in PBS) überschichtet und für 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Filter wurden zweimal mit PBS und zweimal mit Tris-HCl (10 mM; pH 7,4) gewaschen und wurden mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und Hydrogenperoxid als Substrate für die Peroxidasereaktion in Gegenwart von Nickelammoniumsulfid für 45 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Filter erneut dreimal mit Tris-HCl gewaschen und mit einer 1% Lösung aus OsO₄ bei 4 °C für 1 h inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Tris-HCl und Maleatpuffer (pH 5,2), wurden die Präparate in einer 1% Uranylacetat-Lösung in Maleatpuffer im Dunkeln bei Zimmertemperatur für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Präparate erneut dreimal mit Maleatpuffer gewaschen, in 70% Ethanol dehydriert und in 2,2'-Dimethoxypropan übertragen. Danach wurden sie in Kunststoff eingebettet. Die Polymerisation der eingebetteten Präparate erfolgte über Nacht bei 60-70 °C. Ultradünnschnitte wurden mit Bleizitrat gefärbt und im Zeiss EM 902 Transmissionselektronenmikroskop analysiert.

Statistische Analyse

Angegeben sind der Mittelwert \pm S.D. von bis zu n = 6 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. Die statistische Analyse der Daten wurde mit dem ungepaarten Student' *t*-Test durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit (P) < 0,05 wurde als signifikant betrachtet.

Materialien

Anti-Kaninchen IgG gekoppelt mit Peroxidase war von Amersham Buchler (Braunschweig, Deutschland); Falcon Plastik-Kulturschalen waren von Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland); polyklonale Anti-FXIII A-Antikörper und polyklonale Anti-FXIII B-Antikörper waren von DADE Behring Diagnostik, Marburg, Deutschland; Glutathione war von Boehringer, Mannheim, Deutschland;

plasmatischer Faktor XIII und isolierte Faktor XIII B-Untereinheit gereinigt aus Fibrogammin HSTM, Faktor XIII A-Untereinheit (rekombinanter humaner Faktor XIII hergestellt in Pilzkulturen und zur Homogenität gereinigt (Verunreinigungen < 100 ppm), und humanes Thrombin waren von Aventis Behring, Marburg, Deutschland; Transwell^R Polycarbonatfiltereinsätze (24 mm Durchmesser, 0,4 µm Porengröße) waren von Costar (Bodenheim, Deutschland), Medium 199, Penicillin-Streptomycin und Trypsin-EDTA waren von GIBCO Life Technologies (Eggenstein, Deutschland); 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, ISOPACTM), Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) konjugierte Anti-Kaninchen IgG-Antikörper, und Iodacetamid waren von Sigma (Deisenhofen, Deutschland). Alle anderen Chemikalien waren von höchster Reinheit.

3. Ergebnisse

Wirkung von Faktor XIII auf die endotheliale Permeabilität

Es wurde zunächst überprüft, ob sich die Faktor XIII-Aktivität im Verlauf eines Permeabilitätsexperimentes verändert. Dazu wurden folgende Substanzen luminal zugegeben: Thrombin-aktivierter oder nichtaktivierter plasmatischer Faktor XIII, Thrombin-aktivierte oder nichtaktivierte Faktor XIII A-Untereinheit. Wie in Abbildung 1 gezeigt, blieben die Aktivitäten während des gesamten Experimentes in engen Grenzen konstant.

Unter Kontrollbedingungen betrug die mittlere Albuminpermeabilität $5,9 \pm 0,6 \times 10^{-6}$ cm/s (Abbildung 2). Die Permeabilität blieb während der gesamten Beobachtungsperiode konstant. Die Zugabe des Thrombin-aktivierten plasmatischen Faktor XIII (20 µg Protein/ml entsprechen 1 E/ml) verursachte eine rasche Abnahme der Permeabilität, welche sich nach 20 Minuten um 30% verringert hatte. Im Gegensatz zum aktivierten plasmatischen Faktor XIII hatte der nichtaktivierte plasmatische Faktors XIII keine Wirkung auf Permeabilität.

Die Zugabe der Thrombin-aktivierten Faktor XIII A-Untereinheit (10 µg Protein/ml, entsprechen etwa 1 E/ml), führte ebenso zu einer raschen und anhaltenden Abnahme der Permeabilität um 34% (Abbildung 3). Der nichtaktivierte ebenso wie der inaktivierte Faktor XIII A (10 µg Protein/ml) hatte keine Wirkung auf die Permeabilität. Ebenso hatte die isolierte Faktor XIII B-Untereinheit (10 µg Protein/ml) keine Wirkung auf die Albuminpermeabilität der Endothelzellschichten (Abbildung 4).

In einer Reihe von Experimenten wurde getestet, ob der aktivierte Faktor XIII A die Albuminpermeabilität der endothelialen Zellschichten für einen längeren Zeitraum beeinflussen kann. Aus diesem Grund wurden die Endothelzellen für 2, 4 und 6 Stunden mit dem Thrombin-aktivierten Faktor XIII A vorinkubiert. Anschließend

wurde die Albuminpermeabilität bestimmt. Wie in Tabelle 1 gezeigt, hält die Faktor XIII A-induzierte Reduktion der Albuminpermeabilität für 6 Stunden an.

Der aktivierte Faktor XIII A senkte die Albuminpermeabilität mit steigender Aktivität (Abbildung 5), mit halbmaximaler Wirkung bei 0,9 E/ml. Im Gegensatz dazu hatte der nichtaktivierte Faktor XIII A ebenso wie Faktor XIII B im gleichen Konzentrationsbereich keine signifikante Wirkung auf die Albuminpermeabilität.

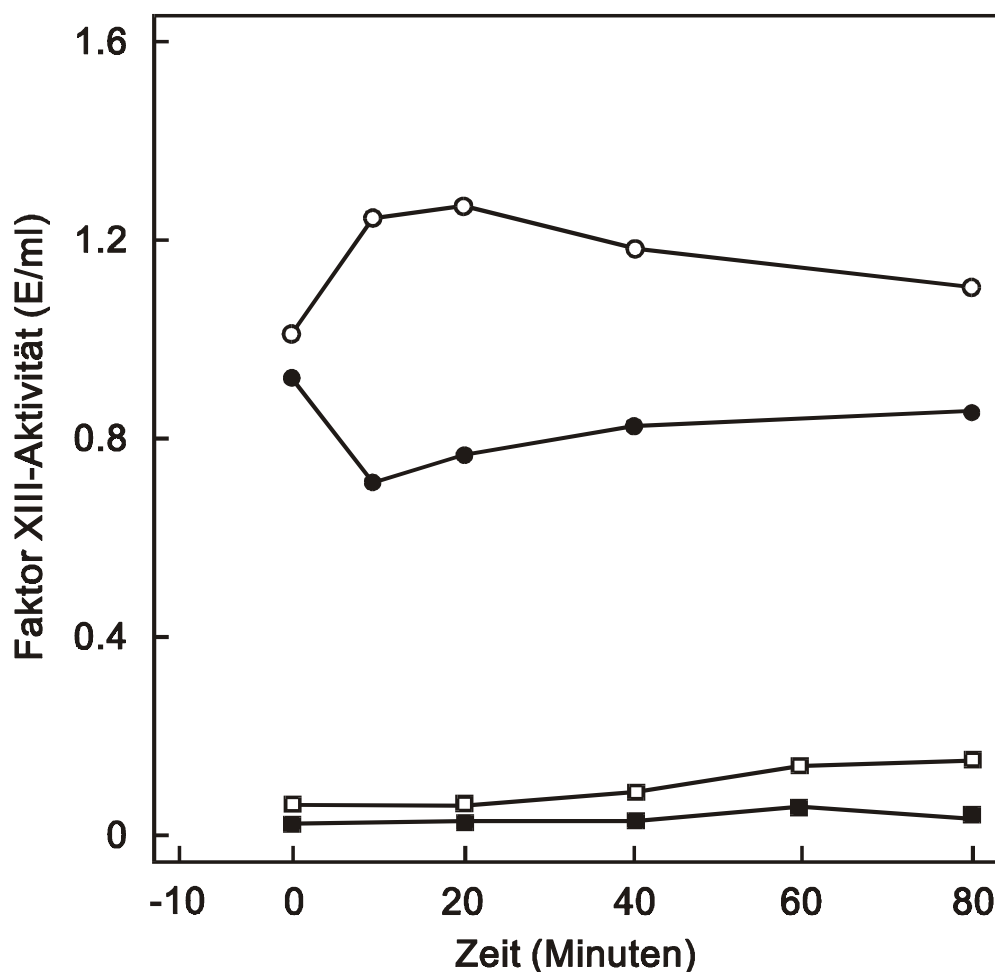


Abbildung 1 : Faktor XIII-Aktivität im luminalen Kompartiment der Permeabilitätskammer. (●) Thrombinaktivierter plasmatischer Faktor XIII (0,8 E/ml); (○) Thrombin-aktivierte Faktor XIII A-Untereinheit (1,2 E/ml); (■) nichtaktivierter plasmatischer Faktor XIII (10 µg/ml) oder (□) nichtaktivierte Faktor XIII A-Untereinheit (10 µg/ml) wurden zum Zeitpunkt Null in das luminal Kompartiment hinzugeben, welches die Endothelzellschicht enthält.

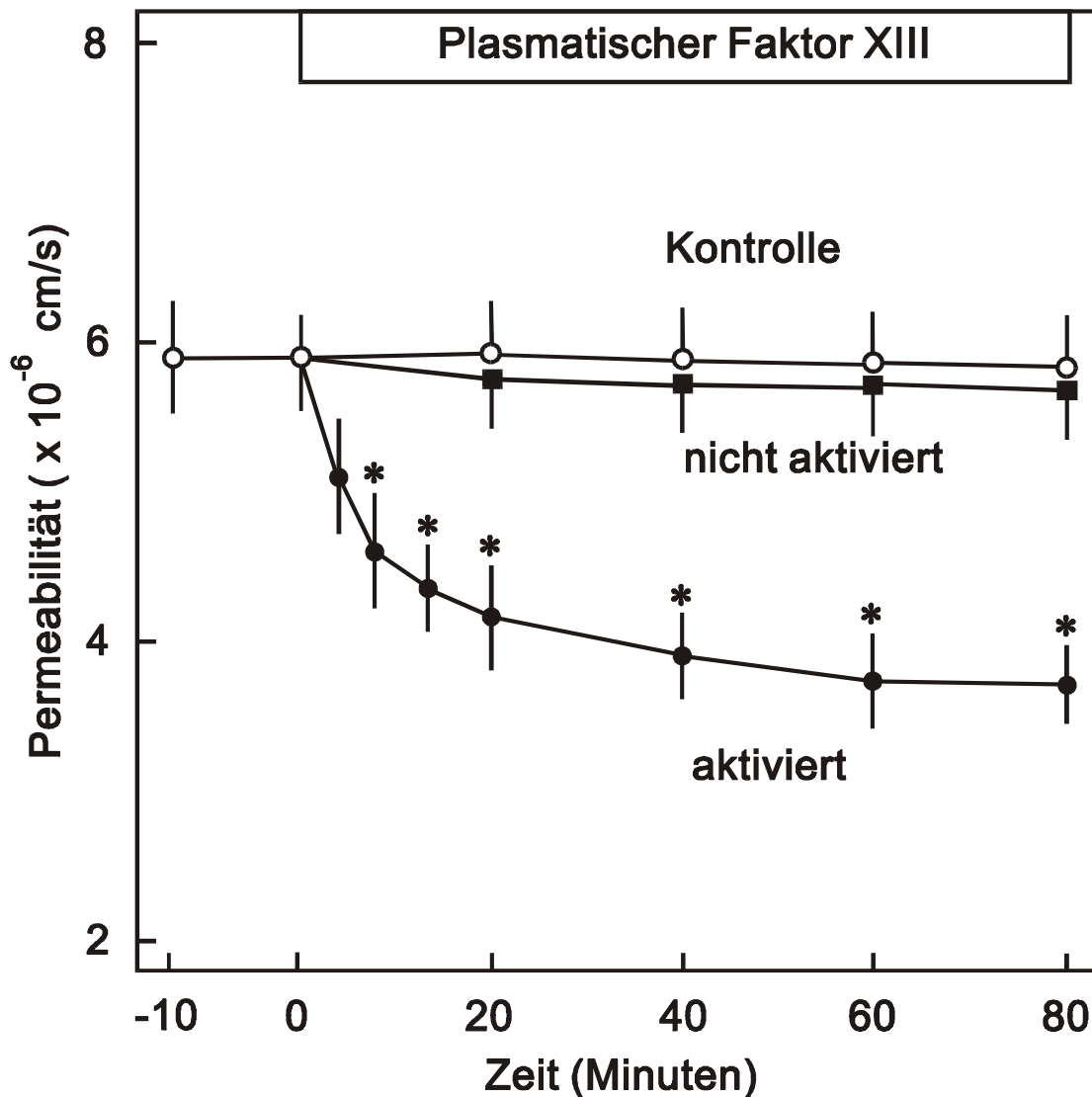


Abbildung 2 : Wirkung des plasmatischen Faktor XIII auf die Albuminpermeabilität aortaler Endothelzellen. Zum Zeitpunkt Null wurden folgende Substanzen zugegeben: (○) Kontrollexperiment in Abwesenheit des plasmatischen Faktor XIII ; (■) nichtaktivierter plasmatischer Faktor XIII (20 µg Protein/ml = 1 E/ml) ; (●) aktivierter plasmatischer Faktor XIII (1 E/ml). Mittelwerte ± S.D., n = 5 Experimente unabhängiger Zellpräparationen, *P < 0,05.

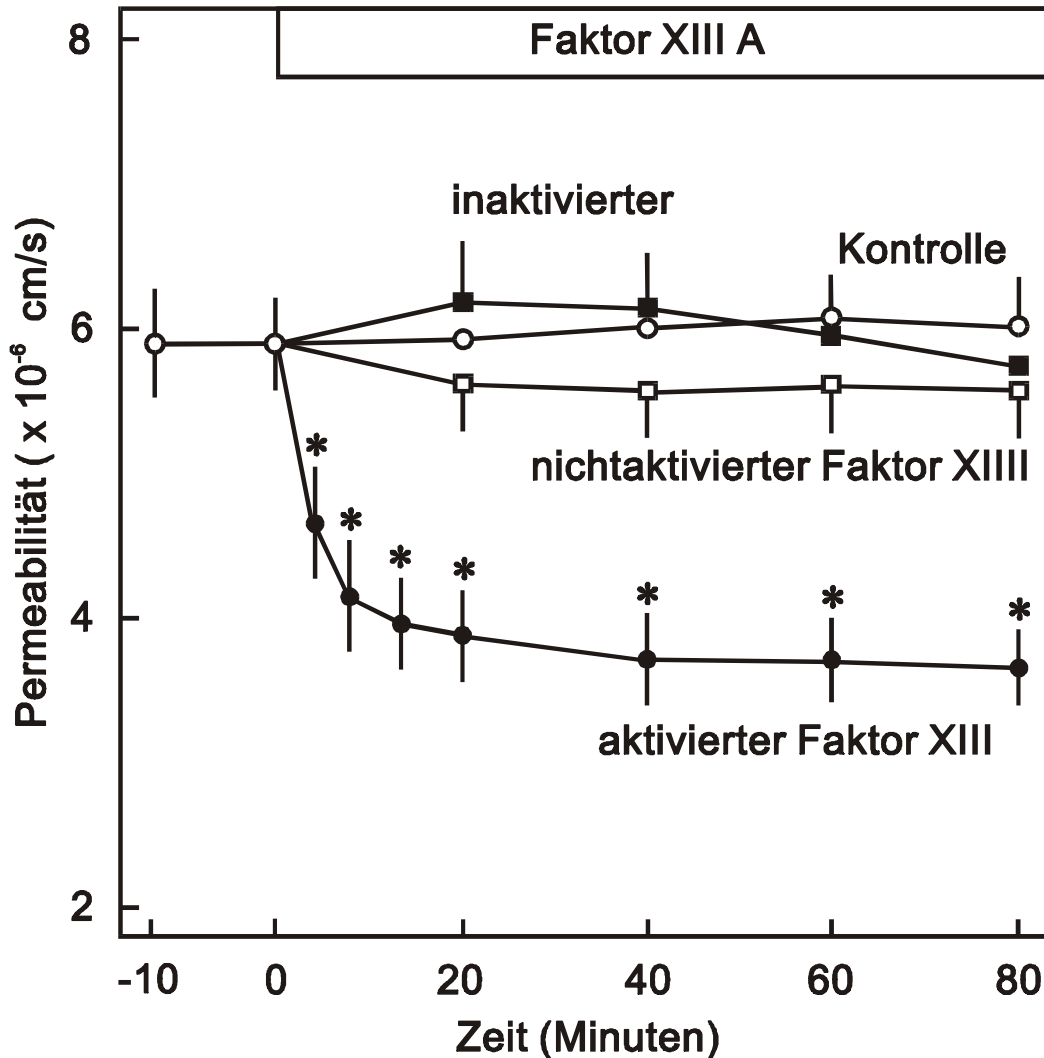


Abbildung 3 : Wirkung der Faktor XIII A-Untereinheit auf die Albuminpermeabilität aortaler Endothelzellen. Zum Zeitpunkt Null wurden folgende Substanzen zugegeben: (○) Kontrollexperiment in Abwesenheit der Faktor XIII A-Untereinheit ; (□) nichtaktivierte Faktor XIII A-Untereinheit (10 µg Protein/ml = 1 U/ml) ; (■) Iodazetamid-inaktivierter Faktor XIII A ; (●) Thrombin-aktivierte Faktor XIII A-Untereinheit (1 E/ml). Mittelwerte ± S.D., n = 5 Experimente unabhängiger Zellpräparationen, *P < 0,05.

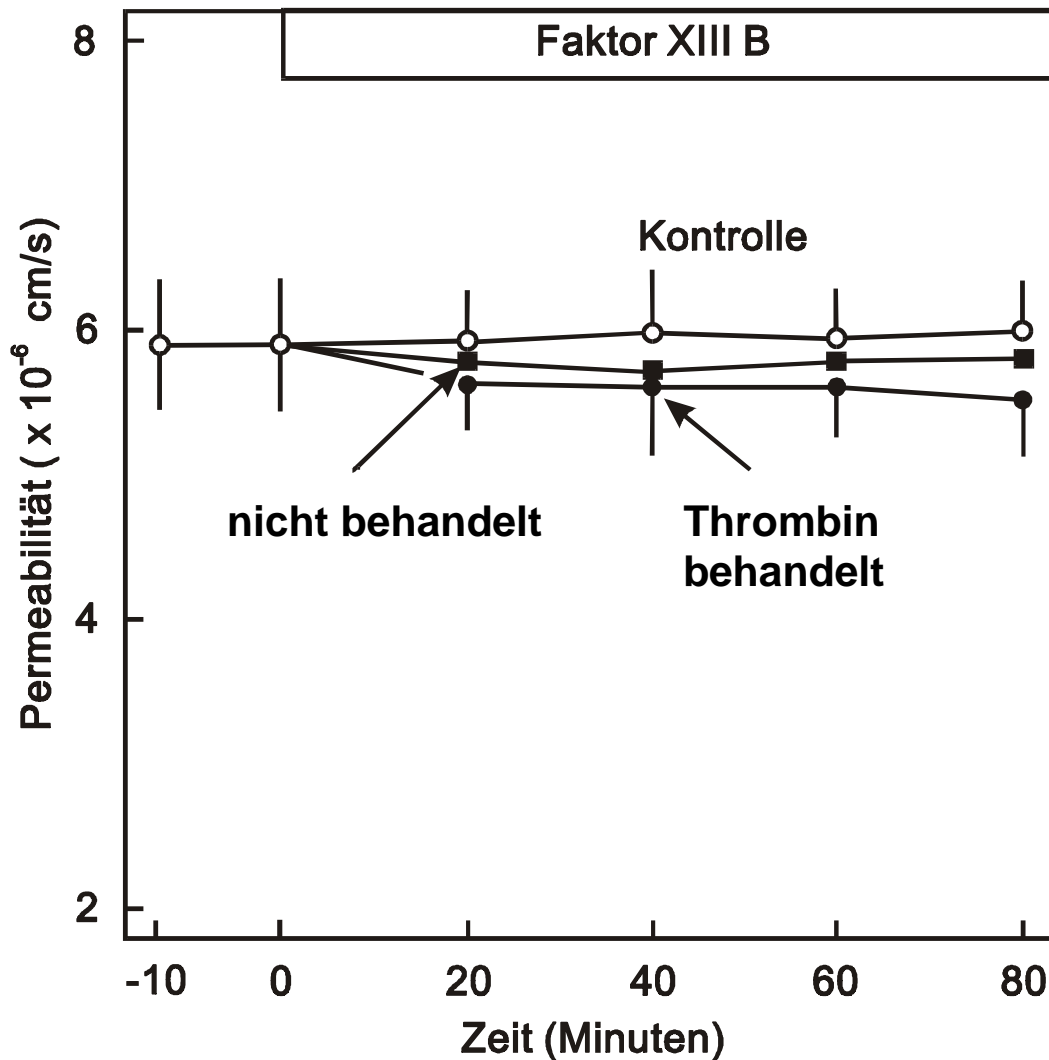


Abbildung 4 : Wirkung der Faktor XIII B-Untereinheit auf die Albuminpermeabilität aortaler Endothelzellen. Zum Zeitpunkt Null wurden folgende Substanzen zugegeben: (○) Kontrollexperiment in Abwesenheit von Faktor XIII B-Untereinheit ; (■) nicht Thrombin behandelte Faktor XIII B-Untereinheit (10 µg Protein/ml = 1 E/ml) ; (●) Thrombin behandelte Faktor XIII B-Untereinheit (1 E/ml). Mittelwerte ± S.D., n =5 Experimente unabhängiger Zellpräparationen, * P < 0,05.

Tabelle 1 : Wirkung des aktivierten Faktor XIII A auf die Albuminpermeabilität der Endothelzellschichten nach verschiedenen Inkubationszeiten

Zeit	Permeabilität
(h)	($\times 10^{-6}$ cm/s)
0	$5,9 \pm 0,4$
2	$3,7 \pm 0,5$
4	$3,5 \pm 0,6$
6	$3,1 \pm 0,3$

Die Endothelzellschichten wurden in Gegenwart des aktivierten Faktor XIII A (1 E/ml) für 2, 4 und 6 Stunden vorinkubiert. Anschließend wurde die Albuminpermeabilität bestimmt. Die Faktor XIII A-induzierte Reduktion der Albuminpermeabilität hält für 6 Stunden an.

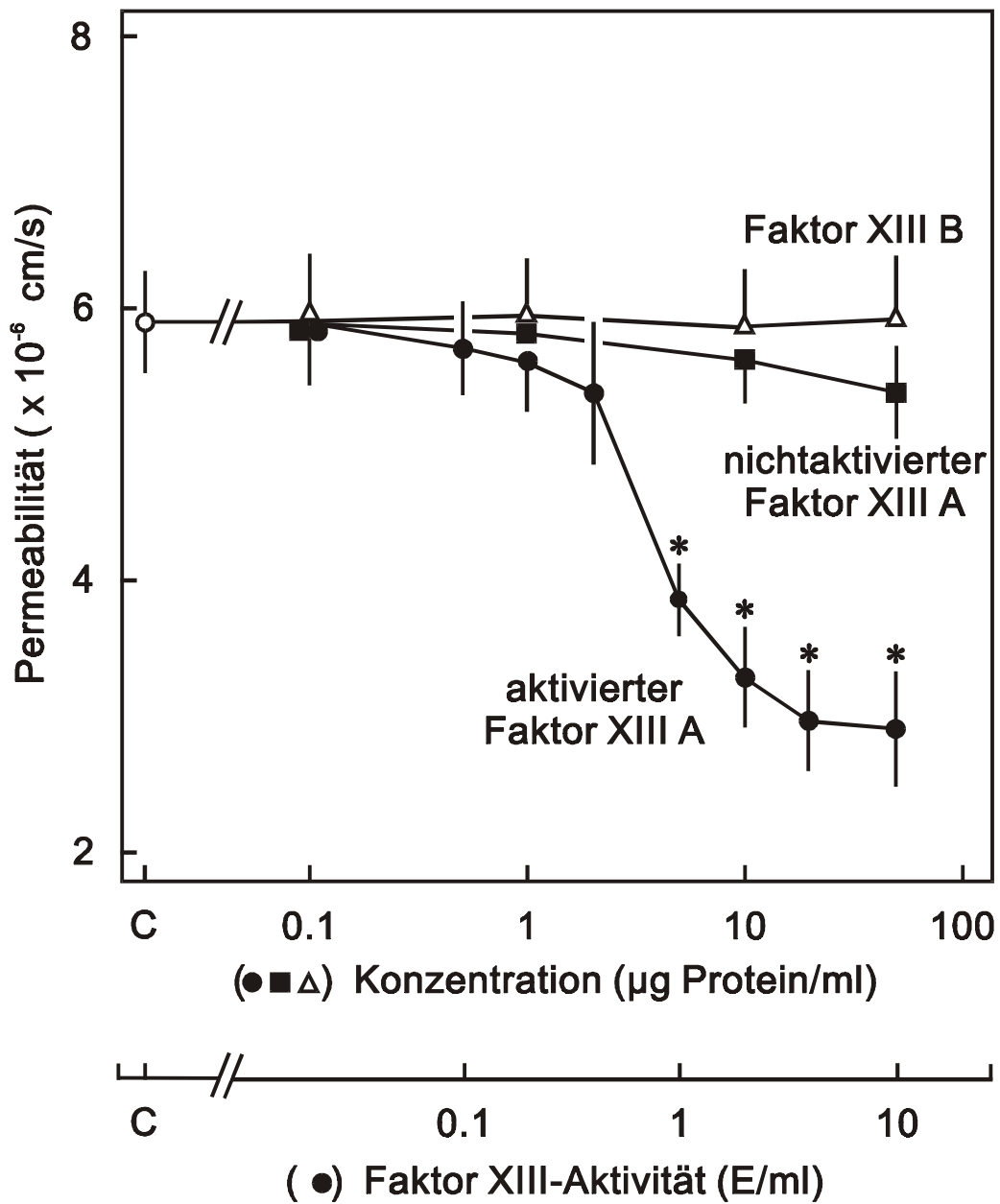


Abbildung 5 : Dosisabhängige Wirkung des Faktor XIII auf die Albuminpermeabilität.

Die Permeabilität wurde 20 min nach Inkubation bestimmt.

(○) Kontrolleexperiment in Abwesenheit der Faktor XIII A-Untereinheit ; (■) nicht-aktivierte Faktor XIII A-Untereinheit ; (●) Thrombin-aktivierte Faktor XIII A-Untereinheit (10 µg Protein/ml = 1 E/ml) ; (△) Faktor XIII B-Untereinheit.

Durchschnittswerte ± S.D., n = 5, Experimente unabhängiger Zellpräparationen.

*P < 0,05

Immunfluoreszenznachweis auf Endothelzellschichten

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde ein polyklonaler Anti-Faktor XIII A-Antikörper aus Kaninchen eingesetzt, welcher sowohl den aktivierten als auch den nichtaktivierten Faktor XIII A (Karges & Metzner. 1996) erkennt. Für diesen Nachweis wurden die Endothelzellen mit Thrombin-aktiviertem Faktor XIII A (1 E/ml) für 20 Minuten inkubiert. In derart behandelten Zellschichten ist eine Faktor XIII A-positive Färbung entlang der Zwischenräume benachbarter Endothelzellen zu erkennen (Abbildung 6A). In Zellschichten, welche mit dem nichtaktivierten Faktor XIII A bei gleichwertiger Proteinkonzentration (10 µg Protein/ml) inkubiert worden waren, blieb die Faktor XIII A-positive Färbung aus (Abbildung 6B). Zur Kontrolle wurden Endothelzellen, welche nicht Faktor XIII A ausgesetzt wurden, 1. mit dem Erstantikörper (Anti-FXIII A) und dem Zweitantikörper (FITC-gekoppelter Antikaninchen IgG) (Abbildung 6C) oder 2. nur mit dem Zweitantikörper (Abbildung 6D) inkubiert. In diesen Kontrollexperimenten wurde keine Faktor XIII-spezifische Färbung in den Endothelzellschichten beobachtet.

Im zweiten Teil des Experiments erfolgte der Immunfluoreszenznachweis der Faktor XIII B-Untereinheit. Die Endothelzellen wurden für 20 Minuten einerseits mit Thrombin-vorbehandelter Faktor XIII B-Untereinheit, andererseits mit nicht vorbehandelter Faktor XIII B-Untereinheit inkubiert. Für die Immunhistochemie wurde ein spezifischer polyklonaler Antikörper gegen Faktor XIII B (Karges & Metzner. 1996) eingesetzt. Es wurde keine signifikante Färbung von Faktor XIII B in den Zellschichten beobachtet (Abbildung 7).

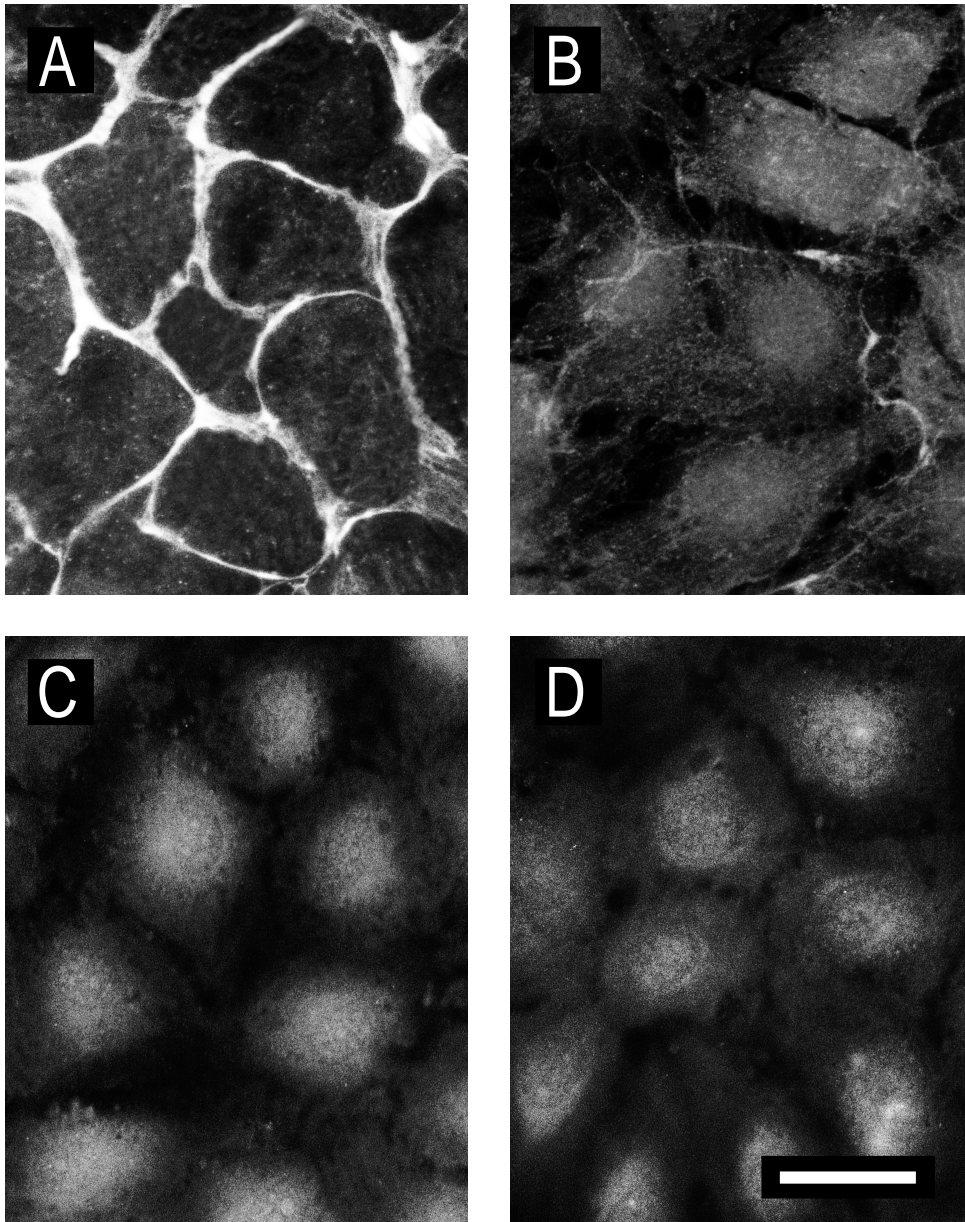


Abbildung 6 : Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Faktor XIII A-Untereinheit auf Endothelzellschichten. (**A**) Endothelzellen wurden für 20 Minuten in Gegenwart des aktivierten Faktor XIII A (1 E/ml) inkubiert. Faktor XIII A-positive Färbung ist entlang der Zwischenräume benachbarter Zellen zu erkennen. (**B**) Die Endothelzellen wurden mit nichtaktivierter Faktor XIII A-Untereinheit (10 µg/ml) vorbehandelt. Es ist keine positive Faktor XIII A-Färbung erkennbar. (**C**) Ohne Faktor XIII A-Vorbehandlung. Die Zellschichten wurden mit Anti-Faktor XIII A und FITC-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper inkubiert (1. und 2. Antikörperkontrolle). Nur die Hintergrundfluoreszenz ist erkennbar. (**D**) Ohne Faktor XIII A-Vorinkubation. Die Zellschichten wurden nur mit FITC-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper inkubiert (2. Antikörperkontrolle). Nur die Hintergrundfluoreszenz ist erkennbar. Maßstab : 20 µm

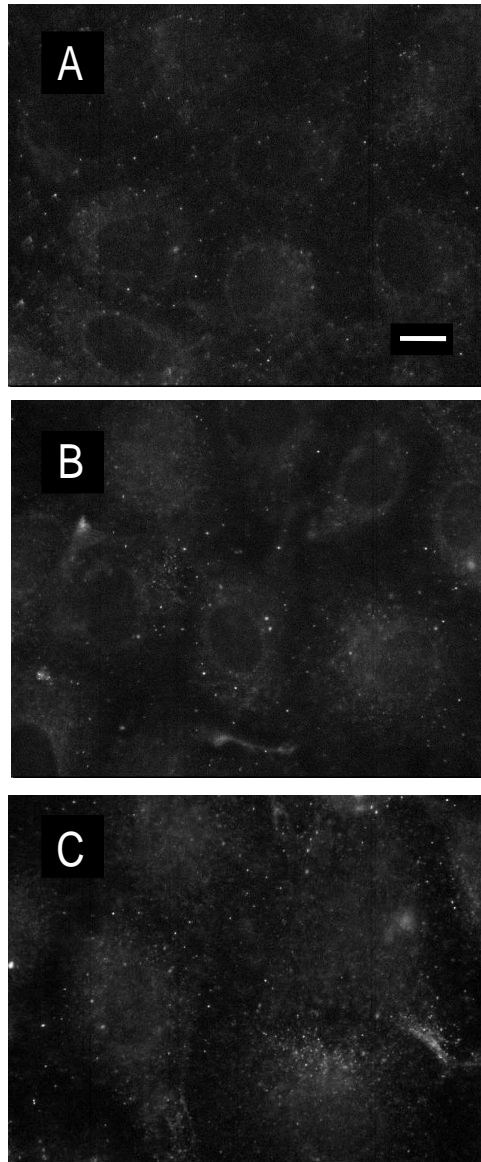


Abbildung 7 : Immunfluoreszenznachweis von Faktor XIII B-Untereinheit auf Endothelzellen. (**A**) Die Endothelzellen wurden für 20 Minuten mit Thrombinvorbehandelter Faktor XIII B-Untereinheit (10 µg/ml) inkubiert. (**B**) Die Endothelzellen wurden mit Faktor XIII B-Untereinheit, ohne Thrombinvorbehandlung, inkubiert. (**C**) Ohne Faktor XIII B-Vorbehandlung. Es wurden Anti-Faktor XIII B und FITC-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper inkubiert (1. und 2. Antikörperkontrolle). In **A-C** ist nur die Hintergrundfluoreszenz erkennbar. Maßstab: 50 µm

Elektronenmikroskopische Lokalisation des Faktor XIII auf Endothelzellen

Um die Faktor XIII-Lokalisation in den Endothelzellschichten detaillierter zu analysieren, wurden die Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit des Thrombin-aktivierten Faktor XIII A inkubiert. Anschließend wurden Querschnittpräparate von den Endothelzellschichten hergestellt und für die Elektronenmikroskopie weiterverarbeitet. Wurden die Zellschichten dem aktivierten Faktor XIII ausgesetzt, so konnte eine Faktor XIII A-positive Immunreaktion (Akkumulation von Elektronendichten DAB-Reaktionsprodukten) im Interzellularspalt (Abbildung 8 ; Kopf der Pfeile), an den basalen endothelialen Oberflächen zwischen Zellen und Filter, sowie auf der Innenfläche der Filterporen, nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu wurden keine DAB-Reaktionsprodukte (Abbildung 8) in den Interzellularspalten unbehandelter Endothelzellen beobachtet.

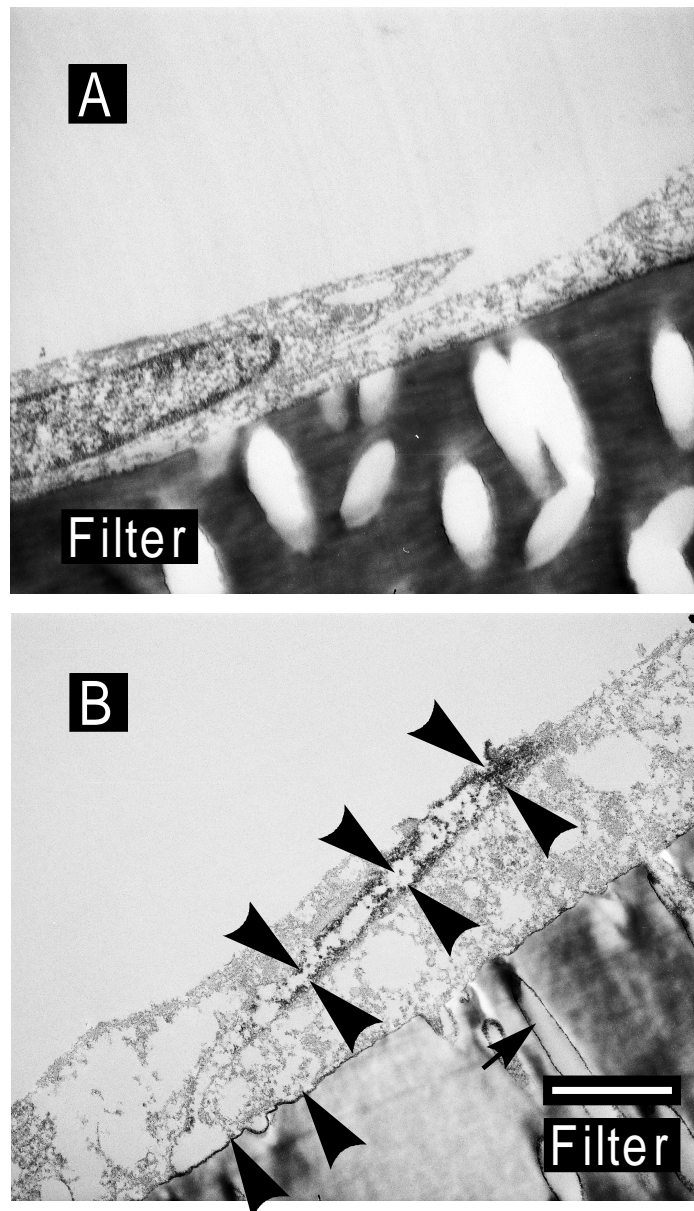


Abbildung 8 : Elektronenmikroskopische Faktor XIII A-Lokalisation auf Endothelzellen. Ein Zwischenraum zweier Endothelzellen ist im Querschnitt dargestellt. (**A**) Kontrollbedingung, Inkubation in Abwesenheit von Faktor XIII A. (**B**) Die Zellschichten wurden für 20 Minuten mit aktiviertem Faktor XIII A (1 E/ml) inkubiert. Faktor XIII immunologisch reaktives Material wurde durch die Akkumulation von elektronendichten DAB-Reaktionsprodukten, im Interzellularspalt (Kopf der Pfeile), an den basalen endothelialen Oberflächen zwischen Zellen und Filter, sowie auf der Innenfläche der Filterporen nachgewiesen.

Wirkung von Faktor XIII A auf die Hyperpermeabilität ausgelöst durch metabolische Hemmung

Wie in vorherigen Studien gezeigt wurde (Noll et al. 1995, Muhs et al. 1997), verursacht die metabolische Inhibition von mitochondrialer und glykolytischer Energieproduktion einen schnellen Anstieg der Makromolekülpermeabilität. In der jetzigen Studie wurde überprüft, ob der aktivierte Faktor XIII A die Hyperpermeabilität in energieverarmten Endothelzellschichten verringern kann. Die Zugabe von 1 mM KCN (Inhibitor von mitochondrialer Atmung) und 1 mM 2-Desoxy-D-Glucose (2-DG, Inhibitor der Glykolyse) verursachte einen Anstieg der Permeabilität von 23% innerhalb von 10 Minuten (Abbildung 9). Wurden die Endothelzellschicht dem aktivierten Faktor XIII A (1 E/ml) ausgesetzt, so reduzierte sich die Permeabilität um 30%. In Gegenwart des aktivierten Faktor XIII A bewirkte die Zugabe der metabolischen Inhibitoren keinen Anstieg der Permeabilität. Das Niveau der Permeabilität blieb so niedrig wie in Gegenwart des aktivierten Faktor XIII A vor Zugabe der metabolischen Hemmstoffe (Abbildung 9).

Die immunhistochemischen Bilder zeigen, daß die Faktor XIII A-positive Färbung in den Zellzwischenräumen stärker ausgeprägt ist, wenn die Zellschichten vorher den metabolischen Hemmstoffen ausgesetzt waren (Abbildung 10). Der Vergleich der Immunfluoreszenzfärbung mit der korrespondierenden Phasenkontrastaufnahme zeigt, daß die verstärkten Ablagerungen des aktivierten Faktors XIII A in der Immunfluoreszenzfärbung den vergrößerten Spalten zwischen den benachbarten Endothelzellen in der Phasenkontrastaufnahme entsprechen.

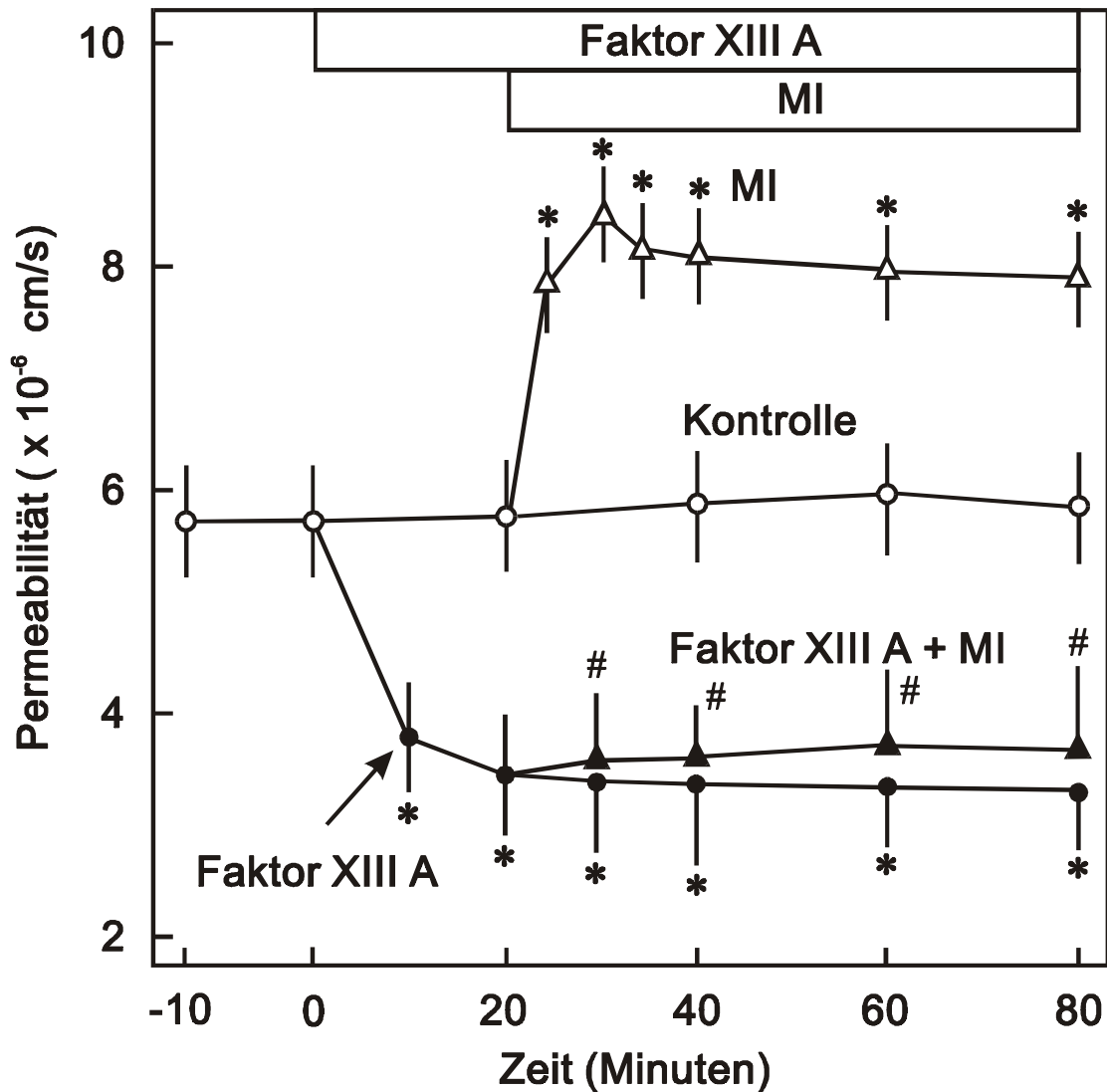


Abbildung 9 : Wirkung der aktivierten Faktor XIII A-Untereinheit (1 E/ml) auf den Albuminfluß aortaler Endothelzellschichten in Gegenwart von 1 mM KCN und 1 mM 2-Desoxy-D-Glucose. (○) Ohne Energieverarmung und in Abwesenheit von Faktor XIII A (Kontrolle) ; (△) Energieverarmung jedoch ohne Faktor XIII A ; (●) Inkubation in Gegenwart des aktivierten Faktor XIII A jedoch ohne Energieverarmung ; (▲) Zugabe von aktiviertem Faktor XIII A und KCN 2-DG

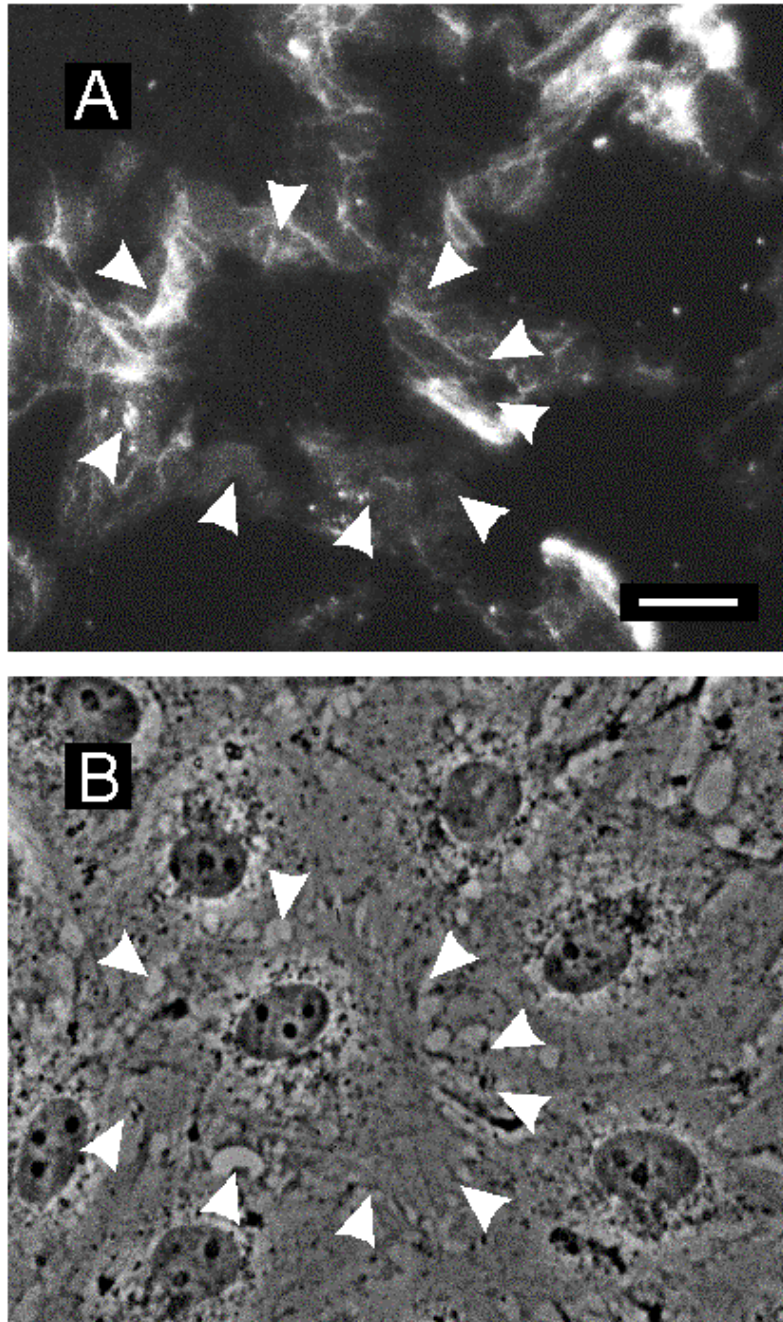


Abbildung 10 : Immunfluoreszenznachweis des aktivierten Faktor XIII A auf Endothelzellschichten unter metabolischer Hemmung.

(**A**) Die Endothelzellschichten wurden zunächst für 20 Minuten in Gegenwart des aktivierten Faktor XIII A inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 60 Minuten den metabolischen Hemmstoffen (1 mM KCN plus 1 mM 2-DG) ausgesetzt. Eine Faktor XIII A-positive Färbung ist in den Zellzwischenräumen erkennbar.

(**B**) Korrespondierendes Phasenkontrastbild zu (**A**). Im Vergleich sieht man bei (**A**) in den Zwischenräumen der anhaftenden Zellen eine positive Faktor XIII A-Färbung. Maßstab : 10 µm

5. Diskussion

Die zentrale Frage dieser Studie war, ob der Faktor XIII die endotheliale Schrankenfunktion direkt beeinflussen kann. In einem Modell kultivierter Endothelzellen fanden wir, daß der aktivierte Faktor XIII nicht nur die basale Makromolekülpermeabilität verringert, sondern außerdem den Anstieg der Permeabilität, herbeigeführt durch Hemmung der endothelialen Energieproduktion, verhindert. Es zeigte sich, daß die Wirkungen des Faktor XIII auf die endotheliale Schrankenfunktion nur von der aktivierten Faktor XIII A-Untereinheit ausgelöst werden.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an Schweineaortenzellen durchgeführt, die auf Filtermembranen zu konfluenten Zellschichten kultiviert wurden (Muhs et al., 1997, Noll et al., 1995). Um die Schrankenfunktion dieser Zellschichten gegenüber Makromolekülen beurteilen zu können, wurde die Passage von Albumin durch die Zellschichten bestimmt. Änderungen der Makromolekülpassage in diesem Modell beruhen auf Veränderungen in der parazellulären Permeabilität (Albelda et al., 1988). Die basale Makromolekülpermeabilität dieser Zellschichten ist nicht die kleinstmögliche. Aus diesem Grund kann dieses Modell zur Analyse von Faktoren eingesetzt werden, die in der Lage sind die Makromolekülpermeabilität noch weiter zu reduzieren (Noll et al., 1996, Hempel et al., 1996).

Wurde der nichtaktivierte plasmatische Faktor XIII den Endothelzellen zugegeben, hatte er keinen Einfluß auf die Makromolekülpermeabilität. Wurde er jedoch zuvor durch Thrombin aktiviert, so senkte er die Permeabilität rasch und anhaltend ab.

Um festzustellen, welcher Anteil des Heterodimerkomplexes für diese Wirkung verantwortlich ist, wurden eine rekombinante A-Untereinheit und eine isolierte B-Untereinheit des Faktor XIII in den Permeabilitätsexperimenten eingesetzt. Die

A-Untereinheit hatte die gleiche Wirkung wie der aktivierte plasmatische Faktor XIII, wenn sie vorher durch Thrombin aktiviert war. Die Wirkung auf die Permeabilität von Faktor XIII A hing von seiner enzymatischen Aktivität ab. Wurde der aktivierte Faktor XIII A durch das alkylierende Reagenz Iodacetamide inaktiviert, verlor er seine Permeabilität-senkende Wirkung. Die B-Untereinheit hatte keine Wirkung auf die Schrankenfunktion. Die Ergebnisse zeigen, daß die aktivierte A-Untereinheit des Faktor XIII das wirksame Prinzip für die Faktor XIII-Wirkung auf die Permeabilität darstellt.

Der aktive Faktor XIII ist eine Transglutaminase, die in der Lage ist, verschiedene Proteine zu vernetzen (Muszbek et al., 1996) und sich dabei scheinbar selbst in dem Proteinmaschenwerk verfängt. In der Immunfluoreszenzmikroskopie fanden wir Ablagerung des aktivierten Faktor XIII auf den Endothelschichten unter exakt den Bedingungen, unter denen der Faktor XIII die Permeabilität reduziert, d.h. in Gegenwart der aktivierten Faktor XIII A-Untereinheit. In der Elektronenmikroskopie beobachteten wir, daß der aktivierte Faktor XIII A unter genau diesen Umständen in den engen Zwischenräumen zwischen angrenzenden Zellen und an der basalen Endotheloberfläche zwischen den Zellen und dem Filter konzentriert war. Ablagerungen von Faktor XIII A wurden an keiner anderen Stelle innerhalb der Endothelzellschichten gefunden. Die B-Untereinheit bildete nach Inkubation keine Ablagerungen auf oder zwischen den Endothelzellschichten.

Es gibt eine Anzahl von Proteinen (wie z.B. Fibronectin und Vitronectin) in den Interzellulärspalten und der subendothelialen Matrix, welche an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten der Endothelzellen beteiligt sind und Substrate für die Faktor XIII-Vernetzungsreaktion darstellen (Keski Oja et al., 1976, Sane et al., 1988). Die Interzellulärspalten stehen den prinzipiellen parazellulären Passageweg für den Durchtritt von Makromolekülen in diesen Zellschichten dar. Die mikroskopischen

Beobachtungen legen nahe, daß der aktive Faktor XIII A die Permeabilität der Zellschichten reduziert, indem er mit den Proteinen der Extrazellulärmatrix an diesen wichtigen Stellen der endothelialen Schrankenfunktion reagiert und die Proteine vernetzt. Hierdurch könnte er auch selbst in dem Maschenwerk gefangen werden.

Es ist bereits früher in dem gleichen experimentellen Modell gezeigt worden, daß der Energieverlust von Endothelzellen eine rasche Steigerung der Permeabilität der Zellschichten bewirkt (Muhs et al., 1997). Dieser Anstieg der Permeabilität ist darauf zurückzuführen, daß es durch die induzierte Energieverarmung zu einer Erweiterung der Interzellularspalten kommt. Hier wurde gefunden, daß in Gegenwart des aktivierten Faktor XIII A der Anstieg der Permeabilität ausblieb, obwohl sich Spalträume zwischen den energieverarmten Endothelzellen bildeten. Die letztere Beobachtung deutet darauf hin, daß Faktor XIII nicht die Reaktion der Endothelzellen verhindert, sondern der Grund für die Aufhebung des Anstieges der Permeabilität unter Energieverlust darauf beruht, daß es zu einer Akkumulation und Reaktion des aktivierten Faktor XIII in den Interzellularräumen kommt. Diese Annahme stimmt mit der obigen Hypothese überein, daß Faktor XIII die Permeabilität durch Vernetzung von Proteinen im Bereich des parazellulären Passageweges reduziert.

Diese Studie zeigt eine neue Funktion des Faktor XIII, nämlich die Stabilisierung der endothelialen Schrankenfunktion. Sie zeigt, daß diese Funktion auf einen direkten Einfluß des Faktor XIII auf die Endothelzellschichten zurückzuführen ist. Die mikroskopischen Beobachtungen zeigen weiterhin, daß der Faktor XIII die Permeabilität der Endothelzellschichten durch Wechselwirkungen mit Proteinen der extrazellulären Matrix verringert. Da der aktivierte Faktor XIII zu einer Gruppe von Proteinen gehört, die Proteine zu stabilen Proteinkomplexen vernetzen kann, liegt die Annahme nahe, daß die Faktor XIII-vermittelte Reduktion der Makromolekülpermeabilität auf einer engeren Vermaschung der extrazellulären

Matrixproteine im Bereich des parazellulären transendothelialen Passageweges beruht.

5. Zusammenfassung

Die Wirkung des Faktor XIII auf die endotheliale Schrankenfunktion wurde an einem Modell kultivierter Schweineaortenendothelzellen studiert. Der Thrombin-aktivierte plasmatische Faktor XIII (1 E/ml) reduzierte die Makromolekülpermeabilität der Endothelzellschichten um $30\% \pm 7\%$ (basale Permeabilität der Zellschichten $5,9 \pm 0,4 \times 10^{-6}$ cm/s), der nichtaktivierte Plasmfaktor XIII hatte keine Wirkung auf die endotheliale Schrankenfunktion. Eine Reduktion der Permeabilität im gleichen Ausmaß ($34\% \pm 9\%$) konnte mit der Thrombin-aktivierten FXIII A-Untereinheit (1 E/ml) erreicht werden. Im Gegensatz hierzu zeigte die nichtaktivierte Faktor XIII A-Untereinheit und die Faktor XIII B-Untereinheit keine Wirkung auf die Schrankenfunktion. Endothelzellen, die mit dem aktivierten Faktor XIII A inkubiert wurden, zeigten im immunhistochemischen Bild, daß der aktivierte Faktor XIII in den Zwischenräumen benachbarter Endothelzellen abgelagert wird. Diese Faktor XIII A-positive Färbung wurde bei Inkubation des nichtaktivierten Faktor XIII A oder Faktor XIII B nicht festgestellt. Eine Hyperpermeabilität verursacht durch metabolische Inhibition (1 mM KCN plus 1 mM 2-Desoxy-D-Glucose) wurde in Gegenwart des aktivierten Faktor XIII A verhindert.

Die vorliegende Studie zeigt, daß der aktivierte Faktor XIII die endotheliale Permeabilität reduziert. Der Verlust der endothelialen Schrankenfunktion, verursacht durch Energieverarmung kann durch den aktivierten Faktor XIII verhindert werden. Es liegt die Annahme nahe, daß seine permeabilitätsreduzierende Wirkung auf einer Vernetzung der extrazellulären Matrixproteine im Bereich des parazellulären transendothelialen Passageweges beruht.

6. Literaturverzeichnis

1. **Albelda, S. M., P. M. Sampson, F. R. Haselton, J. M. McNiff, S. N. Mueller, S. K. Williams, A. P. Fishman, E. M. Levine (1988).** Permeability characteristics of cultured endothelial cell monolayers. *J. Appl. Physiol.* 64: 308-322.
2. **Arndt, H., Kubes, P., Granger, D. N. (1991).** Involvement of neutrophils in ischemia reperfusion injury in the small intestine. *Klin. Wochenschr.* 69: 1056-1060.
3. **Barry, E. L. , D. F. Mosher (1988).** Factor XIII cross-linking of fibronectin at cellular matrix assembly sites. *J. Biol. Chem.* 263: 10464-10469.
4. **Barry, E. L., D. F. Mosher (1989).** Factor XIIIa-mediated cross-linking of fibronectin in fibroblast cell layers. Cross-linking of cellular and plasma fibronectin and of amino-terminal fibronectin fragments. *J. Biol. Chem.* 264: 4179-4185.
5. **Board, P. G., M. S. Losowsky, K. J. Miloszewski (1993).** Factor XIII: inherited and acquired deficiency. *Blood Rev.* 7: 229-242.
6. **Carter, R. D., W. L. Joyner, E. M. Renkin (1974).** Effekt of histamine and some other substances on molecular selectivity of the capillary wall to plasma proteins and dextran. *Microvas. Res.* 16 : 297-303.
7. **Curtis, C. G., K. L. Brown, R. B. Credo, R. A. Dominak, A. Gray, P. Stenberg, L. Lorand (1974).** Calcium-dependent unmasking of active center cysteine during activation of fibrin stabilizing factor. *Biochemistry* 13: 3774-3780.
8. **Egbring, R., A. Kroniger, R. Seitz (1996).** Factor XIII deficiency: pathogenic mechanisms and clinical significance. *Semin. Thromb. Hemost.* 22: 419-425.
9. **Fickenschner, K., A. Aab, W. Stuber (1991).** A photometric assay for blood coagulation factor XIII. *Thromb. Haemost.* 65: 535-540.

10. Fukui, H., H. Kamitsuji, T. Nagao, K. Yamada, J. Akatsuka, M. Inagaki, S. Shike, Y. Kobayashi, K. Yoshioka, S. Maki (1989). Clinical evaluation of a pasteurized factor XIII concentrate administration in Henoch-Schönlein purpura. Japanese Pediatric Group. *Thromb. Res.* 56: 667-675.
11. Greenberg, C. S., P. J. Birckbichler, R. H. Rice (1991). Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J.* 5: 3071-3077.
12. Hempel, A., T. Noll, A. Muhs, H. M. Piper (1996). Functional antagonism between cAMP and cGMP on permeability of coronary endothelial monolayers. *Am. J. Physiol.* 270: H1264-71.
13. Hinshaw, D. B., J. M. Burger, B. C. Armstrong, P. A. Hyslop (1989). Mechanism of endothelial cell shape in oxidant injury. *J. Surg. Res.* 46: 339-349.
14. Hirahara, K., K. Shinbo, M. Takahashi, T. Matsuishi (1993). Suppressive effect of human blood coagulation factor XIII on the vascular permeability induced by anti-guinea pig endothelial cell antiserum in guinea pigs. *Thromb. Res.* 71: 139-148.
15. Jaffe, E. A., R. L. Nachmann, C. G. Becker, C. R. Minick (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins, Identifications by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 52 : 2745-2756.
16. Kamitsuji, H., K. Tani, M. Yasui, A. Taniguchi, K. Taira, S. Tsukada, Y. Iida, H. Kanki, H. Fukui (1987). Activity of blood coagulation factor XIII as a prognostic indicator in patients with Henoch-Schönlein purpura. Efficacy of factor XIII substitution. *Eur. J. Pediatr.* 146: 519-523.
17. Karges, H. E., H. J. Metzner (1996). Therapeutic factor XIII preparations and perspectives for recombinant factor XIII. *Semin. Thromb. Hemost.* 22: 427-436, 1996.

18. **Karges, H. E., R. Clemens (1988).** Factor XIII: enzymatic and clinical aspects. *Behring. Inst. Mitt.* 43-58.
19. **Karnovsky, M. J. (1967).** The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J. Cell Biol.* 35: 213-236.
20. **Keski-Oja, J., D. F. Mosher, A. Vaheri (1976).** Cross-linking of a major fibroblast surface-associated glycoprotein (fibronectin) catalyzed by blood coagulation factor XIII. *Cell* 9: 29-35.
21. **Knox, P., S. Crooks, C. S. Rimmer (1986).** Role of fibronectin in the migration of fibroblasts into plasma clots. *J. Cell Biol.* 102: 2318-2323.
22. **Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
23. **Laposata, M., D. K. Dohnansky, H. S. Shin (1983).** Thrombin-induced gap formation in confluent endothelial cell monolayers in vitro. *Blood* 62: 549-556.
24. **Lorand, L., M. S. Losowsky, K. J. Miloszewski (1980).** Human factor XIII: fibrin-stabilizing factor. *Prog. Hemost. Thromb.* 5: 245-290.
25. **Lorenz, R., P. Born, P. Olbert, M. Classen (1995).** Factor XIII substitution in ulcerative colitis. *Lancet* 345: 449-450.
26. **Lorenz, R., P. Olbert, P. Born (1996).** Factor XIII in chronic inflammatory bowel diseases. *Semin. Thromb. Hemost.* 22: 451-455.
27. **Majno, G. (1963).** Ultrastructure of the vascular membrane. In: Handbook of Physiology. Sect. 2 Vol. II (W. F. Hamilton, P. Dow, Hrg.), *American Physiological Society*, Washington: 1035-1073.
28. **Majno, G., G.E. Palade (1961).** Studies on inflammation I. Effect of histamine and serotonin on vascular permeability. An electron microscopic study. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11: 571-606.

29. **Malik, A. B., M. R. Powers, H. Lum, J. M. Shepard, A. Siflinger-Birnboim (1988).** Endothelial monolayer permeability. *Appl. Cardiopul. Pathophysiol.* 2: 131-140.
30. **Mary, A., K. E. Achyuthan, C. S. Greenberg (1988).** B-Chains prevent the proteolytic inactivation of the A-chains of plasma factor XIII. *Biochim. Biophys. Acta* 966: 328-335.
31. **Mosher, D. F., P. E. Schad (1979).** Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation Factor XIIIa. *J. Clin. Invest.* 64: 781-787.
32. **Muhs, A., T. Noll, H. M. Piper (1997).** Vinculin phosphorylation and barrier failure of coronary endothelial monolayers under energy depletion. *Am. J. Physiol.* 273: H608-617.
33. **Muszbek, L., R. Adany, H. Mikkola (1996).** Novel aspects of blood coagulation factor XIII. I. Structure, distribution, activation, and function. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 33: 357-421.
34. **Noll, T., A. Hempel, H. M. Piper (1996).** Neuropeptide Y reduces macromolecule permeability of coronary endothelial monolayers. *Am. J. Physiol.* 271: H1878-1883.
35. **Noll, T., A. Muhs, M. Besselmann, H. Watanabe, H. M. Piper (1995).** Initiation of hyperpermeability in energy-depleted coronary endothelial monolayers. *Am. J. Physiol.* 268: H1462-1470.
36. **Pappenheimer, J. R., E. M. Renkin, L. Berrero (1951).** Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes; a contribution to the pore theory of capillary permeability. *Am. J. Physiol.* 167: 13-46.
37. **Paye, M., C. M. Lapiere (1986).** The lack of attachment of transformed embryonic lung epithelial cells to collagen I is corrected by fibronectin and FXIII. *J. Cell Sci.* 86: 95-107.

38. **Polgar, J., V. Hidasi, L. Muszbek (1990).** Non-proteolytic activation of cellular protransglutaminase (placenta macrophage factor XIII). *Biochem. J.* 267: 557-560.
39. **Renkin, E. M. (1977).** Multiple pathways of capillary permeability. *Circ. Res.* 41: 735-743.
40. **Renkin, E. M. (1985).** Capillary transport of macromolecule: Pores and other endothelial pathways. *J. Appl. Physiol.* 58: 315-325.
41. **Sane, D. C., T. L. Moser, A. M. Pippen, C. J. Parker, K. E. Achyuthan, C. S. Greenberg (1988).** Vitronectin is a substrate for transglutaminases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 115-120.
42. **Shea, S. M., M. J. Karnovsky, W. H. Bossert (1969).** Vesicle transport across endothelium, simulation of a diffusion model. *J. Theor. Biol.* 24: 30-42.
43. **Siflinger-Birnboim, A., M. S. Goligorsky, P. J. Del Vecchio, A. B. Malik (1992).** Activation of protein kinase C pathway contributes to hydrogen peroxid-induced increase in endothelial permeability. *Lab. Invest.* 67: 24-30.
44. **Simionescu, M., N. Simionescu (1991).** Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol Rev* 1991: 1-78.
45. **Spahr, R., H. M. Piper (1990).** Microcarrier cultures of endothelial cells. In: Cell culture technique in heart and vessel research. (H. M. Piper, Hrg.) Berlin: Springer-Verlag, p. 220-229.
46. **Svensjö, E., K.-E. Arfors, R. M. Raymond, G. J. Grega (1979).** Morphological and physiological correlation of bradykinin-induced macromolecular efflux. *Am. J. Physiol.* 236: H600-H606.
47. **Ueki, S., J. Takagi, Y. Saito, (1996).** Dual functions of transglutaminase in novel cell adhesion. *J. Cell Sci.* 109: 2727-2735.

48. **Utani, A., M. Ohta, A. Shinya, S. Ohno, H. Takakuwa, T. Yamamoto, T. Suzaki, K. Danno (1991).** Successful treatment of adult Henoch-Schönlein purpura with factor XIII concentrate. *J. Am. Acad. Dermatol.* 24: 438-442.
49. **Wolinsky, H. (1980).** A proposal linking clearing of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis. *Circ. Res.* 47: 301-311.

LEBENS LAUF

NAME: Hajimohammad
VORNAME: Amir Hossein
Geburtsdatum: 18.08.72
Geburtsort: Teheran / Iran
Wohnort: Gießen, Deutschland
Familienstand: verheiratet
Eltern: Dr. med. Abbas Hajimohammad, Facharzt für Gynäkologie
Farkhondeh Hajimohammad

Ausbildung

SCHULE:

Grundschule: Teheran 1977-1983
Gymnasium: CVD-Gymnasium in Goslar / Niedersachsen 1984-1989
Gym. Oberstufe: Gesamtschule Gießen Ost 1989-1992
Abitur: Mai 1992

STUDIUM:

Justus-Liebig-Universität Gießen, Humanmedizin von 1992 bis 1999
Ärztliche Vorprüfung: August 1995
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: August 1996
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: August 1998
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: November 1999

BERUFLICHER WERDEGANG :

A. I. P. : 15. November 1999 bis 15. Mai 2001
Frauenklinik der Universität Gießen,
unter Leitung von Prof. Dr. med. W. Künzel

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. H. M. Piper und Herrn PD Dr. Noll für die hervorragende und intensive Betreuung dieser Arbeit.